

Teresa Martínez Rincón

Influencia del sexo en la función y  
estructura de la neurorretina en  
nuevos modelos de  
experimentación animal de  
glaucoma

Director/es

Rodrigo Sanjuán, María Jesús  
García Martín, Elena

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**INFLUENCIA DEL SEXO EN LA FUNCIÓN Y  
ESTRUCTURA DE LA NEURORRETINA EN  
NUEVOS MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN  
ANIMAL DE GLAUCOMA**

Autor

**Teresa Martínez Rincón**

Director/es

**Rodrigo Sanjuán, María Jesús  
García Martín, Elena**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Medicina

**2024**





**Universidad**  
Zaragoza

## Tesis Doctoral

# Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma

*Autora:*

Teresa Martínez Rincón

*Directoras:*

María Jesús Rodrigo Sanjuán  
Elena García Martín

2023



## FACULTAD DE MEDICINA

*Universidad de Zaragoza*

*Facultad de Medicina*

*Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología*

*Servicio de Oftalmología*

Trabajo de Investigación presentado por la Graduada en

Medicina y Cirugía

**Teresa Martínez Rincón**

para optar al grado de doctora

## DIRECTORAS

---

**Dra. María Jesús Rodrigo Sanjuán**

*Servicio de Oftalmología*

*Hospital Universitario Miguel Servet*

Zaragoza

**Dra. Elena García Martín**

*Servicio de Oftalmología*

*Hospital Universitario Miguel Servet*

Zaragoza



## AGRADECIMIENTOS

*A mis directoras, las doctoras María Jesús Sanjuán y Elena García Martín. Me siento muy afortunada de haber compartido estos años de trabajo con vosotras, en los que me habéis transmitido vuestros grandes conocimientos y vuestra experiencia, y en los que he podido aprender tanto de las dos. Habéis sido una inspiración para mí. Elena, gracias por tu apoyo, tu optimismo y energía incansable, tu gran profesionalidad, tus consejos y por tu dedicación todo este tiempo. María Jesús, gracias por tu confianza en mí desde los inicios para compartir conmigo este gran proyecto. Gracias por tu paciencia, por tu perfeccionismo, por tu asesoramiento, por haberme enseñado tanto en todos estos años, y por animarme siempre a no rendirme y a conseguir los objetivos.*

*A mis compañeros Manu Subías, Lorena Arias, Silvia Méndez e Inés Munuera. Gracias por el trabajo en equipo y por la buena compañía. Las innumerables horas en el CIBA no hubieran sido lo mismo sin vosotros. Al grupo de investigación, por haberme permitido formar parte del equipo.*

*A Javier Martínez Balmaseda, mi padre, por su confianza absoluta en mí, por ser una biblioteca andante, por animarme a resistir siempre y no decir nunca “no puedo más y aquí me quedo”. A María Ángeles Rincón, mi madre, por ser el mejor modelo de cómo quiero ser y por haberme enseñado la importancia de la constancia y el trabajo bien hecho. A Javier Martínez, mi hermano, por su apoyo desde la distancia.*

*A mi compañero de vida, el doctor Alejandro Blasco, por contagiarle su energía y optimismo, por animarme a no rendirme nunca, por su apoyo incondicional y su ayuda infinita. Gracias por aguantarme en los peores momentos.*

*A María Teresa Roldán, mi abuela, por su cariño, su compañía y por compartir su experiencia y consejos conmigo.*

*A Candela Lloves, amiga y hermana. Por contagiarle su calma presencial y telefónicamente desde hace ya tantos años. A mis amigas y amigos, por ser un apoyo constante y una alegría en mi vida.*

*Al doctor Francisco Expósito, por ser el mejor ejemplo en constancia y trabajo duro, y por su apoyo inagotable desde el otro lado del charco. Gracias a él, y a Gracia Rincón, Rafael Expósito y María Expósito he llegado hasta aquí. Nunca lo olvidaré.*

*Gracias a todos vosotros por hacer que se haga realidad mi Tesis Doctoral,*

*Teresa Martínez-Rincón*



La presente Tesis Doctoral ha sido estructurada siguiendo la normativa para tesis por compendio de publicaciones. Los artículos incluidos en la tesis pertenecen a la misma línea de investigación y han sido publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports* (Clarivate®) (JCR) previamente.

A continuación, se detallan los cuatro artículos que constituyen el cuerpo de la tesis:

**1. “Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat”.**

Autores: Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Luna C, Pablo LE, Polo V, Garcia-Martin E.

Revista: Experimental Eye Research. 2020 Nov;200:108208.

doi: 10.1016/j.exer.2020.108208. Epub 2020 Aug 31.

PMID: 32882213.

JCR- Q1. Factor de impacto (JCR 2019): 3,011.

ISSN: 0014-4835.

**2. “Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models”.**

Autores: Mendez-Martinez S, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Pablo LE, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E, Rodrigo MJ.

Revista: Journal of Clinical Medicine. 2021 Aug 20;10(16):3697.

doi: 10.3390/jcm10163697.

PMID: 34441992.

JCR- Q1. Factor de impacto (2020): 4,242.

ISSN: 2077-0383.

Open access.

**3. “*Influence of sex on neuroretinal degeneration: 6-month follow-up in rats with chronic glaucoma*”**

Autores: Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Pablo LE, Polo V, Aragon-Navas A, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Bravo Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E.

Revista: Investigative ophthalmology and visual science.2021 Oct 4;62(13):9.

doi: 10.1167/iovs.62.13.9.

PMID: 34643665.

JCR- Q1. FI (2020): 4,799.

ISSN: 0146-0404.

Open access.

**4. “*Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 6- month follow up study in rats*”.**

Autores: Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Herrero Vanrell R, Pablo L, Bravo Osuna I, Munuera I, Garcia-Martin E.

Revista: Experimental Eye Research. 2023 Nov 28:109736.

doi: 10.1016/j.exer.2023.109736.

PMID: 38036216.

JCR- Q2. FI (2022): 3,4.

ISSN: 0014-4835.

Dª. ELENA GARCÍA MARTÍN, Doctora en Medicina y Cirugía, facultativa especialista en Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet y profesora titular de la Universidad de Zaragoza.

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado "***Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma***" que presenta, TERESA MARTÍNEZ RINCÓN, Graduada en Medicina y Cirugía, para optar al GRADO DE DOCTORA, fue realizado bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad y doy mi autorización para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 15 de diciembre de 2023.



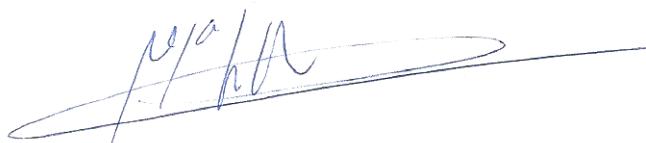
Fdo. Dra. Elena García-Martín

Dª. MARÍA JESÚS RODRIGO SANJUÁN, Doctora en Medicina y Cirugía, facultativa especialista en Oftalmología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y profesora asociada de la Universidad de Zaragoza.

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado "***Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma***" que presenta, TERESA MARTÍNEZ RINCÓN, Graduada en Medicina y Cirugía, para optar al GRADO DE DOCTORA, fue realizado bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad y doy mi autorización para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 15 de diciembre de 2023.



Fdo. Dra. María Jesús Rodrigo Sanjuán

# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b><i>ABREVIATURAS</i></b> .....	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b><i>RESUMEN</i></b> .....	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b><i>RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS</i></b> .....	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Glucoma .....</b>	<b>24</b>
4.1.1	Definición y epidemiología.....	24
4.1.2	Factores de riesgo .....	24
4.1.3	Clasificación.....	27
4.1.4	Fisiopatología del GPAA .....	28
<b>4.2</b>	<b>Modelos de experimentación de glaucoma inducido en animales .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Características de la neurorretina en ratas .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Histología .....	35
4.3.2	Detección de apoptosis de las células de la retina .....	39
4.3.3	Envejecimiento fisiológico de la neurorretina .....	40
4.3.4	Neurodegeneración retiniana .....	40
4.3.5	Mecanismos inmunológicos.....	42
<b>4.4</b>	<b>Influencia del sexo en la neurorretina .....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b><i>ESTADO ACTUAL DEL TEMA</i></b> .....	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b><i>HIPÓTESIS</i></b> .....	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b><i>OBJETIVOS</i></b> .....	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b><i>METODOLOGÍA</i></b> .....	<b>51</b>
<b>8.1</b>	<b>Animales del estudio.....</b>	<b>51</b>
<b>8.2</b>	<b>Anestesia .....</b>	<b>55</b>
<b>8.3</b>	<b>Procedimiento inductor de glaucoma.....</b>	<b>55</b>
<b>8.4</b>	<b>Protocolo exploratorio .....</b>	<b>55</b>
8.4.1	Control de la presión intraocular (PIO) .....	55
8.4.2	Tomografía de coherencia óptica (OCT) .....	57
8.4.3	Electrorretinografía (ERG).....	62
8.4.4	Histología .....	64
<b>8.5</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>64</b>
<b>8.6</b>	<b>Planificación temporal .....</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b><i>RESULTADOS</i></b> .....	<b>68</b>
<b>9.1</b>	<b>ARTÍCULO 1: Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat ...</b>	<b>68</b>

9.2	<b>ARTÍCULO 2: Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models.....</b>	82
9.3	<b>ARTÍCULO 3: Influence of sex on neuroretinal degeneration: 6-month follow-up in rats with chronic glaucoma.....</b>	102
9.4	<b>ARTÍCULO 4: Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats. ....</b>	115
9.5	<b>Difusión de resultados .....</b>	127
<b>10.</b>	<b><i>DISCUSIÓN.....</i></b>	<b>131</b>
<b>11.</b>	<b><i>APORTACIONES DE LA DOCTORANDO.....</i></b>	<b>135</b>
<b>12.</b>	<b><i>LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....</i></b>	<b>137</b>
<b>13.</b>	<b><i>CONCLUSIONES.....</i></b>	<b>139</b>
<b>14.</b>	<b><i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</i></b>	<b>141</b>
<b>15.</b>	<b><i>APÉNDICES .....</i></b>	<b>150</b>
	Apéndice I. Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas.....	150
	Apéndice II. Justificación de la contribución del doctorando en cada publicación .....	152
	Apéndice III. Renuncia de los coautores no doctores a usar los artículos en su propia Tesis Doctoral .....	153
	Apéndice IV. Documentación de la Comisión Ética Asesora de la Experimentación Animal (CEA) .....	157
	Apéndice V. Certificado para capacitación de manejo de animales de experimentación	158



## 1. ABREVIATURAS

<b>C</b>	Central
<b>CCG</b>	Capa de células ganglionares
<b>CFNR</b>	Capa de fibras nerviosas de la retina
<b>CG</b>	Células ganglionares
<b>CIBA</b>	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
<b>CNE</b>	Capa nuclear externa
<b>CNI</b>	Capa nuclear interna
<b>CPE</b>	Capa plexiforme externa
<b>CPI</b>	Capa plexiforme interna
<b>D</b>	Dioptrías
<b>DARC</b>	Detección de apoptosis de células de la retina (Del inglés: Detection of Apoptosing Retinal Cells)
<b>EPR</b>	Epitelio pigmentario de la retina
<b>ERG</b>	Electrorretinograma
<b>GC</b>	Glucocorticoides
<b>GPA</b>	Glaucoma primario de ángulo abierto
<b>GPAC</b>	Glaucoma primario de ángulo cerrado
<b>H</b>	Hembras
<b>HTO/OHT</b>	Hipertensión ocular/(Del inglés: Ocular HyperTension)
<b>I</b>	Inferior
<b>IE</b>	Inferior externo
<b>II</b>	Inferior interno
<b>IN</b>	Inferonasal
<b>IP</b>	Intrapерitoneal
<b>IT</b>	Inferotemporal
<b>JCR</b>	Del inglés Jounal Citation Reports
<b>M</b>	Machos
<b>MLE</b>	Membrana limitante externa
<b>MLI</b>	Membrana limitante interna
<b>ms</b>	Milisegundos

<b>Ms</b>	Microesferas
<b>µV</b>	Microvoltios
<b>N</b>	Nasal
<b>NE</b>	Nasal externo
<b>NI</b>	Nasal interno
<b>OCT</b>	Tomografía de coherencia óptica (Del inglés: Optical Coherence Tomography)
<b>ONT</b>	Normotensión ocular (Del inglés Ocular NormoTension)
<b>PIO</b>	Presión intraocular
<b>PLGA</b>	Ácido poliláctico glicólico (Del inglés: Poly-Lactic-Acid-Glycolic)
<b>PVE</b>	Presión venosa episcleral
<b>R</b>	Retina polo posterior
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensajero (Del inglés: Messenger Ribonucleic Acid)
<b>RNF</b>	Respuesta negativa fotópica (Del inglés PhNR: Photopic Negative Response)
<b>SD</b>	Desviación estándar (Del inglés: Standard Deviation)
<b>SE</b>	Superior externo
<b>SEF</b>	Segmentos externos de los fotorreceptores
<b>SI</b>	Superior interno
<b>SIG</b>	Glaucoma inducido por corticoides (Del inglés: Steroid-Induced Glaucoma)
<b>SN</b>	Superonasal
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>ST</b>	Superotemporal
<b>T</b>	Temporal
<b>TE</b>	Temporal externo
<b>TI</b>	Temporal interno
<b>VT</b>	Volumen total

## **2. RESUMEN**

El tema principal de los cuatro artículos que componen esta Tesis Doctoral es el **análisis de las diferencias en los patrones de neurodegeneración retiniana que se produce en ratas Long-Evans según el sexo a lo largo de su vida, en condiciones fisiológicas y tras la inducción de daño por hipertensión ocular mediante nuevos modelos de glaucoma crónico**. Para ello, se evaluó la presión intraocular, la refracción, y se analizó la estructura neorretiniana mediante tomografía de coherencia óptica y la función neorretiniana mediante electrorretinograma.

El glaucoma es una neuropatía óptica multifactorial, en la que se produce una muerte progresiva de las células ganglionares de la retina que lleva a una pérdida de visión irreversible. En la actualidad constituye la segunda causa de ceguera a nivel mundial. El glaucoma se considera una patología asociada al envejecimiento, y por tanto la edad es un factor de riesgo no modificable. Además, en la literatura reciente, existe evidencia de que las hormonas sexuales y el cambio de los niveles de éstas según el sexo y la edad, parecen influir en el desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas. El estudio de estas diferencias por sexo es una demanda creciente en el camino de la medicina de precisión. Por otro lado, la presión intraocular es el principal factor de riesgo conocido potencialmente modificable para desarrollar glaucoma, y hoy en día, la principal diana terapéutica. Además, existen otros factores que aumentan el riesgo de desarrollar glaucoma, como es la miopía o el uso de corticoides.

Para poder comprender la fisiopatología de esta entidad en mayor profundidad, es fundamental su estudio en modelos animales que permitan replicar la evolución de la enfermedad en humanos. La creación de nuevos modelos de glaucoma crónico inducidos mediante la inyección de microesferas biodegradables en la cámara anterior del ojo de ratas Long-Evans permite realizar un seguimiento de los cambios neurodegenerativos que sufren a lo largo de su evolución de manera mínimamente invasiva.

En primer lugar, para conocer, el neurodesarrollo y la neurodegeneración retiniana fisiológicas se realizó, en una cohorte de ratas Long-Evans sanas, un seguimiento de 24 semanas, correspondiendo desde la pubertad precoz hasta la adultez tardía. Se analizaron los valores de presión intraocular y las diferencias retinianas fisiológicas a lo largo de la vida, así como la diferencia de estos valores según el sexo; con el objetivo de poder comparar en los siguientes estudios de esta Tesis Doctoral (ya que no se encontraron estudios previos de referencia) la neurodegeneración fisiológica y la neurodegeneración patológica producida en ratas con glaucoma crónico inducido. Los machos sanos presentaron una presión intraocular más elevada (llegando incluso a la hipertensión ocular [ $>20$  mmHg] al final del estudio [7 meses de edad]), un mayor espesor neorretiniano pero una mayor pérdida porcentual estructural, y una peor función adaptada a la luz y a la oscuridad medida por electrorretinografía que las hembras. Este estudio concluye que la edad y el sexo influyeron en el neurodesarrollo y la neurodegeneración. Se observaron diferentes patrones degenerativos estructurales y funcionales en función del sexo, que se produjeron antes y con mayor intensidad en los machos que en las hembras de la misma edad. Este es **el primer estudio que proporciona una base para comprender mejor la implicación del sexo en la neurodegeneración fisiológica con un seguimiento prolongado, de 24 semanas.**

La miopía es un defecto refractivo cuya prevalencia va aumentando progresivamente a nivel mundial. Los pacientes con miopía tienen más riesgo de presentar glaucoma y de manera más precoz. Para ampliar el conocimiento sobre el error refractivo como factor de riesgo implicado en el glaucoma, se realizó el segundo estudio de esta Tesis Doctoral en el que se evaluaron las diferencias por sexo en la refracción, estructura y función neorretiniana en función de presencia o no de hipertensión ocular inducida mediante dos modelos de glaucoma crónico en ratas Long-Evans a lo largo de 24 semanas de seguimiento. Este estudio concluye que **los machos presentaron mayor tendencia a la miopía y que el único parámetro correlacionado estadísticamente con la refracción fue la presión intraocular. La hipertensión ocular crónica acelera el paso de emetropía en ojos de ratas Long-Evans a una miopía lentamente progresiva**, con un aumento inicial de la estructura y la función que se invierte con el tiempo.

Una vez observado que, en condiciones fisiológicas, existían diferencias de presión intraocular y neurodegeneración en función del sexo, el paso siguiente fue comprobar si estas diferencias también existían en condiciones de patología; en nuestro caso, en glaucoma crónico inducido en ratas Long-Evans mediante cuatro modelos de hipertensión ocular diferentes: dos modelos de glaucoma no esteroideo y dos modelos de glaucoma esteroideo.

En el tercer artículo de esta Tesis Doctoral se evaluaron las **diferencias por sexo en dos modelos de glaucoma crónico con hipertensión ocular** inducidos mediante el modelo *gold standard* de esclerosis de las venas episclerales y mediante un nuevo modelo patentado por nuestro grupo de investigación inducido por inyección de microesferas biodegradables de ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) en la cámara anterior del ojo de ratas Long-Evans. Este trabajo demuestra que los machos presentaron una mayor presión intraocular en ambos modelos de glaucoma crónico, y se encontraron mayores diferencias en el modelo episcleral. Los machos mostraron un mayor porcentaje de pérdida de espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina y mostraron una peor funcionalidad por electrorretinografía adaptada a la oscuridad/luz en ambos modelos, que empeoró precozmente en el modelo de esclerosis episcleral. Se concluye que **el sexo y el método de inducción de la hipertensión ocular influyeron en la degeneración neurorretiniana y que las ratas hembra con glaucoma crónico parecen presentar una protección neurorretiniana respecto a los machos de su misma edad.**

Por último, en el cuarto artículo de esta Tesis Doctoral se evaluaron las **diferencias por sexo en dos modelos de glaucoma crónico corticoideo**. Un primer modelo inducido mediante la inyección en cámara anterior de microesferas de PLGA cargadas con dexametasona, y un modelo, creado con microesferas cargadas con dexametasona y fibronectina. Los machos mostraron una presión intraocular más elevada. En el modelo solo inducido con dexametasona, los machos mostraron valores de presión intraocular más elevados y el mayor porcentaje de pérdida de espesor en la capa de células ganglionares. Sin embargo, las hembras que recibieron microesferas cargadas con dexametasona y fibronectina experimentaron un mayor porcentaje de pérdida de

espesor en retina, capa de fibras nerviosas de la retina y en la capa de células ganglionares que los machos de la misma edad. Se concluye, por tanto, que aunque **en ambos modelos de glaucoma crónico corticoideo** se utilizó dexametasona, **se observaron cambios diferentes en la presión intraocular y en la neurorretina en función del sexo y de otros cofactores influyentes**, que en nuestro caso fue la fibronectina. Es decir, este estudio coincide en que tanto el sexo como el tipo de modelo de glaucoma inducido parecen influir en la degeneración neurorretiniana.

Los cuatro artículos publicados en esta Tesis Doctoral demuestran que **existen diferencias oculares significativas en la estructura y función de la neurorretina según el sexo; en condiciones fisiológicas, en los diferentes tiempos de vida de las ratas Long-Evans sanas, y en cuatro modelos diferentes de glaucoma crónico inducido**. Además, el modelo de inducción de hipertensión ocular también parece influir en estas diferencias, lo que corrobora la multifactorialidad del glaucoma.

### **3. RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS**

A continuación, se incluye una breve introducción y presentación de cada trabajo, justificando su unidad temática y participación en esta Tesis Doctoral:

1. *“Effect of age and sex on neurodevelopment and degeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in young and adult Long-Evans rat”* (“Efecto de la edad y el sexo en el neurodesarrollo y degeneración en el ojo sano: estudio estructural y funcional longitudinal en ratas jóvenes y adultas Long- Evans”).

*Autores:* Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Luna C, Pablo LE, Polo V, Garcia-Martin E.

*Revista:* Experimental Eye Research.2020 Nov;200:108208.

*doi:* 10.1016/j.exer.2020.108208. *Epub* 2020 Aug 31.

*PMID:* 32882213.

*JCR- Q1. Factor de impacto (JCR 2019): 3,011.*

*ISSN:* 0014-4835.

La retina puede considerarse la estructura neural más accesible del sistema nervioso central (SNC) y se puede acceder a ella con métodos no invasivos, como la tomografía de coherencia óptica (OCT) (1). Para el estudio del neurodesarrollo y la neurodegeneración, la retina de la rata es un buen modelo, ya que sufre un proceso de maduración y de envejecimiento desde el nacimiento con el paso de los meses que se puede extrapolar a la maduración y neurodegeneración que se produce en el ser humano con el paso de los años.

En la actualidad, no se conocen por completo cómo funcionan los diferentes mecanismos y procesos moduladores involucrados en el neurodesarrollo y la neurodegeneración. Además, en el caso de la neurodegeneración, en ocasiones es difícil **diferenciar entre los cambios anatómicos y funcionales fisiológicos** que se producen como consecuencia **del envejecimiento normal** durante el proceso de senescencia, **respecto** a los cambios anatómicos y funcionales que se producen en la **situación premórbida de patologías neurodegenerativas**. Esto hace que sean necesarios estudios que analicen estas sutiles diferencias entre los cambios precoces producidos por patología incipiente, pero que aún no muestran cambios

clínicos evidentes, de los cambios producidos por el propio envejecimiento en animales sanos.

Por otro lado, también existe evidencia de que las hormonas sexuales tienen efecto en el crecimiento y en el desarrollo de diferentes patologías con el paso del tiempo. Los estrógenos concretamente juegan un papel protector importante en diferentes entidades. Por ejemplo, por un lado, facilitan la vasodilatación mediante la activación de receptores estrogénicos endoteliales y activan la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas que se une a estos receptores. Por otra parte, disminuyen la liberación de endotelina, un potente vasoconstrictor, y reducen la resistencia vascular periférica (2). A nivel ocular, se ha demostrado que la expresión de genes retinianos ligados a la edad también depende del sexo (3). Por lo tanto, además de la presión intraocular (PIO) como factor de riesgo conocido de progresión del glaucoma, el sexo podría también tener influencia en la neurodegeneración que se produce en esta patología.

Por todo lo anteriormente explicado, para poder valorar cómo influyen los factores de riesgo de progresión del glaucoma, es necesario conocer cómo es el neurodesarrollo y la neurodegeneración que se produce en situaciones fisiológicas en animales sanos, así como saber cómo varía la PIO a lo largo de la vida de ratas a las que no se les ha hecho ninguna intervención. Además, teniendo en cuenta que el sexo podría influir, por tanto, de manera protectora en el glaucoma, es fundamental **conocer las diferencias según el sexo que se producen en animales sanos a lo largo del tiempo**. En conclusión, este primer estudio observacional en ratas Long-Evans sanas es la **base imprescindible** inicial para entender y poder desarrollar el resto de los estudios experimentales posteriores de esta Tesis Doctoral.

2. *“Influence of chronic ocular hypertension on emmetropia: Refractive, structural and functional study in two rat models”* (“Influencia de la hipertensión ocular en la emetropía: Estudio refractivo, estructural y funcional en dos modelos de rata”).

Autores: Mendez-Martinez S, Martinez-Rincon T, Subias M, Pablo LE, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo

D, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E, Rodrigo MJ.

Revista Journal Of Clinical Medicine. 2021 Aug 20;10(16):3697.

doi: 10.3390/jcm10163697. PMID: 34441992.

JCR- Q1. Factor de impacto (2020): 4,242.

ISSN: 2077-0383.

Open Access. Este artículo fue el más leído del “Special issue”: “Intraocular Pressure and Ocular Hypertension” (“Presión Intraocular e Hipertensión Ocular”).

Existe una asociación entre el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y la miopía. Los pacientes con miopía alta tienen más riesgo de tener glaucoma y de forma más precoz (4). Todavía no está claro cuál es el mecanismo por el que la hipertensión ocular (HTO) influye en la refracción en pacientes jóvenes y causa glaucoma en la edad adulta. La miopía se produce principalmente por un aumento excesivo de la longitud axial del ojo; sin embargo, la causa exacta que produce este aumento de longitud axial aún se desconoce y la HTO podría ser uno de los factores mecánicos implicados. En los ojos con glaucoma, el aumento de longitud axial y los cambios estructurales posteriores probablemente se produzcan por el estiramiento biomecánico secundario al desequilibrio entre la HTO y la elasticidad de la esclera (5), (6).

Hasta la fecha, se han analizado los efectos de la hipertensión ocular en estudios animales más cortos, normalmente con un máximo de 8 semanas de seguimiento (7), (8), (9), (10). Este estudio retrospectivo longitudinal de 24 semanas de seguimiento analiza por primera vez en un **seguimiento tan largo**, cómo influye de manera crónica la **HTO crónica leve-moderada (entre 20 y 30 mmHg)** en el **cambio refractivo**, en la estructura y la función de la neurorretina en dos modelos de HTO inducidos en ratas Long-Evans, comparadas con una cohorte sana con normotensión (ONT) ocular (PIO menor a 20 mmHg) y además se analizan las diferencias **por sexo**.

3. “*Influence of sex on neuroretinal degeneration: Six-month follow-up in rats with chronic glaucoma*” (“*Influencia del sexo en la neurodegeneración retiniana: seguimiento de seis meses en ratas con glaucoma crónico*”).

Autores: Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Pablo LE, Polo V, Aragon-Nava A, Garcia-Herranz D, Garcia Feijoo J, Bravo Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E.

Revista: *Investigative ophthalmology and visual science*. 2021 Oct 4;62(13):9.

doi: 10.1167/iovs.62.13.9. PMID: 34643665.

JCR- Q1. FI (2020): 4,799.

ISSN: 0146-0404.

Open Access.

Clásicamente, se ha considerado que el ojo es un órgano sexualmente neutral. Sin embargo, en los últimos años varias publicaciones han ido señalando que los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) tienen influencia en la modulación de la estructura, función y características patológicas del ojo, siendo los causantes de las diferencias relacionadas con la patología ocular según el sexo.

Los mecanismos exactos por los que estas hormonas actúan en los tejidos oculares y en otros tejidos todavía no se conocen con detalle (11), (12). Algunos estudios empiezan a mostrar evidencias de que los estrógenos pueden tener un papel importante como protector en algunas enfermedades oftalmológicas, tanto en neuropatías como el glaucoma, como en retinopatías como la degeneración macular asociada a la edad, y en alteraciones del cristalino como la catarata (13). Dado que la cantidad de estrógenos producidos en un organismo varían según su edad y sexo, trabajos previos han manifestado la necesidad de que se diseñen estudios que analicen la asociación existente entre sexo, hormonas y patología ocular, y en el caso de que esa asociación exista, estudiar las posibles implicaciones terapéuticas de estos hallazgos (12).

Este estudio examina la **influencia del sexo** en la PIO y en la neurodegeneración estructural y funcional retiniana a lo largo de 24 semanas de seguimiento, en dos modelos distintos de **glaucoma crónico inducidos** por HTO mediante la **esclerosis de venas episcleras e inyección de microesferas biodegradables en la cámara anterior del ojo** de ratas Long-Evans.

**4. “Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 6- month follow up study in rats” (“*Infuencia del sexo en el glaucoma crónico inducido por esteroides: estudio de 6 meses de seguimiento en ratas*”).**

*Autores:* Rodrigo MJ, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Mendez-Martinez S, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Herrero Vanrell R, Pablo L, Bravo Osuna I, Munuera I, Garcia-Martin E.

*Revista:* *Experimental Eye Research.* 2023 Nov 28:109736.

*doi:* 10.1016/j.exer.2023.109736. *PMID:* 38036216.

*JCR- Q2. FI (2022): 3,4.*

*ISSN: 0014-4835.*

El principal factor de riesgo modificable en el glaucoma es tener una PIO elevada. Los glucocorticoides (GC), como la dexametasona, pueden producir un incremento de la PIO, y por tanto, causar un glaucoma inducido por GC (14). La exposición crónica a GC ejerce un efecto negativo en las neuronas que exacerba el daño y produce pérdida neuronal (15). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que los diferentes tipos celulares de la retina expresan receptores estrogénicos diferentes con distinta respuesta a las hormonas sexuales (16), (17). Los estrógenos parecen ejercer un papel en el ojo mediante diferentes mecanismos: reducen la resistencia vascular, lo cual incrementa el flujo sanguíneo del nervio óptico y la retina (18), protegen la matriz extracelular de la malla trabecular y la lámina cribosa (19), e incluso se ha estudiado que en modelos animales pueden actuar como neuroprotector endógeno al mantener la viabilidad de las células ganglionares de la retina incluso bajo condiciones de HTO (20),(21). En relación, los estrógenos además, pueden mitigar los efectos negativos de los GC en las neuronas (22). Se ha sugerido que el sexo podría modular la sensibilidad, acción y potencia a los GC, en un modelo murino (23).

Por todo ello, en este cuarto artículo se analizan los cambios en la PIO, función y estructura de la neurorretina según el sexo en ratas Long-Evans con glaucoma crónico inducido por GC durante 24 semanas de seguimiento. Se inducen dos modelos de glaucoma corticoideo: uno, mediante la inyección en la cámara anterior del ojo con microesferas biodegradables cargadas con dexametasona; y el otro, con una cantidad más baja de dexametasona, pero añadiendo fibronectina. El objetivo principal de este trabajo es evaluar si las diferencias obtenidas según el sexo en los estudios previos también se producen en el glaucoma crónico inducido por GC.

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1 Glaucoma**

#### **4.1.1 Definición y epidemiología**

El glaucoma es una **neuropatía óptica multifactorial** caracterizada por una pérdida progresiva e irreversible de la visión como consecuencia de la degeneración de las células ganglionares de la retina (CGR) (24). Las células ganglionares son neuronas del SNC que tienen el cuerpo celular en la retina interna, sus axones intraoculares no mielinizados forman la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) que se mielinizan a su salida para formar el nervio óptico o segundo par craneal. El daño en la CFNR suele asociar posteriormente cambios estructurales en la cabeza del nervio óptico y defectos típicos en el campo visual (25), que pueden llegar finalmente a la ceguera.

El glaucoma constituye la segunda causa de **ceguera irreversible** a nivel mundial (26). Hay unas 70 millones de personas afectadas por esta patología en el mundo, de las que aproximadamente 7 millones tienen ceguera bilateral secundaria a glaucoma (25).

Más que una única entidad clínica, el glaucoma incluye a un grupo de enfermedades oculares en las que se produce un daño progresivo del nervio óptico por diferentes causas (26).

#### **4.1.2 Factores de riesgo**

El principal factor de riesgo para que se produzca la neuropatía óptica glaucomatosa es el aumento de **presión intraocular** (PIO). La hipertensión ocular (HTO) es el único factor de riesgo modificable conocido (27), por lo que se trata de un factor diana a la hora de realizar el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de esta patología. Uno de los factores asociados a progresión de glaucoma es la fluctuación de la PIO a lo largo de las 24 horas del día o en las sucesivas revisiones del paciente (28). Sin embargo, aunque la presencia de HTO es un factor que se encuentra en un alto porcentaje de pacientes, no siempre se presenta. Algunos pacientes desarrollan una neuropatía óptica

glaucomatosa en presencia de PIO normal; es el conocido como glaucoma normotensivo.

En cuanto a los factores de riesgo no modificables destacan **la edad, la raza y la presencia de antecedentes familiares** de glaucoma (29). El glaucoma aumenta con la edad (28), pues es una enfermedad asociada al envejecimiento y también se ha observado una mayor prevalencia de esta patología en pacientes de raza negra (29).

En referencia al **sexo**, hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que no influía a la hora de aumentar o disminuir el riesgo de glaucoma. Sin embargo, recientemente algunas publicaciones han evidenciado diferencias entre hombres y mujeres. Se han localizado receptores de estrógenos en el cuerpo ciliar y en el epitelio trabecular (11), en la capa nuclear interna de la retina y concretamente en la glía y las células ganglionares de la retina (16), e incluso, la retina es capaz de sintetizar neuroestrógenos mediante enzimas aromatasas (30). A parte de estas diferencias estructurales, se han encontrado diferencias funcionales; el flujo sanguíneo ocular es diferente según el sexo (18) y se han descrito variaciones en la cabeza del nervio óptico en función de la fase del ciclo menstrual correlacionados con los niveles hormonales (31), (32) con perimetría (33) y mayores amplitudes en el electrorretinograma (ERG) de ratas pre-menopáusicas (34). Se han descrito también cambios oftalmológicos durante el embarazo, causados por el estado de hiperestrogenismo (35), (36), (37). Además, suele haber tendencia a la diferenciación entre sexos en patología oftalmológica (12), (13), y en patología neuropsiquiátrica o asociada al neuro-desarrollo en las que la influencia del sistema inmune (38), (39) y la modulación de los genes ligados a la edad son influenciados por el sexo (3), (40). En cuanto al glaucoma concretamente, cada vez hay más evidencia que sugiere que un mayor tiempo de exposición a estrógenos en la vida de una persona puede tener efectos neuroprotectores en la progresión del GPA, incluso se ha demostrado neuroprotección de la retina tras la inyección intravítreo y administración oral de esteroles, mientras que una disminución temprana de estrógenos puede conducir a un envejecimiento precoz y a una mayor susceptibilidad del nervio óptico de sufrir neuropatía óptica glaucomatosa. Sin embargo, es necesario

realizar más estudios para confirmar estos hallazgos, que podrían ser claves en futuras estrategias preventivas y terapéuticas (32), (41).

Existen otros factores de riesgo oculares que se han asociado a un mayor riesgo de presentar glaucoma, como ocurre en pacientes miopes magnos (28). La **miopía** es el error refractivo más frecuente. La causa exacta de la miopía todavía es desconocida, pero se sabe que influyen factores genéticos y ambientales (42). La prevalencia de miopía y miopía magna (equivalente esférico menor que -6.00 dioptrías) es actualmente del 28,3% y se espera que vaya aumentando progresivamente en los próximos años (43). Los pacientes miopes tienen mayor riesgo de presentar glaucoma y de manera más precoz (4).

Otro factor que aumenta el riesgo de glaucoma es la **exposición del paciente a corticoides**, tanto tópicos como sistémicos. Se ha estudiado que el mecanismo por el que los corticoides aumentan la presión intraocular es mediante un aumento de la resistencia de la salida del humor acuoso, de una forma similar a la que ocurre en el GPAA (44), (45). Hasta un 30-40% de los pacientes tratados con los corticoides más potentes (como la dexametasona), pueden desarrollar hipertensión ocular (45), que mantenida en el tiempo, puede llegar a producir daño en el nervio óptico y por lo tanto glaucoma.

También se han asociado a un mayor riesgo de presentar glaucoma los **síndromes de dispersión pigmentaria o en síndromes pseudoexfoliativos**, siendo esta última la causa más frecuente de glaucoma secundario (46). En estas entidades se produce una acumulación progresiva de depósitos granulares de material pseudoexfoliativo en varios tejidos intraoculares (principalmente en el segmento anterior) y extraoculares.

Las características funduscópicas que asocian mayor riesgo de glaucoma son un el aumento de la relación excavación/disco, la asimetría en la relación excavación/disco entre ojos y un espesor corneal central disminuido (29). Otros de los factores que se han estudiado en relación con el glaucoma han sido la hipertensión arterial sistémica, el

vasoespasmo y la hipotensión arterial aguda. Por el momento, varios estudios han visto asociación entre una presión diastólica baja, una presión de perfusión ocular baja y una prevalencia mayor de glaucoma (28). Por último, el tabaco, la diabetes y la migraña no han demostrado un aumento del riesgo de glaucoma en todos los estudios, por lo que la asociación entre estos factores y la neuropatía óptica glaucomatosa sigue siendo controvertida (28).

FACTORES GENERALES	FACTORES OCULARES
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Edad</b></li> <li>- <b>Raza negra</b></li> <li>- <b>Antecedentes familiares</b></li> <li>- <b>Hipertensión arterial sistémica</b></li> <li>- <b>Vasoespasmo</b></li> <li>- <b>Hipotensión arterial aguda</b></li> <li>- <b>Uso de corticoides sistémicos</b></li> <li>- <b>¿Niveles bajos de estrógenos?</b></li> <li>- <b>¿Tabaco?</b></li> <li>- <b>¿Diabetes?</b></li> <li>- <b>¿Migraña?</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipertensión ocular</li> <li>- Uso de corticoides tópicos</li> <li>- Traumatismo ocular previo</li> <li>- Alteraciones oculares congénitas</li> <li>- Miopía</li> <li>- Espesor corneal central disminuido</li> <li>- Aumento de la relación excavación/disco</li> <li>- Asimetría de la relación excavación/disco de cada ojo</li> <li>- Síndrome de dispersión pigmentaria</li> <li>- Síndrome de pseudoexfoliación</li> </ul>

**Tabla 1:** Factores de riesgo asociados a glaucoma.

#### 4.1.3 Clasificación

El glaucoma se puede clasificar de diferentes formas. En primer lugar, según sea primario o secundario a otra causa. Existen 2 tipos de glaucoma primario: el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma primario de ángulo cerrado (GPAC) (ver **Ilustración 1, 2 y 3**). En cuanto a los glaucomas secundarios, pueden producirse por diferentes mecanismos dependiendo de la causa que los provoque pudiendo ser secundario a traumatismos, medicación sistémica o tópica o a patología general u ocular.

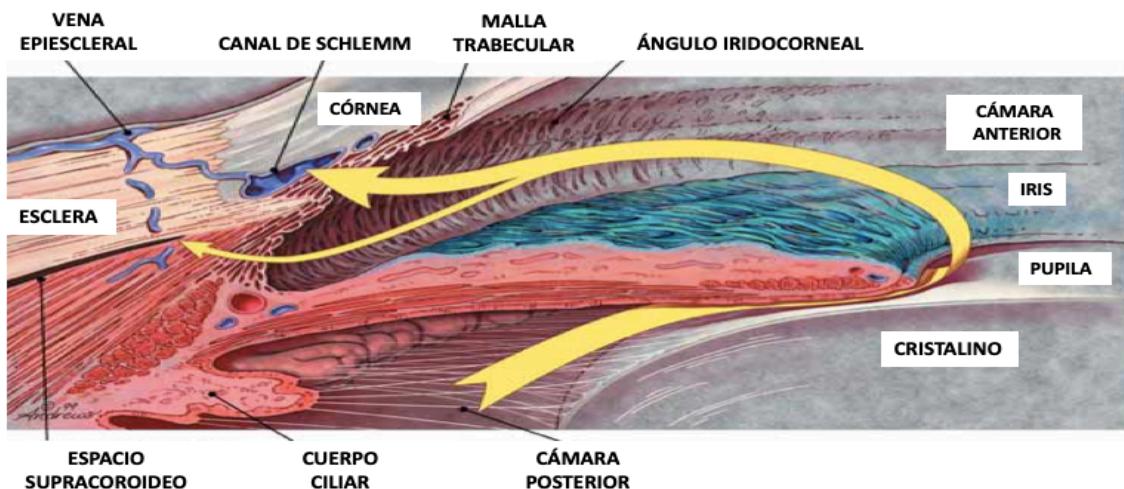
Según la edad del paciente afectado puede clasificarse como congénito, juvenil o del adulto (47).

El tipo más frecuente varía según regiones, pero de forma global, el **GPAA es el más prevalente** a nivel mundial pues constituye un 60% de los casos aproximadamente. Por ese motivo este trabajo se va a centrar principalmente en este tipo de glaucoma, y **el modelo animal de hipertensión ocular va a tratar de asemejar la fisiopatología del GPAA.**

#### 4.1.4 Fisiopatología del GPAA

La secreción del humor acuoso y la regulación de su circulación son procesos fisiológicamente importantes para el funcionamiento normal del ojo. El concepto básico de que una **disfunción en el drenaje** del humor acuoso produce un aumento de la PIO es fundamental para comprender la fisiopatología del glaucoma (48).

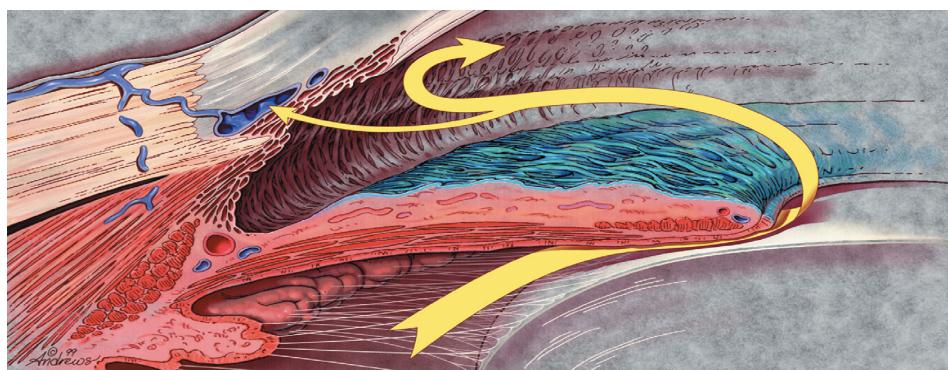
Las principales estructuras oculares relacionadas con la circulación del humor acuoso son el cuerpo ciliar, la malla trabecular y la vía uveoescleral. El humor acuoso se produce por ultrafiltración del plasma en el cuerpo ciliar y pasa de la cámara posterior a la cámara anterior a través de la pupila. En el ángulo iridocorneal, el humor acuoso atraviesa la malla trabecular a través de dos vías. En la vía tradicional el humor acuoso pasa a través de la malla trabecular hacia el canal de Schlemm, que drena a través de los canales colectores a las venas epiesclerales (48). La presión venosa epiescleral (PVE) es relativamente estable, y puede variar con alteraciones en la posición del cuerpo, en algunas enfermedades que obstruyen el retorno venoso hacia el corazón y en shunts arteriovenosos (49).



**Ilustración 1:** Circulación normal del humor acuoso a través de la malla trabecular (flecha grande) y de la vía uveoescleral (flecha pequeña) (Imagen modificada de (50)).

Existe una segunda vía minoritaria de drenaje del humor acuoso en la que están involucrados diferentes mecanismos, conocida como vía uveoescleral. Entre estos mecanismos, el principal es en el que se produce un paso del humor acuoso de la cámara anterior hacia el músculo ciliar y después a los espacios supraciliar y supracoroideo. A continuación, el humor acuoso sale del ojo a través de la esclera o a lo largo de los nervios y vasos que penetran en ella. Se estima que el drenaje por vía uveoescleral en humanos es de aproximadamente un 45% del total. Este drenaje disminuye con la edad y en los pacientes con glaucoma (49).

En el GPAA, el flujo a lo largo de estas dos vías está disminuido (50)(ver **ilustración 2**).



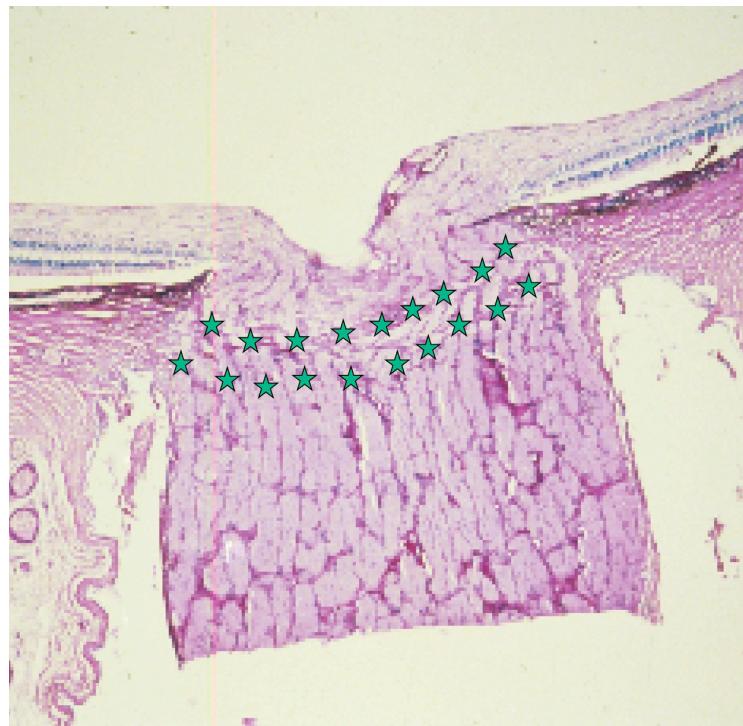
**Ilustración 2:** Ejemplo disminución de la evacuación de humor acuoso en el GPAA (50).

En el GPAC el iris bloquea el flujo de salida del humor acuoso cerrando el ángulo iridocorneal (51)(ver **Ilustración 3**).



**Ilustración 3:** Ejemplo de cierre angular en el GPAC (50).

Existen varias teorías sobre cómo se produce la neuropatía óptica glaucomatosa. En condiciones normales la PIO se mantiene constante gracias a un equilibrio entre la producción de humor acuoso, la salida de humor acuoso por el canal de Schlemm y por la vía uveoescleral y el valor de la PVE. En la teoría mecánica, el aumento de PIO produciría un abombamiento posterior de la lámina cribosa con un estrangulamiento parcial de los axones de nervio óptico (**Ilustración 4**). En la teoría vascular, el aumento de PIO no solo abomba la lámina cribosa y daña los axones por este mecanismo, sino que además comprime los pequeños capilares que nutren la capa superficial del nervio óptico (51). En la teoría inmune el desbalance de células gliales como respuesta al incremento de PIO y muerte celular crónica haría progresar la enfermedad (52).



**Ilustración 4: Histofotografía de la cabeza del nervio óptico.** Las estrellas verdes marcan la lámina cribosa por donde pasan los axones de las células ganglionares de la retina (42).

#### 4.2 Modelos de experimentación de glaucoma inducido en animales

La creación de modelos de experimentación animal que simulen de la forma más exacta posible la fisiopatología por la que se produce en humanos la enfermedad que queremos estudiar es fundamental para poder desarrollar nuevas estrategias de detección y seguimiento de esa patología, y sobre todo para poder estudiar nuevos fármacos y terapias para tratarla.

Aunque existen obvias discrepancias a tener en cuenta entre los animales y los humanos también hay muchas similitudes anatomo-fisiológicas, especialmente entre los humanos y los animales mamíferos. Esto permite a los investigadores estudiar un gran número de mecanismos y evaluar nuevas terapias en modelos animales antes de aplicar sus descubrimientos en humanos. Si bien es cierto que pueden surgir hipótesis y modelos de estudios *in vitro*, a día de hoy todavía éstos deben ser validados en un organismo completo para no ser exclusivamente especulativos. Por tanto, **los estudios**

en animales siguen siendo fundamentales y no pueden ser reemplazados completamente por métodos in vitro (53).

Por eso es fundamental proteger a los animales con los que se hace investigación animal y garantizar su bienestar. Para ello, la Directiva Europea expone 3 principios fundamentales que hay que cumplir a la hora de investigar con animales. Estos 3 principios se conocen como las “**Normas de las 3 Rs: Reemplazo, Reducción y Refinamiento**”. *Reemplazo* significa que no se deben usar animales si es posible realizar para el mismo propósito enfoques experimentales no basados en animales, que tengan la misma fiabilidad y relevancia. Por otro lado, *Reducción* significa que el número de animales utilizado debe ser el mínimo posible para llegar a una conclusión estadísticamente significativa y fiable, y por último, el *Refinamiento* se refiere a que es necesario tomar medidas para minimizar cualquier daño causado a estos animales y aumentar su bienestar (53).

En el caso del glaucoma, los animales de experimentación han permitido estudiar el sistema de drenaje y las estructuras importantes en la circulación del humor acuoso a través de estudios de anatomía comparada entre especies (54), así como la neurodegeneración retiniana. Además, los modelos animales han facilitado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que no podrían haberse obtenido de otra manera al permitir comprender la hipertensión ocular y el glaucoma inducido o espontáneo (55).

Uno de los primeros modelos de glaucoma que se desarrollaron en animales fueron inducidos en **primates no humanos** (56), y los datos obtenidos fueron útiles para comprender el glaucoma en humanos (55). También se desarrollaron modelos de glaucoma en **cerdos** mediante la cauterización de las venas episclerales para inducir HTO (57) y mediante la inyección de fluorosferas de látex en su cámara anterior (58). En **conejos**, comenzó a utilizarse en 1960 un modelo de creación de HTO mediante el uso de corticoesteroides. En 1984 Beatty et al. descubrieron que la aplicación de esteroides tópicos producía aumentos de PIO dosis-dependiente en conejos albinos y en humanos. Sin embargo, el control del glaucoma utilizando modelos de glaucoma en conejos tiene algunas limitaciones: la medición de la PIO es difícil de estandarizar, ya que los valores

pueden variar dependiendo del estrés del animal y de la sequedad ocular que les produce. Además, la retina del conejo está parcialmente mielinizada por oligodendrocitos que no están presentes en las células humanas ni en las de otros mamíferos. Por esos motivos el conejo no es el mejor animal para el estudio de glaucoma (55) .

El desarrollo de modelos de glaucoma en **ratas y ratones** ha permitido grandes avances en el estudio del glaucoma. En 1995 Shareef et al.(57) realizaron la cauterización de venas epiesclerales en ratas como modelo de obtención de HTO, pero se producen picos hipertensivos y tiempos de estudio poco prolongados, alejándose de la fisiopatología normal del GPAA del humano. Gran parte de los estudios moleculares y funcionales de glaucoma han utilizado este método. Más adelante surgió la inyección de solución hipersalina en las venas epiesclerales para producir su esclerosis y así aumentar la PIO simulando un GPAA con disminución de drenaje de humor acuoso (59). En 1998, Ueda et al. (60) utilizaron energía láser para quemar directamente la malla trabecular y las venas epiesclerales. En 2006, Urcola et al. (61) estudiaron 3 modelos experimentales de glaucoma en ratas: a) inyección de microesferas de látex en la cámara anterior, b) inyección de microesferas más hidroxipropilmelcelulosa en la cámara anterior y c) cauterización de las 3 venas epiesclerales. Los tres métodos produjeron un gran incremento de PIO pero fue la cauterización de venas epiesclerales la que consiguió una elevación de PIO más constante durante al menos 24 semanas, y estos mismos resultados se obtuvieron también al inducirlos en cerdos (58), sin embargo su gran tamaño y alto coste dificulta su uso. En 2011, Samsel et al. (62) demostraron elevación de PIO en ratas utilizando inyecciones de microesferas magnéticas para inducir el mismo efecto que con las microesferas de látex, pero en este caso las microesferas podían ser dirigidas hacia el ángulo con un imán. Actualmente, los autores que utilizan esferas para aumentar la PIO en ratas y ratones utilizan el término “modelo de oclusión con micropartículas”, del inglés “*microbeads occlusion model*”, para referirse al modelo que Urcola et al. publicaron en 2006 con ratas y Ruiz-Ederra et al. publicaron en 2005 con cerdos (55). Por último, también se han desarrollado modelos de ratones transgénicos DBA/2J para el estudio de glaucoma (55).

Se ha estudiado, así mismo, el efecto elevador de la PIO con corticoesteroides en ratas y ratones, y se ha visto que también se produce un aumento atribuible al descenso de drenaje de humor acuoso por aumento de resistencia en la vía convencional con aumento de la matriz extracelular en la malla trabecular (63), y que retorna a niveles normales tras el cese de la exposición corticoidea, como ocurre en humanos (64). También se ha utilizado el tratamiento con corticoides para provocar un aumento de PIO en **vacas**, demostrándose que la elevación de PIO que producen altera la expresión génica de su malla trabecular, lo que podría en un futuro a dilucidar los cambios primarios que ocurren a nivel molecular en la malla trabecular en humanos (65).

#### **4.3 Características de la neurorretina en ratas**

Los estudios realizados hasta la actualidad que utilizan **modelos de glaucoma en ratas y ratones** trabajan con **diferentes líneas** de estos animales. Esto, unido a la **ausencia de una base de datos normalizada con estudios basales** en estas especies y seguidas a lo largo del tiempo dificultan en gran medida la posibilidad de comparar los resultados obtenidos en los distintos grupos de trabajo, que resultan diferentes entre sí (66). Por otro lado, **hasta la fecha no existe ningún estudio publicado que analice las diferencias en la degeneración retiniana glaucomatosa entre machos y hembras**. Sería muy útil por tanto evaluar estas diferencias entre ambos sexos, y más aún ante la última evidencia creciente que apoya la influencia estrogénica en la neurodegeneración producida en la patología glaucomatosa.

Las técnicas más utilizadas para evaluar esta neurodegeneración hasta la fecha en el modelo animal son las técnicas histológicas, aunque recientemente está comenzando a utilizarse también la tomografía de coherencia óptica (OCT) o la tecnología DARC (del inglés “*detection of apoptosis in retinal cells*” o *detección de apoptosis de las células de la retina*) de detección de apoptosis de las células retinianas (explicada en el punto 4.3.2) para evaluar este daño morfológico en la neurorretina. Para evaluar el daño funcional, la técnica más utilizada es la electrorretinografía, aunque suele presentar amplias variabilidades en sus respuestas.

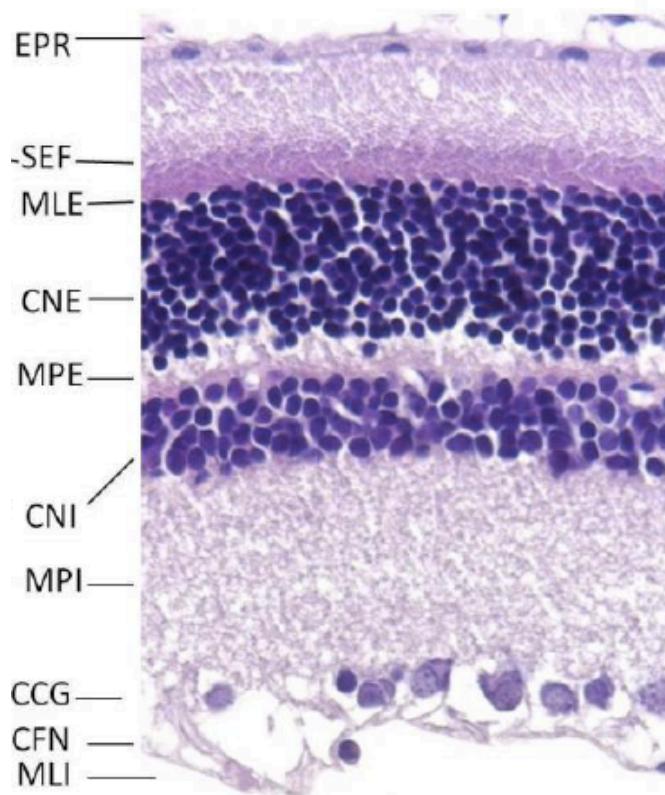
#### 4.3.1 Histología

La retina de la rata (**Ilustración 5**), igual que la de otros vertebrados está formada por 10 capas, que desde la más externa, (en contacto con la coroides) hasta la más interna (en contacto con el vítreo), son las siguientes (67), (68):

1. Epitelio pigmentario de la retina EPR: Monocapa de células epiteliales que contienen gránulos de melanina.
2. Capa de fotorreceptores: formada por los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF) (conos y bastones); en la rata principalmente hay bastones.
3. Membrana limitante externa (MLE): Uniones tipo *zónula adherens* entre las células de Müller (glía de sostén) y los fotorreceptores.
4. Capa nuclear externa (CNE): Formada por los núcleos celulares de los fotorreceptores.
5. Capa plexiforme o sináptica externa (CPE): Sinapsis entre los axones de los fotorreceptores y los de las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
6. Capa nuclear o granular interna (CNI): Formada por núcleos de células amacrinas, bipolares, interplexiformes, de Müller y horizontales.
7. Capa plexiforme o sináptica interna (CPI): Sinapsis de los axones de las células ganglionares, amacrinas y de las células bipolares.
8. Capa de células ganglionares (CCG): Células ganglionares de la retina (CGR) y células amacrinas desplazadas a esta capa.

9. Capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR): Formada por los axones de las CGR.

10. Membrana limitante interna (MLI): Capa más interna, en contacto con el vítreo, formada por los procesos internos de las células de Müller.



**Ilustración 5:** Corte sagital de retina de rata adulta teñido con hetatoxilina-eosina, imagen a 40 aumentos en la que se ven las 10 capas de la retina (extraída de (69)).(EPR: epitelio pigmentario de la retina; SEF: segmentos externos de los fotorreceptores; MLE: membrana limitante externa; CNE: Capa nuclear externa; MPE: membrana plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; MPI: membrana plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares; CFN: capa de fibras nerviosas de la retina; MLI: membrana limitante interna).

En cuanto a los tipos celulares, existen 6 tipos de neuronas (fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células interplexiformes, células amacrinas y células ganglionares) y células no neuronales o gliales.

El sistema nervioso se compone fundamentalmente de dos tipos celulares: **las neuronas y las células de la glía** que superan en número a las neuronas, ambos tipos

celulares ocupan un porcentaje similar del tejido nervioso. Las células de la glía tienen diferentes papeles en el mantenimiento, regulación y correcto funcionamiento del sistema nervioso, así como en la función de la sinapsis. En el SNC los principales tipos de células gliales son los astrocitos y los oligodendrocitos, y en el sistema nervioso periférico, las células de Schwann, las células gliales entéricas y las células satélite (70). Estas células reaccionan ante casi cualquier tipo de daño neuronal. En condiciones normales, la tasa de renovación de las células gliales maduras es cercana a cero, pero cuando se produce algún daño en las neuronas vecinas, la respuesta de las células gliales es proliferar de forma rápida, cambiando su estructura y función, un proceso conocido como gliosis (71), (70). La retina tiene dos tipos de células gliales: microglía (células gliales de la cabeza del nervio óptico y de la retina, con función principalmente fagocítica) y macroglía (astrocitos, que se encuentran en la CFNR, rodeando las fibras y los vasos sanguíneos y células de Müller, que dan soporte estructural a las neuronas de la retina y que mantienen la homeostasis y el soporte metabólico que necesitan los fotorreceptores y neuronas) (67), (72).

Comprender y aprender de los modelos animales en roedores es importante para entender mejor el daño en la neurorretina producido en la patología glaucomatosa en humanos. A la hora de evaluar **histológicamente** este daño, es necesario tener en cuenta que, en los roedores, la población de células ganglionares (CG) en la CCG se ve desplazada por una cantidad de células amacrinas que puede ser equivalente a la magnitud de CG, y que además en esa capa también hay un pequeño número de células horizontales desplazadas. Aunque el tamaño de las células amacrinas suele ser menor que el de las CG, existen algunas de tamaño similar a estas, por lo que diferenciarlas por cuestiones puramente anatómicas y de diferencia de tamaño no sería posible. Por este motivo, es necesario utilizar otras técnicas que permitan garantizar la identificación de CG, como puede ser el uso de trazadores neuronales que dependen del transporte axonal funcional y/o de la integridad anatómica del axón, el uso de marcadores moleculares específicos para CG o la combinación de estos dos métodos con el uso de marcas nucleares (73).

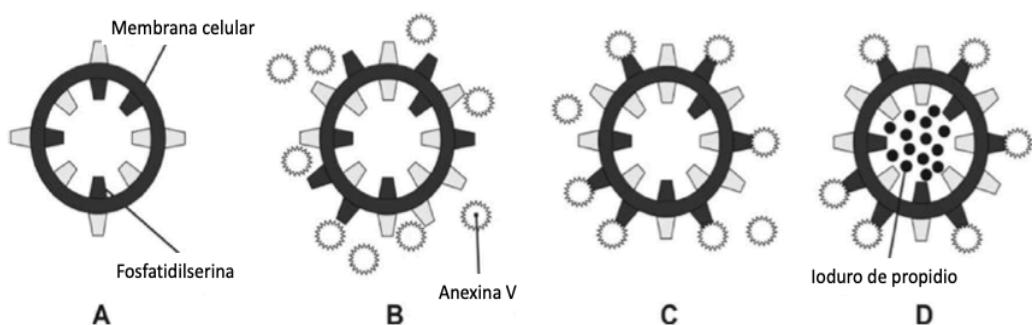
Las técnicas de hibridación molecular se basan en el estudio de secuencias específicas de DNA o RNA. Para identificarlas o cuantificarlas, se utilizan secuencias complementarias a las de DNA o RNA. La unión o hibridación de la secuencia génica diana y la complementaria puede ser detectada mediante técnicas radiactivas o colorimétricas (74). Existen métodos para identificar CG mediante la aplicación de trazadores fluorescentes en lugares diana del cerebro o en el nervio óptico, que viajan desde el axón terminal hasta el soma celular, permitiendo detectarlos en el soma de las CG, en las dendritas proximales y en los axones intrarretinianos (73). Son técnicas más cruentas que requieren hacer una craneotomía en el animal para exponer el cerebro y aplicar el trazador, y posteriormente hay que cubrir la craneotomía y suturar la piel para dar tiempo a la progresión del trazador.

Otro método alternativo a los trazadores puede ser identificar las CG mediante inmunodetección, es decir, mediante el uso de marcadores neuronales específicos que detecten proteínas específicas expresadas por las CG, como el Brn3a y el Brn3b, o mediante hibridación in situ para detectar su RNA mensajero (RNAm). El grupo de Vidal-Sanz demostró que el Brn3a es un marcador fiable y específico para detectar y cuantificar la población completa de CG en ratas adultas. La detección de Brn3a también permite valorar indirectamente el estado funcional de las CG, porque a los 3 días las CG que tienen destrucción en su axón muestran una disminución en la expresión del Brn3a-RNAm, que se correlaciona con una disminución gradual de la proteína Brn3a, como puede comprobarse con Western Blot e inmunohistofluorescencia (73).

Con estos métodos, se ha conseguido detectar que la disposición principal fisiológica en la que se encuentran las de las CG en la retina de las ratas es en el eje nasal-temporal (75). También permite identificar donde se produce la mayor pérdida de CG, y hay estudios que sugieren mayor afectación del sector superior e inferior, más que en el sector nasal y temporal (76).

#### 4.3.2 Detección de apoptosis de las células de la retina

El denominador común en todos los tipos de glaucoma es la muerte de CG mediante apoptosis. Este daño celular se detecta de forma tardía y puede haber hasta 10 años de diferencia hasta la aparición de defectos en el campo visual, además es importante recordar la existencia del glaucoma pre-perimétrico (en humanos se detecta afectación campimétrica cuando ya han muerto el 30% de las CGR). Recientemente, ha surgido una nueva técnica *in vivo* conocida como “detección de las células retinianas apoptóticas” (DARC, por sus singlas del inglés, “*detection of apoptosing retinal cells*”) (**Ilustración 6**). Se trata de una técnica no invasiva capaz de visualizar de manera fiable y en tiempo real los cambios apoptóticos a nivel celular, pudiendo detectar daño glaucomatoso desde un estadio muy precoz, y por tanto, en un futuro permitiría iniciar un tratamiento incluso antes de que se detecten alteraciones funcionales en el campo visual, así como evaluar la respuesta al tratamiento (77), (78), (79). Durante la apoptosis, existen cambios en la superficie de las células que van a morir, como por ejemplo la expresión del fosfolípido de membrana fosfatidilserina. Esta exposición precede varias horas a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática celular. La tecnología que mide la apoptosis celular utiliza esta actividad. La Anexina V se une a la fosfatidilserina expuesta, por lo que introduciendo Anexina V marcada es posible detectar las células que están en apoptosis. Además, introduciendo un contraste que se introduzca en las células cuando se ha roto la integridad de la membrana celular, como el ioduro de propidio, se puede saber si la apoptosis ha finalizado (79).



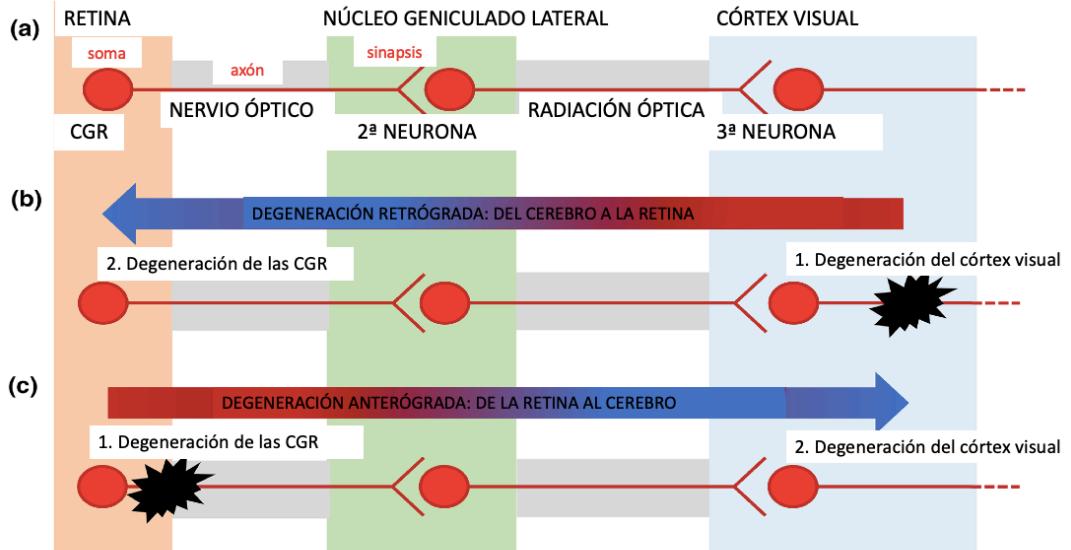
**Ilustración 6:** **A)** célula sana que contiene fosfatidilserina en la parte interna de la membrana plasmática. **B)** Apoptosis precoz con externalización de la fosfatidilserina. **C)** Unión de la Anexina V a la fosfatidilserina expuesta. **D)** Apoptosis tardía, con internalización del IP en la célula (adaptado de (79)).

#### 4.3.3 Envejecimiento fisiológico de la neurorretina

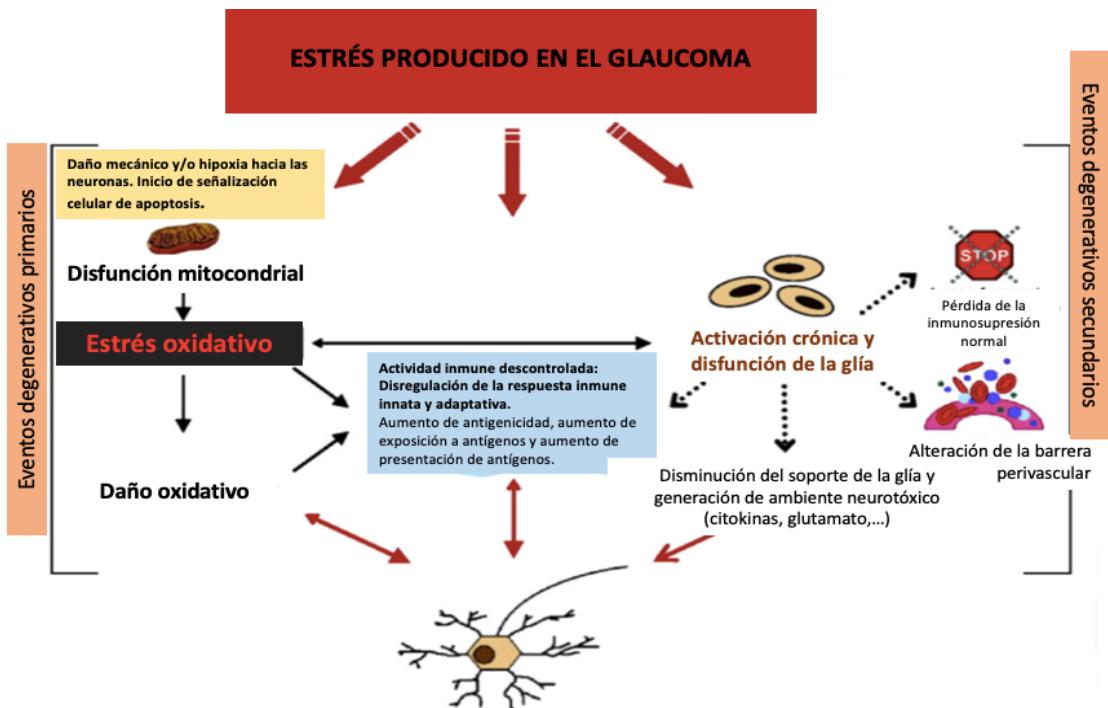
Además de la degeneración neurorretiniana que ocurre en el caso del glaucoma, también hay una **degeneración neurorretiniana fisiológica asociada al envejecimiento** (80). La proporción de CFNR que se compone por axones de CG no es constante con la edad, sino que hay un aumento de espesor total de esta capa por aumento de la proporción de tejido no neuronal. Los datos varían entre publicaciones, pero **se estima que la pérdida de CG asociada a la edad es de aproximadamente 0,6% al año, mientras que el adelgazamiento anual de la CFNR es del 0,2%** (81). Si ocurre una compensación similar en el espesor de la CFNR por la pérdida de axones que se da **en el glaucoma**, sería necesario realizar una corrección dependiente del estadio de glaucoma y una corrección dependiente de la edad para **ajustar las medidas del OCT** a la cantidad neuronal remanente real. Por eso, sería necesario conocer si existe un aumento de tejido no neuronal en el caso de los pacientes con glaucoma, como ocurre con la pérdida fisiológica, y además conocer, en el caso de la pérdida fisiológica asociada al envejecimiento qué tasa de pérdida se produce con mayor exactitud (81).

#### 4.3.4 Neurodegeneración retiniana

La neurodegeneración ocurre en tres etapas. Primero se produce un daño axonal primario, después se produce la muerte de la neurona dañada y por último se produce el daño y posterior muerte de neuronas adyacentes. Este último proceso se conoce como “**degeneración secundaria**”. Ocurre por tanto en células neuronales que inicialmente no estaban dañadas, pero que debido a la exposición a agentes citotóxicos que han ido liberando las neuronas con daño axonal primario terminan muriendo igualmente. A nivel ocular, tanto las CGR como los fotorreceptores son susceptibles de sufrir este proceso (82). Esta degeneración puede desplazarse de manera anterógrada cuando el daño comienza en la retina y se transmite al cerebro o bien retrógrada en el caso opuesto (**Ilustración 7**). Los distintos factores estresores para la degeneración neuronal y consiguiente daño glaucomatoso se representan esquemáticamente en la **Ilustración 8**.



**Ilustración 7:** Representación de la degeneración anterógrada y retrógrada en la vía visual. a) Representación de la organización de la vía visual desde la retina hasta el córtex visual. b) El daño en el córtex visual produce retrógradamente degeneración retiniana. C) El daño en la retina produce anterógradamente degeneración del córtex visual. (Adaptado de (76)).



Aumento de la susceptibilidad de los axones de las CGR a sufrir más daño

**Ilustración 8:** El daño oxidativo parece ser un factor crítico que produce consecuencias neurodestrutivas de las mitocondrias, activación de la respuesta glial y activación descontrolada del sistema inmune durante la degeneración glaucomatosa. (Adaptado de (83)).

#### 4.3.5 Mecanismos inmunológicos

La luz atraviesa todas las capas de la retina antes de estimular a los fotorreceptores, que captan la energía luminosa y la transforman en energía eléctrica mediante cambios en su potencial de membranas. Después transmiten esta señal nerviosa mediante contactos sinápticos a través de las células bipolares, horizontales y amacrinas hasta las CG. Los axones intraoculares no mielinizados forman la CFNR que se mielinizan a su salida para formar el nervio óptico, que transmite la información luminosa recogida en la retina hasta los núcleos cerebrales correspondientes. En la rata, los principales territorios de proyecciones de las CG en el cerebro son el colículo superior y el n úcleo geniculado dorso-lateral. Las capas visuales de los colículos superiores reciben aferencias principalmente de la retina contralateral, ya que en la rata más del 95% de los axones de las CG se decusan a nivel del quiasma óptico, a diferencia de lo que ocurre en el ser humano, en el que solo se decusan un 53%. (67).

Este hecho tiene importancia para entender que existe evidencia que apoya el papel del colículo superior en la **propagación de fenómenos neuroinflamatorios inducidos por la hipertensión ocular de un ojo hacia el ojo contralateral** en modelos de glaucoma en ratas (84), (76). Hay evidencia de que la degeneración que se produce en el ojo contralateral estaría mediada por fenómenos inflamatorios que se trasladarían al otro ojo a través del nervio óptico (85) y ese daño podría entonces ser también consecuencia de fenómenos de degeneración secundaria (76).

La microglía y los astrocitos tienen un papel fundamental como reguladores de la respuesta inflamatoria en el SNC. La microglía son las células inmunitarias innatas del SNC, con funciones sensoras y efectoras y con capacidad fagocítica en condiciones fisiológicas y patológicas (86). El papel de las células de la glía es también muy importante en la fisiopatología del daño neorretiniano que se produce en el glaucoma, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (87). Durante las fases iniciales del glaucoma, una de las alteraciones más importantes causantes de la progresión del daño es la activación de las células gliales (gliosis). Esta activación produce cambios morfológicos y estructurales de estas células, migración y proliferación

de las mismas, cambio su distribución en el tejido, expresión de diferentes factores de crecimiento y citoquinas o activación de su capacidad fagocítica (86). La gliosis tiene como objetivo proteger el sistema nervioso reestableciendo el medio extracelular y aportar factores que favorezcan la supervivencia de las neuronas, si bien una respuesta mantenida en el tiempo y descontrolada, como ocurre en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, acaba teniendo un impacto negativo en el tejido nervioso (71). El glaucoma es una neuropatía progresiva que suele ser bilateral, aunque la afectación es asimétrica, por lo que el daño generalmente se presenta en uno de los ojos y con el tiempo se termina afectando también el ojo contralateral. Recientemente se han publicado diferentes estudios de modelos experimentales de glaucoma en los que se ha observado que la hipertensión ocular provocada en uno de los ojos termina afectando con el tiempo al ojo contralateral normotenso (71), (88), (89), (86), (90). Estos ojos normotensos contralaterales a aquellos en los que se provocó la HTO, mostraron una activación de la macro y de la microglía en ausencia de muerte neuronal (71). Se cree por tanto que este mecanismo inmune de gliosis en el ojo contralateral al ojo dañado inicialmente puede tener un papel importante en la muerte de CG (86).

#### **4.4 Influencia del sexo en la neurorretina**

Durante los últimos años hay un interés creciente en analizar la influencia del sexo en las enfermedades neurodegenerativas que afectan a la retina. Se ha puesto especial interés en analizar esta influencia en patologías asociadas al envejecimiento, como el glaucoma, la degeneración macular asociada a la edad o la enfermedad de Alzheimer, ya que existen cambios en los niveles hormonales asociados a cada etapa vital y que varían en función del sexo (91). Cada vez hay más evidencia que apoya la hipótesis de que el glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que representa el envejecimiento acelerado del nervio óptico. Debido al envejecimiento de la población, la prevalencia de glaucoma va aumentando. En edades avanzadas, hay más mujeres que hombres, por lo tanto, la mayor parte de la población afectada por glaucoma son mujeres. Por todo ello, se necesita investigación específica que analice los mecanismos

fisiopatológicos específicos según el sexo involucrados en la progresión del glaucoma para poder desarrollar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas (41).

El envejecimiento produce una acumulación de estrés oxidativo que puede producir un deterioro progresivo de la estructura y de la función de diferentes tejidos, incluida la retina (34). Parece que el sexo influye en el envejecimiento fisiológico. Los estrógenos tienen efecto antioxidante en distintos tejidos y ejercen neuroprotección (34),(92). Desde una perspectiva funcional los estrógenos pueden, por un lado, regular la PIO influenciando la producción y la salida del humor acuoso a través de sus receptores en el epitelio ciliar y producir PIO más bajas. Se ha comprobado, por ejemplo, que en el estado hiperestrogénico del embarazo se produce un descenso de los valores de PIO. Por otro lado, los estrógenos pueden mejorar la vascularización del nervio óptico al disminuir la resistencia vascular. A este respecto se ha demostrado en estudios animales que el estradiol regula el tono del músculo liso y la resistencia vascular, aumenta la actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico e influye en la perfusión del nervio óptico, las células ganglionares de la retina y sus estructuras de soporte (41). Por último, los estrógenos pueden generar mayores señales en el ERG (34) y por perimetría automatizada. Desde una perspectiva estructural, los estrógenos han mostrado neuroprotección en fotorreceptores y CGR (12), (93), (13). Pero, además, la retina es capaz de sintetizar estrógenos (94). La evidencia apoya la hipótesis de que la deficiencia de estrógenos se asocia a la fisiopatología del nervio óptico y a la neurodegeneración glaucomatosa mediante varios mecanismos.

## **5. ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

El **glaucoma es una patología multifactorial** con afectación del nervio óptico que lleva progresivamente a la **ceguera**. Muchos pacientes con glaucoma permanecen asintomáticos hasta estadios avanzados de la enfermedad. Esto es debido a que la pérdida progresiva del campo visual es periférica y típicamente asimétrica, lo que permite una compensación por la superposición con el campo visual del ojo menos afectado (48) y solo se observan cambios perimétricos a partir de la muerte de más del 30% de las células ganglionares (50). Como consecuencia, menos del 50% de los pacientes afectados por esta patología son conscientes de su enfermedad y en países en vías de desarrollo la cifra aún es inferior (95). Por otra parte, aunque la prevalencia de glaucoma aumenta con la edad, la mayoría de los pacientes que no son conscientes de tener glaucoma tienen menos de 60 años (48), lo que representa una gran necesidad de ser capaces de diagnosticar la enfermedad en estadios más precoces. En España, se estima que existen alrededor de 1 millón de personas con glaucoma. En Aragón, habría aproximadamente 29.000 afectados, y la mitad de ellos lo desconocen.

**Además de la edad, tener una PIO elevada es el factor de riesgo modifiable más valorado y estudiado hasta ahora para evaluar el riesgo y la progresión del glaucoma (42).** Sin embargo, revisando bibliografía científica publicada sobre el tema, **cada vez hay más evidencia que sugiere que el tiempo de exposición a los estrógenos a lo largo de la vida podría alterar la patogénesis del glaucoma, y que los estrógenos podrían tener un efecto neuroprotector**, aunque es necesario realizar más estudios para confirmar este hallazgo. Se ha registrado una prevalencia global más alta de glaucoma en mujeres (2,21% en mujeres frente a 1,67% en hombres), que se atribuyó a una mayor esperanza de vida y a desventajas socioeconómicas y sanitarias (96), (97). Por otro lado, varios estudios y meta-análisis sobre la prevalencia del GPAA han demostrado de forma consistente que los hombres tienen entre 1,36 y 1,37 veces más probabilidades que las mujeres de padecer GPAA después de ajustar por edad, raza y diseño del estudio (98), (99), (100), (101). **La prevención y tratamiento específico para el glaucoma según el sexo podría tener importancia en el futuro (102)**, por lo que parece fundamental profundizar en la investigación sobre este tema. En octubre de 2018 comencé mi Tesis Doctoral y el día 12 de marzo (día mundial del glaucoma) de 2019, la Asociación de Glaucoma para Afectados y Familiares (AGAF) denunció mediante un comunicado la

falta de investigadores y estudios en profundidad centrados en el glaucoma en la mujer. En el caso de la mujer, la pérdida de visión puede verse influenciada por los cambios hormonales que se producen a lo largo de su vida. La presidenta de la asociación, Sra. Delfina Balonga remarcó que “*las mujeres con glaucoma tienen que hacer frente a muchísimas dudas sobre cómo actuar en casos como el embarazo, el parto, la anticoncepción, la menopausia... Normalmente se suelen afrontar estos procesos siguiendo el sentido común, tanto por parte del paciente como de los médicos, pero es una problemática aún desconocida y de la que aún no sabemos su verdadero alcance*”. Por esos motivos la asociación solicitó que “*se divulguen y se expliquen los conocimientos obtenidos en las escasas investigaciones que se realizan sobre este aspecto con el fin de tener una norma científica y concreta de actuación en cada caso y en cada fase de la vida de la mujer*” (103).

Es fundamental realizar más investigación en pro a una medicina de precisión y tratamiento personalizado en la neuropatía glaucomatosa. Debido al desconocimiento causal y la escasa bibliografía **la presente Tesis Doctoral intenta dar respuesta** a este conocimiento limitado, y pretende estudiar las **diferencias por sexo en nuevos modelos de glaucoma crónico en rata, pues nunca antes se habían realizado este tipo de estudios.**

Las ratas son animales que crecen rápidamente y en relativamente poco tiempo pasan por diferentes estados madurativos. Su cuidado y mantenimiento es más sencillo y económico que el de otros animales, y han demostrado ser más útiles en el estudio del glaucoma que otras especies de mamíferos. Existen trabajos que han estudiado la relación entre la edad de una rata y la edad de un ser humano que podrían ayudar a la hora de estudiar la progresión de glaucoma en estos animales asociada al estado madurativo del animal (104). Las ratas tienen una infancia corta y acelerada, se desarrollan rápidamente y son sexualmente maduras a las 6 semanas. Cada mes de vida de la rata equivale aproximadamente a 2,5 años del adulto humano y de media una rata de laboratorio puede vivir hasta 3 años (105). Las ratas maduras sexualmente tienen ciclos hormonales regulares (106), y mantienen niveles estrogénicos elevados hasta etapas muy tardías de su vida (107). Conocer todos estos datos pueden permitir estudiar, en un espacio relativamente corto de tiempo, las diferencias fisiopatológicas entre sexos en nuevos modelos de GPAA similares al humano.

## **6. HIPÓTESIS**

Existen diferencias oculares funcionales y estructurales en función de la edad y el sexo que influyen en la neurodegeneración fisiológica, así como en la patogénesis y velocidad de progresión del glaucoma crónico. Dichas diferencias pueden estudiarse en nuevos modelos de glaucoma crónico inducidos en rata de experimentación, mediante exploraciones *in vivo* funcionales realizadas con medición de la presión intraocular por tonometría y con electrorretinografía, y mediante exploraciones estructurales con tomografía de coherencia óptica, evitando el sacrificio animal y cumpliendo las 3R's (Reemplazo, Reducción y Refinamiento).

## **7. OBJETIVOS**

1. Analizar los **cambios de la neurorretina** de ratas Long-Evans sanas a lo largo de 6 meses de seguimiento como parte del **proceso fisiológico de envejecimiento** con:
  - a. Evaluación de la presión intraocular.
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía (ERG) y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
2. Analizar las **diferencias debidas al sexo** en cuanto a presión intraocular y neurodegeneración de la retina y del nervio óptico en ratas sanas Long-Evans a lo largo de 6 meses de seguimiento como parte del **proceso fisiológico de envejecimiento** con:
  - a. Evaluación de la presión intraocular.
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
3. Analizar los **cambios refractivos** de ratas Long-Evans producidos **por la hipertensión ocular (HTO) crónica** mantenida a lo largo de 6 meses, mediante:
  - a. Evaluación del poder dióptrico (D)
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
4. Analizar las **diferencias debidas al sexo en el cambio refractivo** de ratas Long-Evans producidos **por la hipertensión ocular (HTO) crónica** mantenida a lo largo de 6 meses.
  - a. Evaluación del poder dióptrico (D).

- b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
5. Analizar los **cambios en la neurorretina** de ratas Long-Evans con **glaucoma crónico inducido por HTO** a lo largo de 6 meses de seguimiento con:
- a. Evaluación de la presión intraocular.
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
  - c. Análisis de las estructuras oculares mediante técnicas histológicas
6. Analizar las **diferencias debidas al sexo** en la retina y nervio óptico de ratas Long-Evans con **glaucoma crónico inducido por HTO** a lo largo de 6 meses de seguimiento con:
- a. Evaluación de la presión intraocular.
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
7. Analizar los **cambios en la neurorretina** de ratas Long-Evans con **glaucoma crónico inducido por corticoides** a lo largo de 6 meses de seguimiento con:
- a. Evaluación de la presión intraocular.
  - b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
  - c. Análisis de las estructuras oculares mediante técnicas histológicas.
8. Analizar las **diferencias debidas al sexo** en la retina y nervio óptico de ratas Long-Evans con **glaucoma crónico inducido por corticoides** a lo largo de 6 meses de seguimiento con:
- a. Evaluación de la presión intraocular .

- b. Análisis de la retina y nervio óptico mediante técnicas *in vivo* no invasivas funcionales con electrorretinografía y estructurales con tomografía de coherencia óptica (OCT).
9. Valorar la importancia de tener en cuenta la edad y el sexo de los animales para interpretar los cambios fisiológicos y la evolución del glaucoma crónica en modelos de degeneración animal.

## **8. METODOLOGÍA**

Los 4 artículos que forman parte de esta Tesis Doctoral son el resultado de varios estudios longitudinales (prospectivos y retrospectivo), en los que el trabajo de campo con animales se realizó en las instalaciones del servicio de cirugía experimental en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), Zaragoza, España. El cuidado y manipulación de los animales se realizó siguiendo los acuerdos del Consejo de Europa sobre Experimentación Animal Aplicada, recogidos en las Directivas 86/609/CEE y 2010/63/UE, de conformidad con la resolución de la asociación por la investigación en visión y oftalmología (ARVO: del inglés *Association for Research in Vision and Ophthalmology*), sobre la regulación del uso de animales de experimentación, y aprobados por el Comité de Investigación Animal (PI134/17) de la Universidad de Zaragoza (UZ).

### **8.1 Animales del estudio**

Para poder realizar el trabajo con animales, en primer lugar, obtuve la certificación para el manejo de animales de experimentación en Animalaria, Formación y Gestión S.L., en concreto obtuve la capacitación para realizar las funciones B (eutanasia de los animales) y C (realización de procedimientos) (ver **anexo V**).

Todas las experiencias se llevaron a cabo en ratas Long-Evans de ambos性 (40% machos y 60% hembras), a partir de 4 semanas de vida (1 mes), con pesos iniciales de entre 50 y 100 gramos, y realizados previos controles analíticos y clínicos para asegurar su idoneidad para la inclusión en este proyecto. La empresa proveedora de los animales fue Janvier-labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Durante el tiempo de la experiencia, los animales permanecieron estabulados separados por sexos en habitaciones con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, una temperatura de 22º y una humedad relativa del 55%, fueron alimentados con agua y pienso ad libitum y las jaulas tuvieron medidas de enriquecimiento ambiental para garantizar el bienestar animal.

Se identificó a todos los animales de forma individual con un microchip subcutáneo para su correcto estudio. El número de cada microchip se correlacionó con otro número independiente y diferente identificativo de la cohorte.

Para la realización de estos trabajos se contó con diferentes poblaciones:

- Para el estudio "***Effect of age and sex on neurodevelopment and degeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in young and adult Long- Evans rat***" ("Efecto de la edad y el sexo en el neurodesarrollo y degeneración en el ojo sano: estudio estructural y funcional longitudinal en ratas jóvenes y adultas Long- Evans"), observacional longitudinal durante 24 semanas de seguimiento, se analizaron 85 ratas (31 machos (M) y 54 hembras (H)) Long- Evans sanas sin intervención de entre 4 semanas (1 mes) y 28 semanas de vida (7 meses)([108](#)).
- Para el estudio "***Influence of Chronic ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models***" ("Influencia de la hipertensión ocular crónica en la emetropía: estudio refractivo, estructural y funcional en dos modelos de rata"), retrospectivo longitudinal de 24 semanas de seguimiento, se recogieron de forma retrospectiva datos de nuestra propia base de datos de ratas Long- Evans con glaucoma inducido. Se seleccionaron 260 ojos y se clasificaron en 2 cohortes: la cohorte ONT (del inglés: *ocular normotension*, es decir, ojos normotensivos con PIO < a 20 mmHg: 70 ojos) y la cohorte OHT (del inglés: *ocular hypertension*, es decir ojos hipertensivos con PIO > 20 mmHg: 186 ojos). Los ojos hipertensos fueron aquellos en los que la hipertensión se había inducido esclerosando las venas episclerales cada dos semanas con solución hipertónica como describieron Morrison et al. ([59](#)) (grupo ES: 62 ojos) o inyectando microesferas de ácido poliláctico glicólico (PLGA) (del inglés *poly-lactic-acid-glycolic*) en cámara anterior, cada dos semanas durante el primer mes y posteriormente una vez al mes hasta la semana 20 como describieron Rodrigo et al. y Garcia-Herranz et al. ([109](#)), ([110](#)) (grupo MS: 124 ojos)([111](#)).

- Para el estudio “*Influence of Sex on Neuroretinal Degeneration: Six-Month Follow-Up in Rats With Chronic Glaucoma*” (“*Influencia del sexo en la neurodegeneración retiniana: seguimiento de 6 meses en ratas con glaucoma crónico*”), intervencionista longitudinal de 24 semanas de seguimiento, se utilizaron 46 ratas (18 M / 28 H) Long-Evans para inducir glaucoma crónico. La inducción de HTO se realizó utilizando dos modelos diferentes (**Ilustración 9**) ([\(112\)](#)):

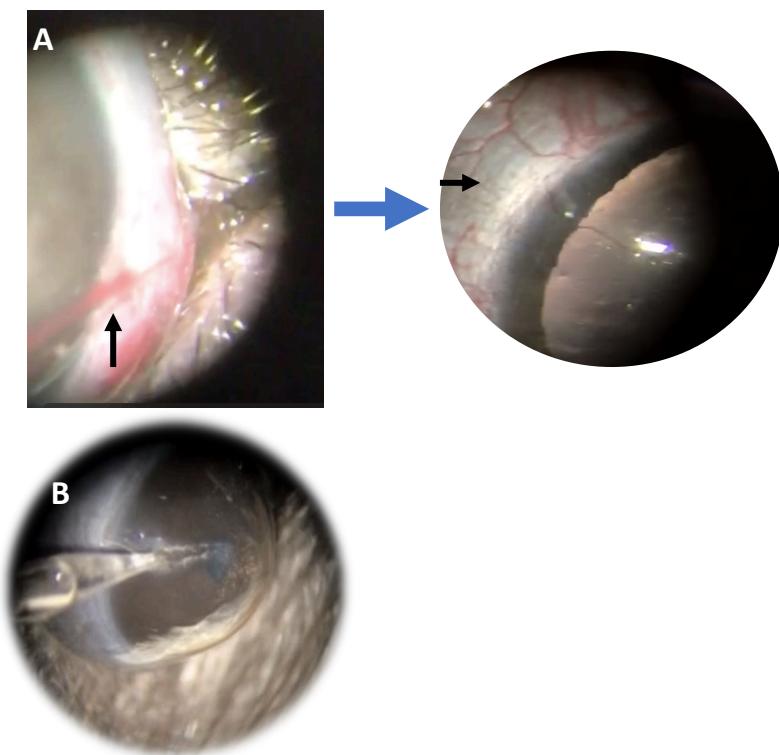
1. **Modelo EPI:** Se realizó en 23 ratas (9 M / 14 H). El método consistió en realizar la esclerosis de las venas episclerales según Morrison et al describieron ([\(59\)](#)). Las inyecciones episclerales se realizaron bisemanalmente si la PIO seguía siendo < 20 mmHg.
2. **Modelo Ms20/10:** Se realizó en 23 ratas (9 M / 14 H). El método consistió en inyectar 2 microlitros de una suspensión de microesferas de PLGA de tamaño 20/10 en la cámara anterior del ojo derecho como citaron Rodrigo et al. ([\(109\)](#)). Las inyecciones se hicieron de forma basal y a las semanas 2,4,8,12,16 y 20 del estudio.

- Para el estudio “*Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats*” (“*Influencia del sexo en el glaucoma inducido por esteroides: estudio de 24 semanas de seguimiento en ratas*”), intervencionista longitudinal de 24 semanas de seguimiento, se utilizaron 88 ratas (38 M / 50 H) Long-Evans para inducir glaucoma crónico inducido por corticoides. La inducción de HTO se realizó utilizando dos modelos diferentes. En ambos modelos se inyectaron 2 microlitros de Ms20/10 de PLGA cargadas con dexametasona de diferente manera (**Ilustración 9B**):

1. **Modelo MMDEX:** En 43 ratas (20 M / 23 H) se inyectaron Ms 20/10 cargadas de dexametasona (10% w/v). Las inyecciones se realizaron de forma basal y en la semana 4.

2. **Modelo MMDEXAFIBRO:** En 45 ratas (18 M / 27 H) se inyectaron Ms20/10 cargadas de dexametasona y fibronectina (10% w/v). Las inyecciones se realizaron de forma basal únicamente, para tratar de producir un aumento de la PIO más progresivo y suave.

Las microesferas utilizadas en todas las cohortes estaban hechas de PLGA de acuerdo con la técnica de extracción-evaporación por solvente de emulsión de aceite en agua previamente descrita por García-Herranz et al. (110). Todas las microesferas (Ms 20/10, MS 20/10 cargadas con dexametasona y MS 20/10 cargadas con dexametasona y fibronectina) provinieron del grupo de investigación InnOftal: Innovación, Terapia y Desarrollo Farmacéutico de la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.



**Ilustración 9: A)** Esclerosis de las venas epiesclerales: en la imagen de la izquierda se observa el momento de realización de la inyección (flecha), y en la imagen de la derecha se visualiza el área blanqueada tras la esclerosis (flecha) **B)** Inyección de microesferas en cámara anterior.

## **8.2 Anestesia**

Para realizar la inyección de Ms en la cámara anterior del ojo derecho, las ratas se anestesiaron con una mascarilla para ratas con una mezcla de gas sevoflurano al 3% con oxígeno al 1,5%; así como para la medición de la PIO, que siempre fue menor de 3 minutos como está recomendado (113). Para realizar el ERG y el OCT, así como para inducir HTO por esclerosis de las venas epiesclerales, se anestesió a los animales con una inyección intraperitoneal de 60 mg/Kg de Ketamina + 0,25 mg/kg de Dexmedetomidina y se les puso de forma tópica en los ojos gotas de tetracaína 1mg/ml + oxibuprocaína 4 mg/ml (Anestésico doble Colirccusi®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain).

## **8.3 Procedimiento inductor de glaucoma**

Durante los procedimientos los animales tuvieron de forma constante control térmico con mantas calientes, y después del procedimiento se dejó que los animales se recuperasen en un ambiente con temperatura controlada y enriquecido con oxígeno al 2,5%. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo condiciones de asepsia. Se inyectó siempre el ojo derecho de la rata, bien en las venas epiesclerales, bien en córnea evitando dañar el iris utilizando una jeringa micrometrada (Hamilton®) y micropipetas de cristal. Después de los procedimientos quirúrgicos (esclerosis venas epiesclerales e inyección de Ms en cámara anterior), además, se colocó pomada antibiótica de eritromicina 5 mg/g (Oftalmolosa Cusí® eritromicina, Alcon Cusí® SA, Barcelona, España) en el ojo intervenido (112).

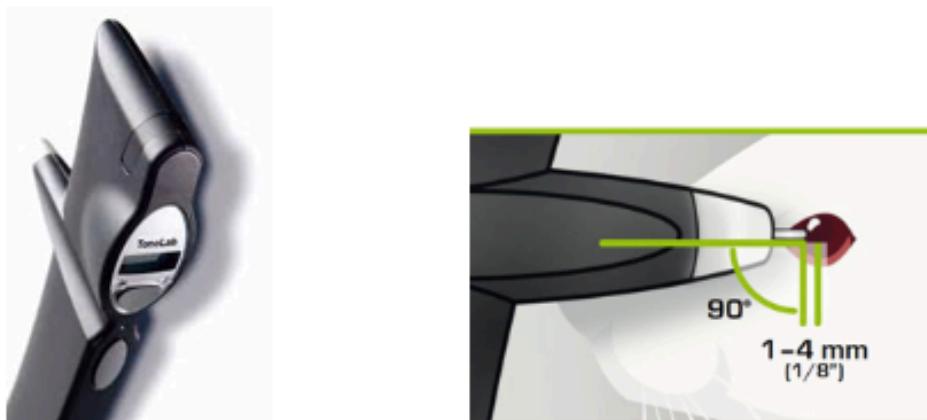
## **8.4 Protocolo exploratorio**

### **8.4.1 Control de la presión intraocular (PIO)**

La secuencia de exploración fue la siguiente: medición de la PIO, adaptación a la oscuridad de las ratas durante una noche entera y al día siguiente por la mañana realización del ERG seguido del OCT y sacrificio, en determinados casos. De esta manera se intentó reducir la manipulación de los animales.

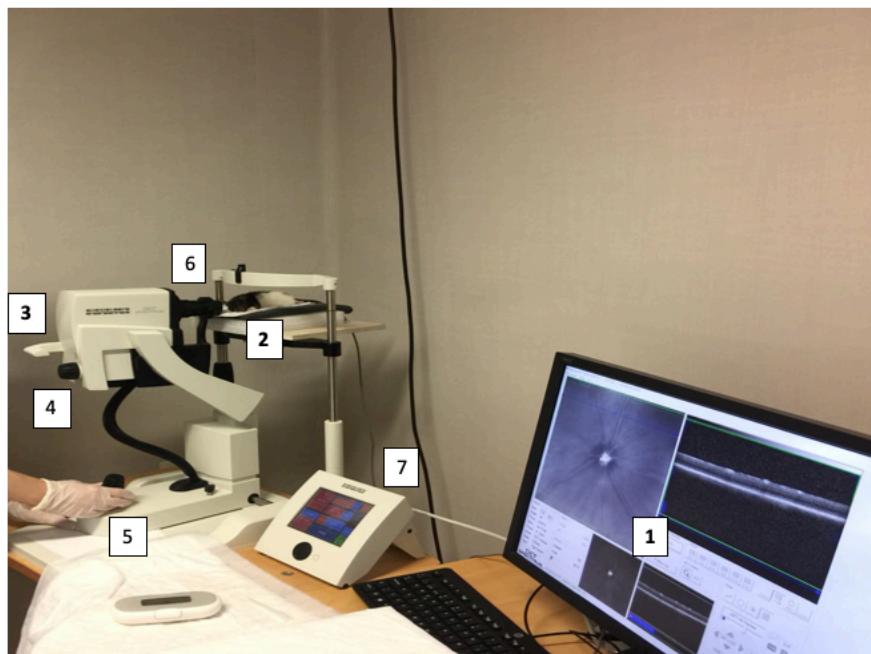
Para el control de PIO se utilizó el tonómetro de rebote Tonolab® (Tonolab, TyolatOy Helsinki, Helsinki, Finlandia). Las mediciones se realizaron en el centro de la córnea (ver **ilustración 10**) con un total de 18 mediciones consecutivas (se realizaban 3 mediciones en las que cada medición calculaba la media de 6 mediciones). El valor medio de estas mediciones se registró como resultado final. Siempre se medía la PIO de ambos ojos, empezando por el ojo derecho. En nuestro trabajo realizamos una medición de PIO semanal de todas las ratas de todas las cohortes de los diferentes estudios longitudinales. La medición de la PIO se realizó por las mañanas para evitar el patrón de fluctuación por el ritmo circadiano ([114](#)) , sobre la misma hora.

Para el estudio “*Influence of Chronic ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models*” (“*Influencia de la hipertensión ocular crónica en la emetropía: estudio refractivo, estructural y funcional en dos modelos de rata*”), se recogieron los datos medidos en la base de datos de las ratas de nuestro trabajo de las cohortes por esclerosis de venas episclerales y Ms sin carga.



**Ilustración 10:** Tonómetro Tonolab® creado por Icare Finlandia específicamente para roedores (ratas y ratones).

#### 8.4.2 Tomografía de coherencia óptica (OCT)



**Ilustración 11:** Tomografía de coherencia óptica (OCT) Spectralis, Ingeniería Heidelberg para animales. 1) pantalla. 2) soporte para rata. 3) Empuñadura de la cámara 4) Botón de ajuste de enfoque. 5) Joystick. 6) Objetivo de la cámara. 7) Pupitre de mando.

Para cuantificar *in vivo* la estructura neorretiniana, se utilizó el OCT Spectralis (OCT Spectralis, Ingeniería Heidelberg®, Alemania) (**Ilustración 11**), adaptando una lente de contacto sin poder dióptrico en la córnea de la rata para conseguir adquisiciones de mejor calidad. La tomografía de coherencia óptica (OCT) fue inventada en 1991 por Huang et al. permite obtener imágenes de cortes cuasihistológicos de la retina y medir cuantitativamente *in vivo* su espesor. El principio físico que explica el mecanismo de acción de la OCT es la interferometría de baja coherencia, que utiliza fuentes de luz de banda ancha de baja energía. En la OCT se emiten dos rayos de luz: un rayo de muestra (que contiene el objeto de interés) y un rayo de referencia (habitualmente un espejo). La combinación de la luz reflejada del rayo de muestra y la luz del rayo de la referencia da lugar a un patrón de interferencia. Explorando el espejo en el rayo de referencia, puede obtenerse el perfil de reflectividad de la muestra. Las áreas de la muestra que reflejan mucha luz crean mayor interferencia que las áreas que no lo hacen y cualquier luz que esté fuera de la corta longitud de coherencia no interfiere (**Ilustración 12**). Con todo ello se genera una imagen final con una escala de colores donde las zonas de alta

reflectividad, que corresponden a áreas de bloqueo parcial o total al paso de la luz (sangre, fibrosis...), se muestran en tonos más blancos o hiperreflectantes mientras que las imágenes de zonas de baja reflectividad, que implican baja o nula resistencia al paso de la luz (quistes, edema...), se muestran en el espectro gris-negro.

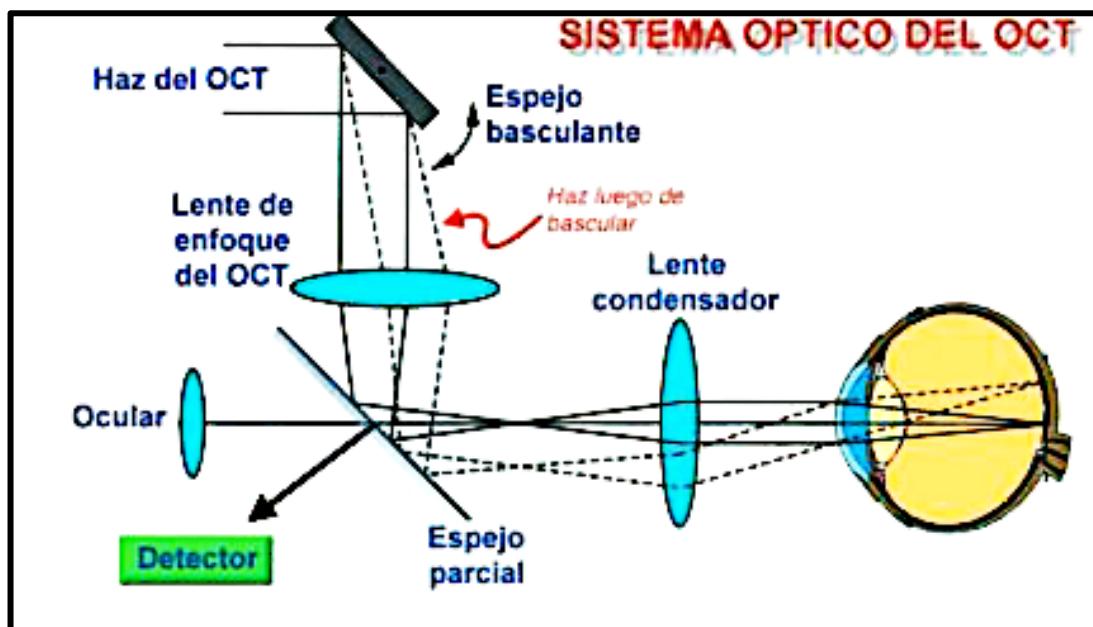


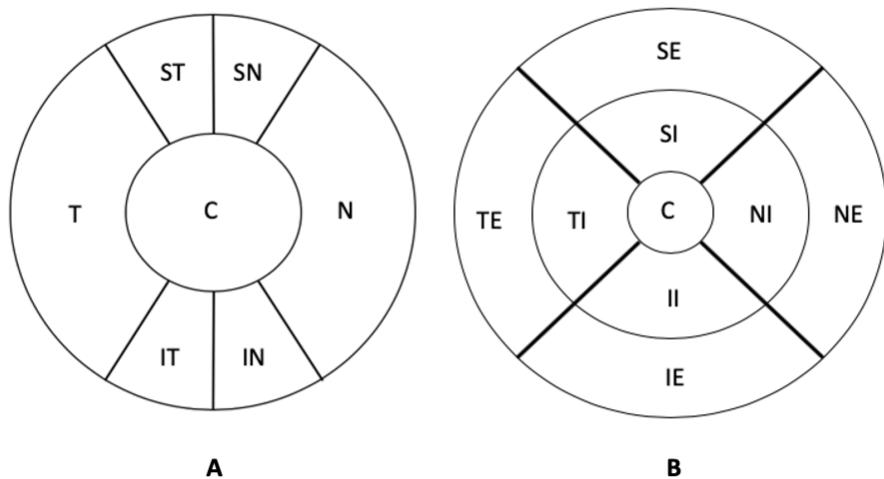
Ilustración 12: Ejemplo de sistema de tomografía de coherencia óptica (115).

Para explorar a las ratas en estos estudios, se utilizaron los protocolos de retina polo posterior (R); capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR o RNFL: del inglés *Retina Nerve Fiber Layer*) y capa de células ganglionares (CCG o GCL: del inglés *Ganglion Cell Layer*); todos ellos centrados en el disco óptico, ya que la rata no tiene fóvea. Las subsiguientes exploraciones se realizaron en la misma localización de la basal gracias al software de *eye-tracking* y la aplicación de seguimiento o *follow-up* del dispositivo. En caso de que el algoritmo hubiese fallado, un investigador entrenado enmascarado realizaba la corrección manual o la eliminación de las adquisiciones.

Se utilizó el protocolo de la capa CFNR para analizar el espesor comprendido entre la membrana limitante interna (MLI) hasta el límite de la CCG, dividido en 6 sectores (inferotemporal -IT-, inferonasal -IS-, superotemporal -ST-, superonasal -SN-, nasal -N- y temporal -T-).

El protocolo de retina (R) se utilizó para analizar el espesor desde la MLI hasta el epitelio pigmentario de la retina, dividido en las 9 áreas ETDRS. Las áreas ETDRS son áreas definidas en los ensayos clínicos del tratamiento de la retinopatía diabética y que posteriormente se han aceptado para toda la patología macular y del polo posterior. En el estudio “Tratamiento temprano de la retinopatía diabética” (en inglés “*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*”, ETDRS) [Retinopathy Study Report; 1985](#), se subdividió la mácula en 9 áreas definidas por 3 círculos ubicados a 1, 3 y 6 mm; estos dos últimos a su vez divididos en sectores superiores, inferiores, nasales y temporales ([116](#)). En el caso de las ratas, estas áreas incluyen un círculo central (C) centrado en el disco óptico (como se dijo anteriormente en las ratas no existe la fóvea) de 1 mm de diámetro, un círculo interno de 2 mm de diámetro que comprende los sectores inferior interno (II), superior interno (SI), nasal interno (NI) y temporal interno (TI) y un círculo externo de 3 mm de diámetro que comprende los sectores inferior externo (IE), superior externo (SE), nasal externo (NE) y temporal externo (TE). También se cuantificó el volumen total (VT).

Por último, el protocolo CCG fue utilizado para medir el espesor desde CFNR hasta el límite la capa nuclear interna en de las mismas 9 áreas ETDRS previas (**Ilustración 13**).



**Ilustración 13:** Esquema que representa la división en sectores en el ojo derecho (OD) de una rata. A) Protocolo capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR). B) Protocolo de células ganglionares de la retina (CGR) A) comprende los sectores inferotemporal (IT), inferonasal (IS), superotemporal (ST), superonasal (SN), nasal (N) y temporal (T), central (C). B) comprende los sectores inferior interno (II), superior interno (SI), nasal interno (NI) y temporal interno (TI) en el anillo interno, y en el anillo externo los sectores inferior externo (IE), superior externo (SE), nasal externo (NE) y temporal externo (TE).

Para poder obtener imágenes de buena calidad, se colocaba una lente de contacto de polymethylmethacrylate (PPMA) en la córnea de la rata de poder dióptrico neutro. Esta lente de contacto tenía un grosor de 270 µm y un diámetro de 5,2 mm (*Cantor+Nissel®*, Northamptonshire, Reino Unido). A todas las ratas de nuestros trabajos se le realizó una OCT de forma basal (es decir a las 4 semanas de vida de la rata). Los tiempos de adquisición de OCT posteriores se ajustaron en cada estudio concreto de la siguiente manera:

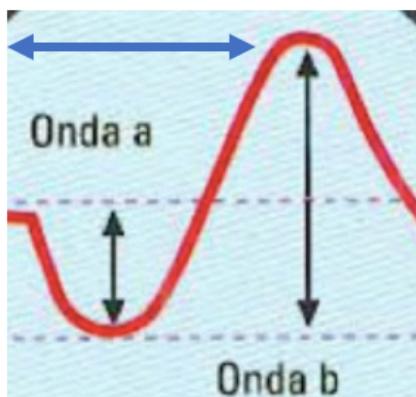
- Para el estudio “*Effect of age and sex on neurodevelopment and degeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in young and adult Long Evans rat*” (“*Efecto de la edad y el sexo en el neurodesarrollo y degeneración en el ojo sano: estudio estructural y funcional longitudinal en ratas jóvenes y adultas Long Evans*”) se realizó OCT basal (4 semanas de vida o inicio de adolescencia), semana 8 (12 semanas de vida o juventud), semana 12 (16 semanas de vida o adultez temprana) y semana 24 de estudio (28 semanas de vida o adultez media).
- Para el estudio “*Influence of Chronic ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models*” (“*Influencia de la hipertensión ocular crónica en la emetropía: estudio refractivo, estructural y funcional en dos modelos de rata*”) se utilizó el OCT para analizar el estado refractivo y la estructura de la neorretina igualmente en los tiempos de estudio basal (4 semanas de vida o inicio de adolescencia), semana 8 (12 semanas de vida o juventud), semana 12 (16 semanas de vida o adultez temprana) y semana 24 de estudio (28 semanas de vida o adultez media).

El estado refractivo se midió en dioptrías (D). Para adquirir las imágenes que permitieron objetivar el estado refractivo se utilizó el protocolo RNFL. Este protocolo es el que toma imágenes de la cabeza del nervio óptico, que es la estructura más posterior del ojo de la rata conforme va creciendo y alargándose. Para adquirir de forma nítida las imágenes de la retina se ajustó el OCT hasta enfocar la imagen en las estructuras vasculares retinianas hasta que se vieran nítidamente. De esta forma, las dioptrías obtenidas a partir de este foco que permitían visualizar nítidamente las estructuras retinianas se analizaron después como la potencia de dioptrías del globo ocular.

- Para el estudio “*Influence of Sex on Neuroretinal Degeneration: Six-Month Follow-Up in Rats With Chronic Glaucoma*” (“*Influencia del sexo en la neurodegeneración retiniana: seguimiento de seis meses en ratas con glaucoma crónico*”), el OCT se realizó de forma basal, en la semana 8 (12 semanas de vida o juventud), semana 12 (16 semanas de vida o adultez temprana), semana 18 y semana 24 de seguimiento (28 semanas de vida o adultez media).
- Para el estudio “*Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats*” (“*Influencia del sexo en el glaucoma inducido por esteroides: estudio de 24 semanas de seguimiento en ratas*”), el OCT se realizó de forma basal y en las semanas 2, 4, 6, 8 (12 semanas de vida o juventud), 12 (16 semanas de vida o adultez temprana), 18 y 24 de seguimiento (28 semanas de vida o adultez media).

#### 8.4.3 Electrorretinografía (ERG)

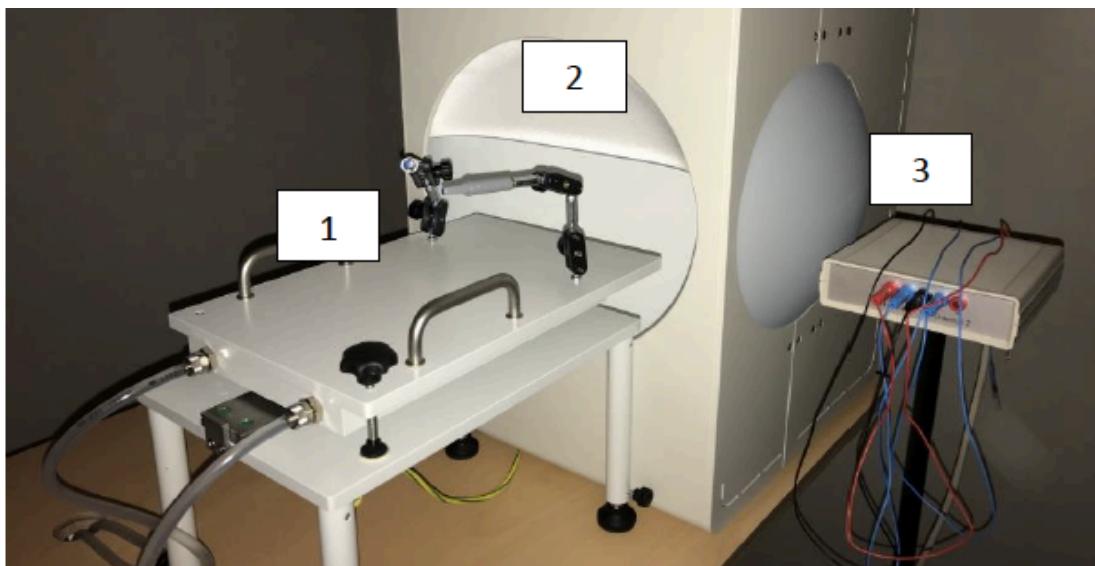
Al estimular la retina con una luz intensa se producen flujos iónicos (especialmente de sodio y potasio) que entran y salen de las células, generándose un potencial eléctrico. El ERG representa gráficamente ese potencial eléctrico. El ERG flash es un registro bifásico, en el que aparece una *onda a*, que representa la respuesta de los fotorreceptores (retina externa) y la *onda b* representa la respuesta de las células de Müller y de las células bipolares (retina interna). Podemos medir la amplitud y la latencia, siendo esta el intervalo desde que se aplica el estímulo luminoso hasta que se produce la onda. La amplitud se mide en microvoltios ( $\mu\text{V}$ ) y la latencia en milisegundos (ms) (**Ilustración 14**).



**Ilustración 14:** Ondas de electrorretinografía (ERG). Latencia (flecha azul) y amplitud de las ondas a y b (flechas negras). (Imagen adaptada de (24)).

Se utilizó la electrorretinografía (Roland consult® RETIanimal ERG, Alemania) (**Ilustración 15**) para cuantificar *in vivo* la función neurorretiniana. Se realizaron los protocolos de ERG flash escotópico para el estudio de fotorreceptores y células bipolares e intermedias y el fotópico de onda de respuesta negativa (PhNR del inglés *Photopic Negative Response*) para el análisis específico de las CGR. El ERG escotópico se realizó en condiciones de oscuridad previa adaptación de 12 horas, con dilatación pupilar máxima con instilación de colirios midriáticos (Tropicamida 10mg/ml, Fenlefrina 100mg/ml, Alcon Cusí® SA, Barcelona, España), anestésico tópico (Anestésico doble Colircusí®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, España) y lubricación ocular con hipromelosa al 2% (Methocel® OmniVision, Alemania). Los electrodos activos se colocaron sobre la córnea, los electrodos de referencia a ambos flancos, y el electrodo de tierra cerca de

su cola, en el tejido subcutáneo. Se aceptó una diferencia máxima de impedancia entre electrodos de  $2\text{k}\Omega$ . Se estimularon y analizaron ambos ojos simultáneamente con una esfera de Ganzfeld Q450 SC con flashes tipo LED como estímulo y se realizaron 7 pasos consecutivos con los siguientes incrementos de iluminación e intervalos (paso 1:  $0,0003 \text{ cds/m}^2$ ,  $0,2\text{Hz/s}$ ; paso 2:  $0,003 \text{ cds/m}^2$ ,  $0,125\text{Hz/s}$ ; paso 3:  $0,03 \text{ cds/m}^2$ ,  $8,929\text{Hz/s}$ ; paso 4:  $0,03 \text{ cds/m}^2$ ,  $0,111\text{Hz/s}$ ; paso 5:  $0,3 \text{ cds/m}^2$ ,  $0,077\text{Hz/s}$ ; paso 6:  $3,0 \text{ cds/m}^2$ ,  $0,067\text{Hz/s}$ ; y paso 7:  $3,0 \text{ cds/m}^2$ ,  $29,412\text{Hz/s}$ ) (117), (118). Los pasos 1 a 5 analizan la respuesta a un estímulo tenue en adaptación a la oscuridad, y por tanto la respuesta de los bastones. El paso 6 analiza la respuesta a un estímulo luminoso en adaptación a la oscuridad, por lo que analiza la respuesta mixta de los conos y los bastones. El paso 7 tiene potenciales oscilatorios. El protocolo PhNR se realizaba a continuación, tras una adaptación a la luz con un fondo azul ( $470 \text{ nm}$ ,  $25 \text{ cds/m}^2$ ) y se utilizó como estímulo un flash rojo tipo LED ( $625 \text{ nm}$ ,  $\text{cds/m}^2$ ). Se estudiaron la latencia y la amplitud (en microvoltios) de las ondas a, b y PhNR (108).



**Ilustración 15:** Electrorretinogramma Roland consult® RETIanimal, Alemania. 1) placa de apoyo; 2) estimulador Ganzfeld; 3) electrodos.

A todas las ratas de nuestro trabajo se les realizó un ERG en los tiempos de estudio basal (4 semanas de vida o inicio de adolescencia), 12 semanas (16 semanas de vida o adultez temprana) y 24 semanas de seguimiento (28 semanas de vida o adultez media).

#### **8.4.4 Histología**

Para el análisis histológico se sacrificaron 6 animales por tiempo de estudio, bajo condiciones de humanidad con una inyección de sodio tiopenthal (25 mg/ml) intracardíaca previa sedación anestésica intraperitoneal. Inmediatamente después se enuclean los ojos. Los globos oculares extraídos con la máxima longitud de nervio óptico posible se fijaron con formaldehído al 4% para la posterior tinción con hematoxilina-eosina con el fin de realizar conteo de las CGR y evaluar la presencia de fenómenos inflamatorios de fibrosis y/o necrosis. Además, se realizaron técnicas de tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para células ganglionares de la retina (Brn·a), entre otros. **La histología se realizó para comprobar la neurodegeneración en los modelos de glaucoma inducidos, pero no se evaluaron las diferencias por sexo, por lo que no debe ser objeto de evaluación de la presente Tesis Doctoral.**

#### **8.5 Análisis estadístico**

Los datos cualitativos y cuantitativos fueron recogidos en dos bases Excel independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Todos los análisis los realizó un investigador ciego. Previamente al análisis de los datos se comprobó su ajuste a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. A continuación, se analizó la media y desviación estándar de cada una de las variables y se compararon las diferentes variables entre casos y controles y entre machos y hembras mediante un test de T de Student o U de Mann Whitney si la distribución de las variables no se ajustaba a la normalidad y entre las diferentes cohortes mediante el test ANOVA. Todos los valores se expresaron como media ± desviación estándar (SD: del inglés *standard deviation*). Un nivel de p<0,05 fue considerado significativo para todos los análisis estadísticos. Después se realizó la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones para evitar una tasa alta de falsos positivos. El nivel de significación p<0,002 para cada variable se estableció según los cálculos de Bonferroni (expresados como #).

- En el estudio "*Effect of age and sex on neurodevelopment and degeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in young and adult Long-Evans rat*" ("Efecto de la edad y el sexo en el neurodesarrollo y degeneración en el ojo sano: estudio estructural y funcional longitudinal en ratas jóvenes y adultas Long-Evans"), se comprobó que la mayoría de los datos siguieron una distribución paramétrica utilizando el test de Kolgomorov-Smirnov, por lo que se realizó una T de Student para evaluar las diferencias entre ambos性, y una T de Student emparejada para comprobar los cambios
- En el estudio "*Influence of chronic ocular hypertension on emmetropia: Refractive, structural and functional study in two rat models*" ("Influencia de la hipertensión ocular crónica en la emetropía: estudio refractivo, estructural y funcional en dos modelos de rata"), las variables no siguieron criterios de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un análisis descriptivo de la PIO, poder dióptrico y estructura neorretiniana con OCT y función neorretiniana con ERG en las cohortes normotensivas (ONT) e hipertensivas oculares (OHT) a lo largo del seguimiento. Las comparaciones entre las cohortes ONT y OHT y entre los grupos ES y MS se hicieron con el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. Las comparaciones entre la cohorte ONT y los grupos ES y MS se realizaron con el test de ANOVA. Por último, el análisis de la correlación entre el estado refractivo del ojo (separando cada cohorte en dos subgrupos, dependiendo de su principal valor refractivo), con la edad (semanas), el espesor en el OCT (R, GCL y RNFL) y con los parámetros de ERG se hizo con el coeficiente de correlación de Spearman y con un análisis de regresión logística.
- En el estudio "*Influence of sex on neuroretinal degeneration: Six-month Follow-up in rats with chronic glaucoma*" ("Influencia del sexo en la neurodegeneración retiniana: seguimiento de 6 meses en ratas con glaucoma crónico"), la mayoría de los datos siguieron una distribución no paramétrica, por lo que se realizó el test de la U de Mann-Whitney para ver las diferencias entre ambas cohortes y el test de Wilcoxon emparejado para comparar los cambios registrados en cada ojo a lo largo de las 24 semanas de seguimiento.

- Para el estudio “*Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats*” (“*Influencia del sexo en el glaucoma inducido por esteroid: estudio de 24 semanas de seguimiento en ratas*”), los datos siguieron una distribución paramétrica en el test de Kolmogorov-Smirnov. Por tanto, para evaluar las diferencias entre ambas cohortes de machos y hembras se utilizó la T de Student.

## **8.6 Planificación temporal**

La duración de este trabajo fue de 5 años. El trabajo de campo con los animales en las instalaciones del CIBA comenzó en 2018 y finalizó en 2020. Simultáneamente y en paralelo con el trabajo experimental de las distintas cohortes consecutivas (animales sanos, cohorte con glaucoma inducido por esclerosis de venas episclerales, cohorte con glaucoma inducido mediante inyección en cámara anterior de Ms20/10 sin carga, cohorte con glaucoma inducido mediante inyección en cámara anterior de Ms20/10 con carga de dexametasona, cohorte con glaucoma inducido mediante inyección en cámara anterior de Ms20/10 con carga de dexametasona y fibronectina) se realizaron los análisis de los datos obtenidos en el trabajo de campo, la redacción de los artículos y se procedió a la tarea de difusión y publicación de los 4 artículos que forman parte de esta Tesis Doctoral expuestos en el apartado *Resultados*.

- El estudio “*Effect of age and sex on neurodevelopment and degeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in young and adult Long-Evans rat*” (“*Efecto de la edad y el sexo en el neurodesarrollo y degeneración en el ojo sano: estudio estructural y funcional longitudinal en ratas jóvenes y adultas Long-Evans*”) se publicó en la revista Experimental Eye Research (JCR-Q1. Factor de impacto [JCR 2019]: 3,011) el día 31 de agosto de 2020.

- El estudio “*Influence of chronic ocular hypertension on emmetropia: Refractive, structural and functional study in two rat models*” (“*Influencia de la hipertensión ocular crónica en la emetropía: estudio refractivo, estructural y funcional*

*en dos modelos de rata")* se publicó en la revista Journal of Clinical Medicine (JCR- Q1. Factor de impacto [JCR 2020]: 4,242) el día 20 de agosto de 2021.

- El estudio "*Influence of sex on neuroretinal degeneration: Six-month follow-up in rats with chronic glaucoma*" ("*Influencia del sexo en la neurodegeneración retiniana: seguimiento de 6 meses en ratas con glaucoma crónico*") se publicó en la revista Investigative Ophthalmology & Vision Science (JCR- Q1. Factor de impacto [JCR 2020]: 4,799) el día 4 de octubre de 2021.

- El estudio "*Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats*" ("*Influencia del sexo en el glaucoma inducido por esteroid: estudio de 24 semanas de seguimiento en ratas*"), se publicó en la revista EER (Experimental Eye Research), (JCR-Q2. Factor de impacto [JCR 2022]: 3,4) el día 28 de noviembre de 2023.

## **9. RESULTADOS**

9.1 **ARTÍCULO 1:** Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat.

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Luna C, Pablo LE, Polo V, Garcia-Martin E.*

*Exp Eye Res.* 2020;200:108208.

DOI: 10.1016/j.exer.2020.108208

ISSN: 0014-4835

PMID: 32882213

Factor de impacto (JCR 2019):3,011.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2019: 12/60  
(Cuartil 1)



## Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat

Maria Jesus Rodrigo <sup>a,b,\*</sup>, Teresa Martinez-Rincon <sup>a</sup>, Manuel Subias <sup>a</sup>, Silvia Mendez-Martinez <sup>a</sup>, Coral Luna <sup>a</sup>, Luis Emilio Pablo <sup>a,b</sup>, Vicente Polo <sup>a</sup>, Elena Garcia-Martin <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Miguel Servet Ophthalmology Research Group (GIMSO), Aragon Health Research Institute (IIS Aragon), University of Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> RETICS: Thematic Networks for Co-operative Research in Health for Ocular Diseases, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sex  
Retina  
Neurodevelopment  
Neurodegeneration  
Aging  
Optical coherence tomography  
Electroretinography

### ABSTRACT

The processes involved in neurodevelopment and aging have not yet been fully discovered. This is especially challenging in premorbid or borderline situations of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or glaucoma. The retina, as part of the central nervous system, can be considered the easiest and most accessible neural structure that can be analyzed using non-invasive methods. Animal studies of neuroretinal tissue in situations of health and under controlled conditions allow the earliest sex- and aging-induced changes to be analyzed so as to differentiate them from the first signs occurring in manifested disease. This study evaluates differences by age and sex based on intraocular pressure (IOP) and neuroretinal function and structure in healthy young and adult rats before decline due to senescence. For this purpose, eighty-five healthy Long-Evans rats (31 males and 54 females) were analyzed in this 6-month longitudinal study running from childhood to adulthood. IOP was measured by tonometer (Tonolab; Tirolat Oy Helsinki, Finland), neuroretinal function was recorded by flash scotopic and light-adapted photopic negative response electroretinography (ERG) (Roland consult® RETIanimal ERG, Germany) at 4, 16 and 28 weeks of age; and structure was evaluated by *in vivo* optical coherence tomography (OCT) (Spectralis, Heidelberg® Engineering, Germany). Analyzing both sexes together, IOP was below 20 mmHg throughout the study; retina (R), retinal nerve fiber layer (RNFL) and ganglion cell layer (GCL) thicknesses measured by OCT decreased over time; an increase in ERG signal was recorded at week 16; and no differences were found between right and left eyes. However, analyzing differences by sex revealed that males had higher IOP (even reaching ocular hypertension [ $>20$  mmHg] by the end of the study [7 months of age]), exhibited greater neuroretinal thickness but higher structural percentage loss, and had worse dark- and light-adapted function as measured by ERG than females. This study concludes that age and sex influenced neurodevelopment and neurodegeneration. Different structural and functional degenerative patterns were observed by sex; these occurred earlier and more intensely in males than in age-matched females.

### 1. Introduction

The processes involved in neurodevelopment and aging have not yet been fully discovered. There is literature evidence that the effects of sex hormones during growth periods of life could influence behavioral features or even trigger neuropsychiatric diseases in adulthood (Herting and Sowell, 2017). Meanwhile, normal functional decline in senescence due to the accumulation of multifactorial degenerative processes over time is often difficult to differentiate from early stages of disease. This is

especially challenging in premorbid situations, such as occurs when patients suffer from subjective cognitive impairment (versus Alzheimer's disease), or in borderline situations of other neurodegenerative diseases (Rajan et al., 2015). In this regard, a rat animal model for the study of Parkinson's disease found alterations in the retina that preceded the brain damage characteristic of this pathology (Normando et al., 2016). Animal studies in situations of health and under controlled conditions allow the earliest aging-induced changes to be analyzed so as to differentiate them from the first signs occurring in manifested disease.

\* Corresponding author. C/ Padre Arrupe, Servicio de Oftalmología, Edificio de consultas externas, planta 1, 50009, Zaragoza, Spain.  
E-mail address: [marijesusrodrigo@hotmail.es](mailto:marijesusrodrigo@hotmail.es) (M.J. Rodrigo).

The retina, as part of the central nervous system, can be considered the easiest and most accessible neural structure that can be analyzed using non-invasive methods, such as optical coherence tomography (OCT) (Yap et al., 2018). For the study of neurodevelopment and neurodegeneration, the rat retina has been considered a good model because the retina is immature at birth and undergoes a process of neurodevelopment and modulation to reach maturity. The process of histological and functional retinal maturation involves an expansion of the retinal area and a decrease in retinal thickness up to months 2–3 of postnatal life (Weisse, 1995). Greatest nuclei density loss occurs from 3 to 8 weeks in the outer and inner nuclear layers. This results in a decrease in retinal ganglion cells (RGCs) and photoreceptors (mainly cones) associated with retina growth (Nadal Nicolás et al., 2018). Furthermore, a dynamic increase in microglia seems to regulate RGC and photoreceptor density during this period of retina development. Microglia is also important in maintaining synapsis in the adult retina (Wang et al., 2016). Although greater retinal and retinal nerve fiber layer (RNFL) thicknesses were detected with OCT at 2 months, measurements were statistically significantly lower at 6 months and there was significant thinning in the inner and outer plexiform layers at 15 and 22 months, respectively (Nadal Nicolás et al., 2018). These structural changes were accompanied by biphasic retinal function. Peak retinal function, as indicated by higher amplitudes and shorter implicit times in the electroretinogram (ERG), was observed at 2 months (Nadal Nicolás et al., 2018). Similar functional peaks were measured in the inner retina at 7 weeks (Sandalon and Ofri, 2012) and at 11 weeks (Ben-Shlomo and Ofri, 2006), followed by synapsis maturity (maintained up to 23–30 weeks) and subsequent decline. All this evidence suggests that development occurs until the second or third month, after which neurodegeneration begins. This is why studies of aging usually take this time as the baseline when analyzing progressive decline with aging until senescence (Nadal-Nicolás et al., 2018). However, different studies disagree on other age-related changes occurring in the retina, such as whether there is a loss of RGCs and/or a decrease in retinal volume (Calkins, 2013) or not (Feng et al., 2007). There are also different findings as regards the beginning of degeneration, with these ranging between 12 and 22 months of age (DiLoreto et al., 1994 and Nadal-Nicolás et al., 2018, respectively), corresponding to 22–60 in human years (Quinn, 2005; Sengupta, 2013).

In addition to age, elevated intraocular pressure (IOP) is an important and well-known risk factor in the onset and progression of neuro-retinal degeneration (Jonas et al., 2017). Recently, an increasing number of research groups have demonstrated the protective role of estrogens on the neuroretina. Therefore, there is now demand for study of the influence of sex on neurodegenerative and/or ophthalmological diseases (Cascio et al., 2015).

The expression of retinal genes linked to age (especially fibroblasts, RGCs and microglia) has shown a sex-dependent influence (Du et al., 2017). For instance, receptors to the sex steroid hormones were found in the eye (Wickham et al., 2000), the retina synthesizes estrogens (Salyer et al., 2000; Cascio et al., 2007), and estrogens have been shown to exert a protective effect on the eye from both a functional (lower IOP measurements, better vascularization of the optic nerve, and higher signals recorded by ERG (Chaychi et al., 2015) and automated perimetry) and structural perspective (neuroprotection in photoreceptors and RGCs (Pietrucha-Dutczak et al., 2018) Nuzzi et al., 2018; Nuzzi et al., 2019). Moreover, some studies also found greater mitochondrial (Tower, 2017) and oxidative damage (Tenkorang et al., 2018) with age in males.

This study explores the changes occurring in the neuroretina of healthy young and adult Long-Evans rats and the differences in them by sex, analyzed by functional and structural examinations, with the aim of evaluating the differences in the physiological neurodegeneration that occurs by age and sex prior to the known and evident decline in senescence.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

All animal care and experimental procedures were performed in strict accordance with EU Directive 2010/63/EU on animal experiments, in the Biomedical Research Center of Aragon (CIBA) and approved by the Ethics Committee for Animal Research (PI34/17).

Long-Evans rats at 4 weeks of age (WOA) (1 month [puberty onset]), 12 WOA (3 months [youth]), 16 WOA (4 months [early adulthood]) and 28 WOA (7 months [adult middle age]), and weighing from 50 to 100 g at the beginning of the study, were housed in standard cages, separated by sexes, with environmental enrichment, water and food *ad libitum* and were maintained under animal welfare conditions such as 12-h dark/light cycles at a temperature of 22 °C and a relative humidity of 55%.

A total of 85 healthy animals (31 males [M] and 54 females [F]) were analyzed.

### 2.2. Anesthesia and body weight

Body weight was periodically measured to calculate anesthesia dosage. To measure intraocular pressure, the animals were gas-anesthetized with a sedative mixture of 3% sevoflurane gas and 1.5% oxygen for less than 3 min as recommended (Ding et al., 2011) and using a mouth-nose mask. To perform the ERG and OCT, the animals were anesthetized by an intraperitoneal injection (IP) with a mixture of 60 mg/kg of Ketamine + 0.25 mg/kg of Dexmedetomidine and topical eye drops with tetracaine 1 mg/ml + oxibuprofene 4 mg/ml (Anestesico doble Colirrus®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain).

### 2.3. Intraocular pressure measurement

IOP was measured using the Tonolab® tonometer in the morning to avoid the fluctuation pattern due to the circadian cycle (Lozano et al., 2015). The values of three consecutive measurements were recorded, each measurement being the average of 6 rebounds, making a total of 18. Both right and left eyes were measured (always measuring the right eye first) and sexes were randomly selected. After the procedures, the animals were left to recover in an enriched 2.5% oxygen atmosphere at a controlled temperature.

### 2.4. In vivo electroretinography

Electroretinography technology (Roland consult® RETIanimal ERG, Germany) was used to quantify neuroretinal function under the scotopic full field ERG and light-adapted Photopic Negative Response (PhNR) protocols. The scotopic ERG test was performed after 12 h of dark adaptation and the eyes were prepared under red light to full dilatation using topical eye drops (previously mentioned), mydriatics (Tropicamide 10 mg/ml, Phenylephrine 100 mg/ml, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain), and hyromellose 2% (Methocel® OmniVision, Germany) for eye lubrication. Active electrodes were placed on the cornea, references were placed at both sides under the skin and the ground electrode was placed near the tail. Electrode impedance was accepted with a difference of <2 KΩ between electrodes. Both eyes were simultaneously tested (as Ross et al., 2018 recommend) using a Ganzfeld Q450 SC sphere with white LED flashes for stimuli and multisteps (Umeya et al., 2019) with increasing intensity of luminance and intervals (response to dim stimulus in dark adaptation, which evaluates rod response; step 1: 40 dB, 0.0003 cd/m<sup>2</sup>, 0.2 Hz [20 recordings averaged]; step 2: 30 dB, 0.003 cd/m<sup>2</sup>, 0.125 Hz [18 recordings averaged]; step 3: 20 dB, 0.03 cd/m<sup>2</sup>, 8.929 Hz [14 recordings averaged]; step 4: 20 dB, 0.03 cd/m<sup>2</sup>, 0.111 Hz [15 recordings averaged]; step 5: 10 dB, 0.3 cd/m<sup>2</sup>, 0.077 Hz [15 recordings averaged]; response to bright stimulus in dark adaptation, which analyses mixed rod-cone response; step 6: 0 dB, 3.0 cd/m<sup>2</sup>, 0.067 Hz [12 recordings averaged]; and oscillatory potentials; step 7: 0 dB, 3.0

$\text{cd/m}^2$ , 29.412 Hz [10 recordings averaged]). The PhNR protocol was performed after light adaptation to a blue background (470 nm, 25  $\text{cd/m}^2$ ), and a red LED flash (625 nm, -10 dB, 0.30  $\text{cd/m}^2$ , 1.199 Hz [20 recordings averaged]) was used as the stimulus. Latency (in milliseconds) and amplitude (in microvolts) were studied in a, b and PhNR waves.

### 2.5. In vivo optical coherence tomography

Optical coherence tomography (OCT Spectralis, Heidelberg® Engineering, Germany) was used to quantify the neuroretinal structure *in vivo*, using a contact lens adapted to the rat's cornea in order to obtain higher quality images. The protocols used were as follows: Retina posterior pole (R), Retinal Nerve Fiber Layer (RNFL) and Ganglion Cell Layer (GCL). All of them measured a 3-mm-diameter area centered on the optic disc using 61 b-scans with the eye-tracking software and segmentation application. The retina posterior pole protocol analyzed the thickness from the inner limiting membrane to the retinal pigment epithelium, divided into the 9 ETDRS areas (ETDRS Research Group Investigators, Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1985), which included a central (C) 1-mm circle centered on the optic disc, and inner (inferior: II; superior: IS; nasal: IN; temporal: IT) and outer (inferior: OI; superior: OS; nasal: ON; temporal: OT) rings measuring 2 and 3 mm in diameter, respectively, as well as total volume (TV). The RNFL protocol analyzed the thickness from the inner limiting membrane to the GCL boundaries divided into 6 sectors (inferotemporal: IT; inferonasal: IN; superotemporal: ST; superonasal: SN; nasal: N; and temporal: T) and the GCL protocol analyzed from the RNFL to the inner nuclear layer boundaries within the same ETDRS areas.

The sequence of examinations was as follows: IOP measurements, overnight dark-adaptation and, the following morning, ERG test followed by OCT acquisitions with the aim of reducing animal handling.

IOP was measured weekly, ERG at 4 (baseline evaluation), 16 and 28 WOA, OCT at 4 (baseline evaluation), 12, 16, 28 WOA with controlled temperature. A trained, masked researcher rejected or manually corrected the acquisitions if the algorithm had clearly failed.

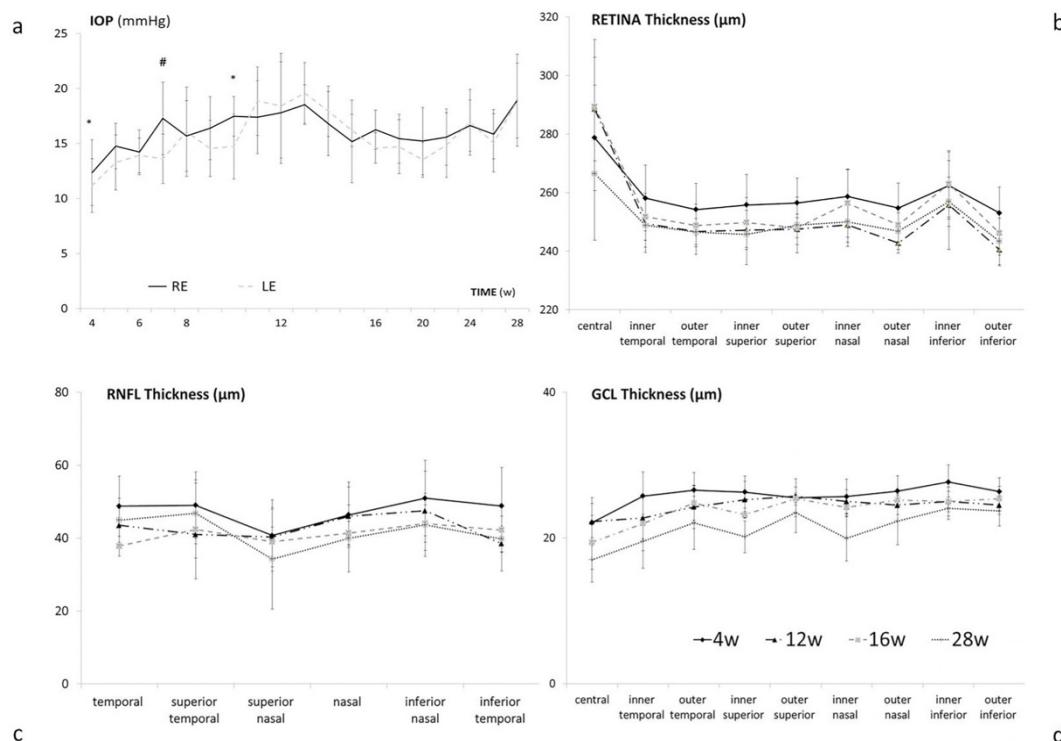
### 2.6. Statistical analysis

Data from this study were recorded in an Excel database and statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). To assess sample distribution, the Kolmogorov-Smirnov test was used. However, given the parametric distribution of most of the data, the Student T test was performed to evaluate the differences between both sexes and eyes, and a paired Student T test was performed to compare the changes recorded in each eye over time. Ability of electrophysiological testing to predict neurodegeneration (considered when there is thinning of the neuro-retina measured by OCT) was analyzed by area under ROC curves (AUC). All values were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Values of  $p < 0.05$  (expressed as \*) were considered to indicate statistical significance, and the Bonferroni correction for multiple comparisons was calculated to avoid a high false-positive rate. The level of significance for each variable was established based on Bonferroni calculations (expressed as #).

## 3. Results

### 3.1. Intraocular pressure

A progressive increase in IOP was similarly observed in both eyes over the study and ocular hypertensive (OHT) values over 20 mmHg were never reached (when both sexes were analyzed together) (Fig. 1a). However, when sexes were compared, young and adult male rats exhibited statistically significant ( $p < 0.05$ ) higher IOP levels than



**Fig. 1.** Intraocular pressure and neuroretinal thickness in healthy rat eyes up to 28 WOA, analyzing both sexes together a: IOP curve. Abbreviations: RE: right eye; LE: left eye; w: week; \*: statistical significance  $p < 0.05$ ; #: statistical significance  $p < 0.020$ , for Bonferroni correction for multiple comparisons. b: Retinal thickness by OCT sector; thickness in microns ( $\mu\text{m}$ ). c: RNFL thickness by OCT sector. d: GCL thickness by OCT sector.

females, and males even reached statistically significant OHT at 28 WOA (Fig. 2a).

### 3.2. Neuroretinal structure by *in vivo* OCT

- Entire group of male and female rats: Both eyes of each rat showed a progressive decrease in thickness in R, RNFL and GCL over time (from 4 to 28 WOA), as well as in total volume in R ( $1.83 \pm 0.06$  to  $1.74 \pm 0.05$   $\mu\text{m}$ ) and GCL ( $0.18 \pm 0.00$  to  $0.14 \pm 0.01$   $\mu\text{m}$ , respectively), with no statistical differences between eyes (see Table A1). Explorations at the two in-between ages (12 and 16 WOA) revealed dynamic fluctuations in thickness. A similar thickness was measured in the inner and outer R sectors at 4 WOA, though the outer sectors decreased more in thickness over time. A mild double hump was observed in RNFL with the superior nasal sector being the thinnest sector, while the inner superior and inner nasal sectors in GCL exhibited the lowest thicknesses at 28 WOA (Fig. 1 b, c, d).

- Differences by sex: Males showed significantly greater thicknesses compared with females ( $p < 0.05$ ) in the three neuroretinal parameters from 4 WOA; but these differences diminished over rat development. However, young and adult males exhibited a greater percentage loss than females on average, both by sector and in total volume. In addition, RNFL and GCL were the neuroretinal parameters that showed greatest loss (Figs. 2c and 3).

The perceptual loss of OCT thickness in each sector was also analyzed to identify a sex-dependent neuroretinal degeneration pattern. Both sexes more frequently exhibited a higher percentage loss in the outer R sectors, as well as the same loss trend in RNFL ( $I > S > T > N$ ). Furthermore, females showed a similar loss pattern by sector in contiguity in RNFL and a similar pattern between R and GCL. In males, the temporal and nasal sectors of the GCL were the most affected (Fig. 4).

**Table 1**

**Neuroretinal loss rate measured by OCT by sex in healthy young and adult Long-Evans rats.** Abbreviations: WOA: weeks of age; RNFL: retinal nerve fiber layer; GCL: ganglion cell layer complex; M: male; F: female; RE: right eye.

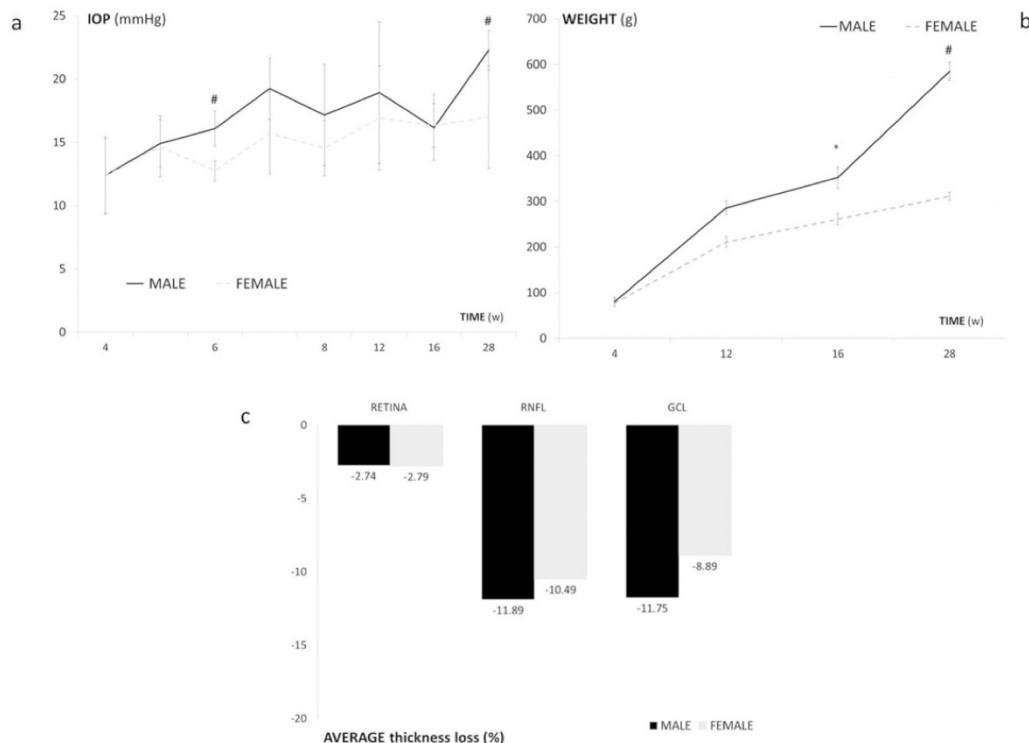
TIME	HEALTHY ALL SECTORS AVERAGE LOSS RATE ( $\mu\text{m}/\text{mmHg/day}$ ) RE					
	RETINA		RNFL		GCL	
	M	F	M	F	M	F
12 WOA	-0.025	-0.025	-0.011	-0.020	-0.006	-0.003
16 WOA	-0.009	-0.011	-0.019	-0.019	-0.005	-0.006
28 WOA	-0.005	-0.013	-0.004	-0.006	-0.003	-0.004
AVERAGE	-0.013	-0.016	-0.011	-0.015	-0.005	-0.004

In order to standardize the neuroretinal loss, the right-eye loss rate per day and mmHg of increased IOP each week were calculated and expressed in  $\mu\text{m}/\text{mmHg/day}$  from the average of all OCT sectors. Rats experienced the highest loss rate in R up to 16 WOA and then changed to the RNFL parameter; and females showed higher loss rate levels. Furthermore, young and adult rats (both sexes) experienced a similar and sustained negative loss rate in GCL (Table 1).

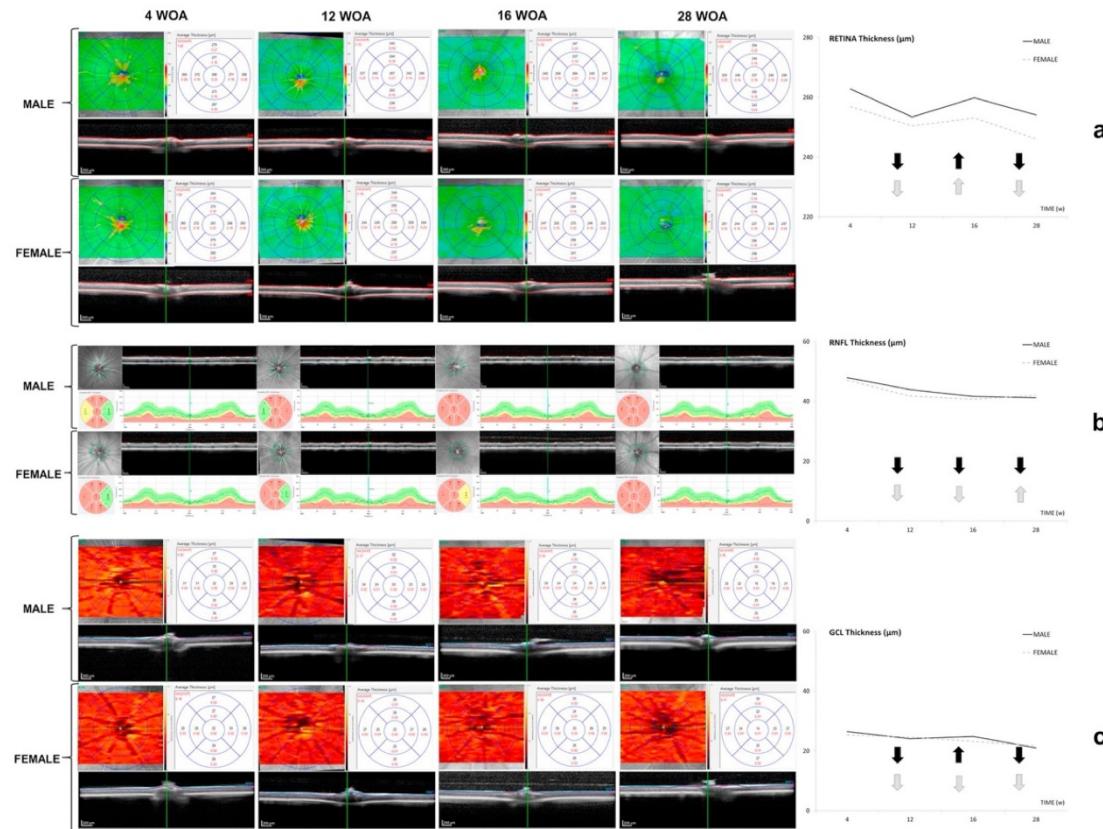
### 3.3. Neuroretinal function by *in vivo* ERG

- Entire group of male and female rats: Mild progressive increases in amplitude (*b*-wave) were measured in the scotopic signal in rats with rod-cone light stimulation, and latency also increased from 4 to 28 WOA. However, the peak signal measured in right eyes with the lowest stimuli (DA 0.0003 cd/m<sup>2</sup>) and PhNR coincided with 4 WOA before declining (see Table A2).

- Differences by sex: Males showed a slight increase in scotopic *b*-wave amplitude (DA 0.003 and 0.03 cd/m<sup>2</sup>) but a decrease with the highest flash intensity available (DA 3.0 cd/m<sup>2</sup>); *b*-wave latency



**Fig. 2. Differences in a: IOP curve, b: body weight curve and c: neuroretinal structure (averaged thickness percentage loss (from baseline) in the neuroretinal parameters) by sex in healthy rat eyes up to 28 WOA.** Abbreviations: w: week; \*: statistical significance  $p < 0.05$ ; #: statistical significance  $p < 0.020$ , for Bonferroni correction for multiple comparisons, (%): percentage.



**Fig. 3.** OCT follow-up by sex a: retina, b: RNFL and c: GCL thickness by OCT from all sectors averaged; thickness in microns ( $\mu\text{m}$ ); upwards arrows: increase in thickness; downwards arrows: decrease in thickness; WOA: weeks of age.

increased with time with every stimuli explored (DA 0.0003–3.0  $\text{cd}/\text{m}^2$ ). However, *a*-wave amplitude, mainly obtained from mixed rod-cone response (DA 3.0  $\text{cd}/\text{m}^2$ ), tended to decrease and latency remained stable. In females, scotopic signal (*b*-wave amplitude) progressively increased and latency remained stable up to the end of the study (28 weeks). Moreover, females showed higher values than age-matched males throughout the follow-up and reached statistical significance at 28 WOA (Fig. 5, Table A3).

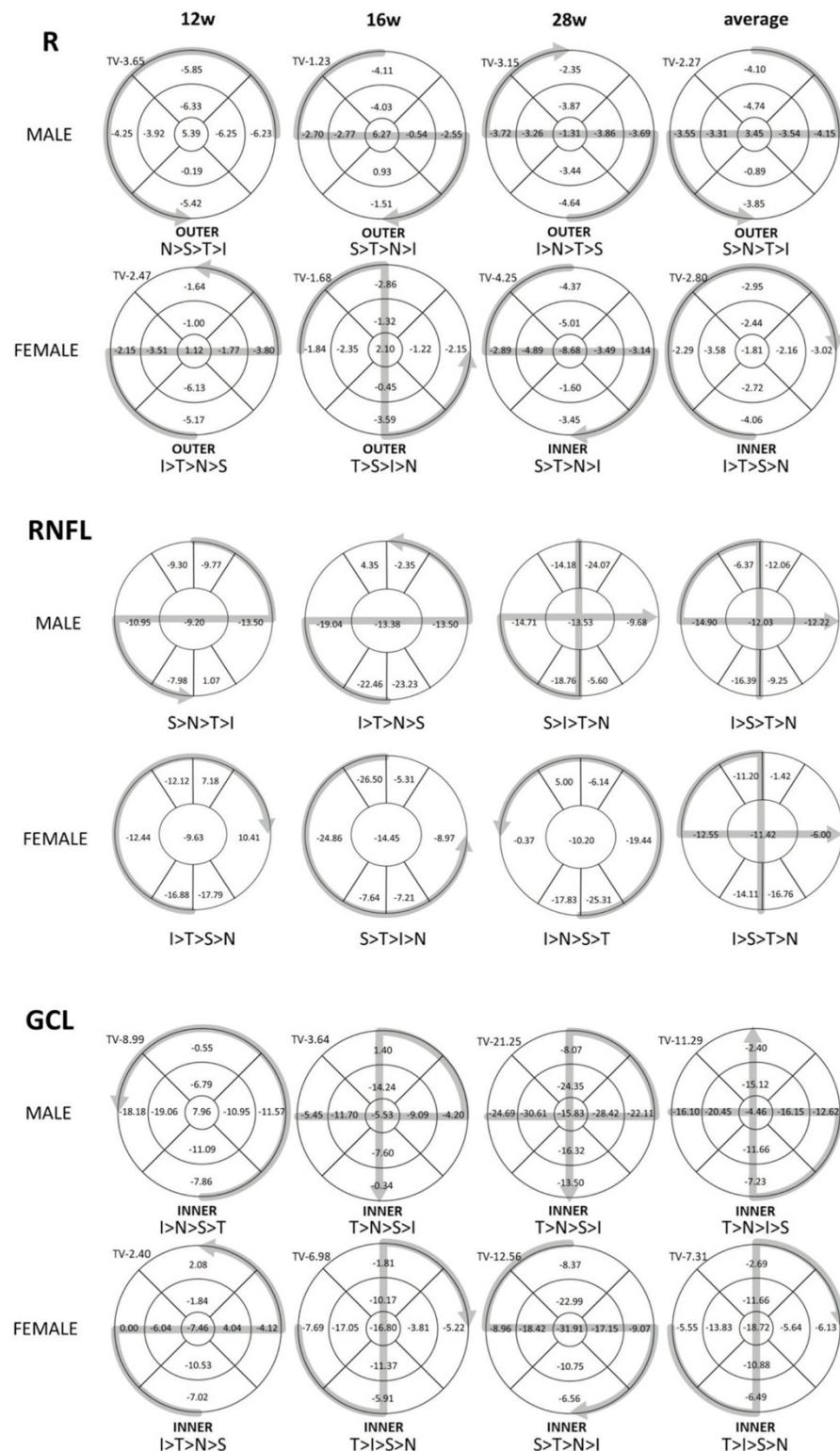
#### 3.4. Prediction of early neurodegeneration

Table 2 shows the highest AUC values to predict early neurodegeneration (complete group of male and female rats) detected from ERG and OCT variables. Neurodegeneration is considered to exist if two or more OCT parameters show less than average thickness at each point in time. The OCT parameters chosen as affected in neurodegeneration were macular thickness (central: < 282, <289, <263 microns), RNFL thickness (global: < 48, <40, <41 microns), and GCL thickness (central: < 22, <20, <16 microns; inner nasal: < 26, <23, <19 microns; and inner temporal: < 26, <22, <19 microns) at 4, 16 and 28 WOA, respectively.

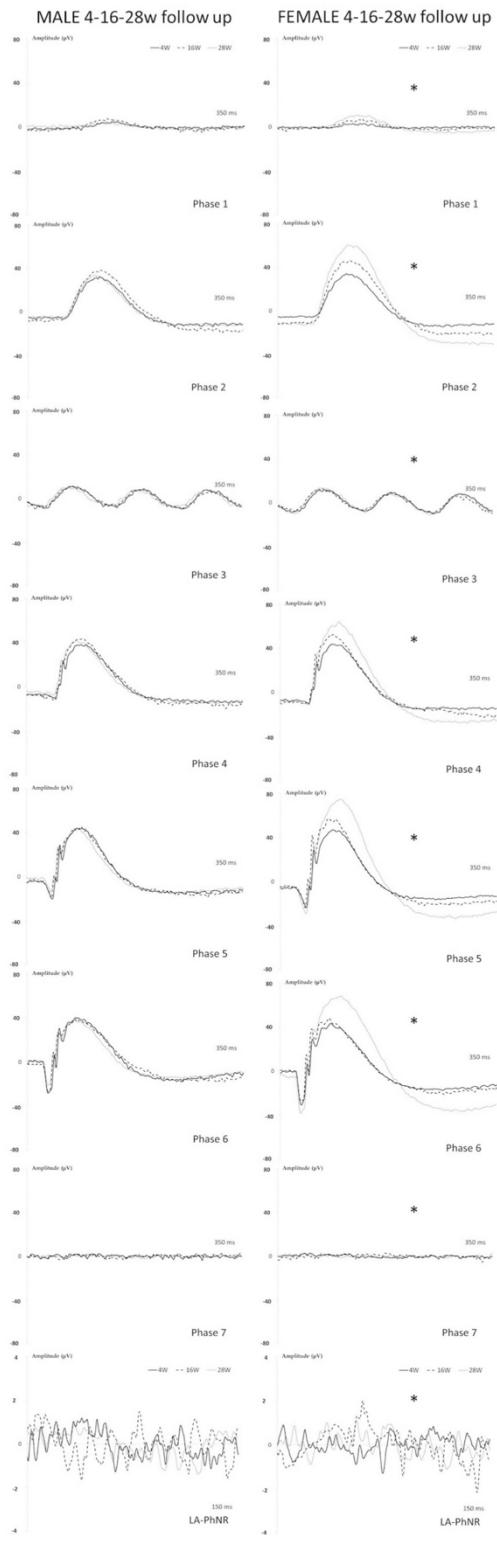
Photoreceptor response to high-intensity stimuli predicted neurodegeneration at 4 WOA. The highest AUC values with capacity to predict neurodegeneration were found in rats in early adulthood (week 16) in the oscillatory potentials of the mixed rod-cone response (AUC = 0.792) and, mainly, in the photoreceptor (rods) response (AUC = 0.833). Intermediate cell (bipolar) function with low stimulus predicted neurodegeneration in middle-aged adult rats.

#### 4. Discussion

The main objective of the study was to evaluate the changes that occur in the neuroretina with age in young and adult rats, differentiated by sex, in order to analyze the neurodegenerative process before senescence or loss of clinical function. There is evidence to suggest that in older adults with normal cognition (Shi et al., 2020) and neurodegenerative pathologies subclinical retinal changes occur prior to detection of brain damage (Normando et al., 2016; Knier et al., 2016; Klistorner et al., 2017) and correlation of the retinal thickness measured by OCT with brain volume (Shi et al., 2019; Alonso et al., 2018; Pietroboni et al., 2019). There is also increasing evidence of a non-linear decrease in neuroretinal tissue with age and pathology. Previous authors suggested that glial activity seems to be important in neural modulation (Anderson et al., 2019; Gallego et al., 2012; Damisah et al., 2020). A good correlation between OCT and glial histology was also previously demonstrated (Chu et al., 2013; Bosco et al., 2015). Therefore, in order to investigate the dynamics in the retinal degeneration/modulation that occurs with age, this study performed objective and repeatable structural examinations with OCT at different ages: 4 WOA (puberty), 12 WOA (youth), 16 WOA (early adulthood) and 28 WOA (adult middle age/pre-senescence) (Wang et al., 2011; Mohr et al., 2019; Sengupta et al., 2013). The dynamic fluctuations in neuroretinal thickness observed in our study at weeks 12 and 16 with *in vivo* OCT measurements would support non-linear neuroretinal thickness loss. As neuronal plasticity is more prone to occur until early adulthood and then fluctuates before declining in old age (Cizeron et al., 2020), analyzing different development timelines seems important to understanding retinal changes.



**Fig. 4. Neuroretinal percentage loss in OCT sectors and loss trend averaged by sex in healthy young and adult Long-Evans rats.** Abbreviations: R: retina; C: central; II: inner inferior; OI: outer inferior; IS: inner superior; OS: outer superior; IN: inner nasal; ON: outer nasal; IT: inner temporal; OT: outer temporal; RNFL: retinal nerve fiber layer; IT: inferior temporal; IN: inferior nasal; ST: superior temporal; SN: superior nasal; N: nasal; T: temporal; GCL: ganglion cell layer complex; TV: total volume; I: inferior; S: superior; N: nasal; T: temporal; >: higher loss than; M: male; F: female.



**Fig. 5.** Functionality of neuroretina by dark- and light-adapted ERG by sex in healthy young and adult Long-Evans rats. Phases 1 to 7 dark-adapted ERG. Abbreviations: LA: light-adapted; PhNR: photopic negative response;  $\mu$ V: microvolts; ms: milliseconds; w: week.

IOP was also measured to standardize neuroretinal loss and minimize the confusion/influence attributable to IOP. With age, fibrillary material is deposited in the extracellular matrix of the trabecular meshwork and is accompanied by a decrease in the size of Schlemm's canal, an increase in rigidity and a decrease in outflow of the aqueous humor of the eye (Zhao et al., 2018). Estrogens decrease resistance to outflow of the aqueous humor and, therefore, premenopausal females exhibit lower IOP than age-matched males (Huang et al., 2016). In our study, during the follow-up period there was a minimal increase in IOP, but when analyzed by sex it was shown that males had higher IOP values, even at young ages, with greater percentage loss of neuroretinal thickness. This may be due to the absence of the neuroprotective role played by estrogens (Nakazawa et al., 2006; Neumann et al., 2010; Vajaranant and Pasquale, 2012), but may also be the result of greater IOP-related damage (Saleh et al., 2007).

IOP-related stress also alters connective tissue and makes it more rigid. It has been observed in an animal glaucoma model that scleral rigidity (outer fibrous layer of the eye) is associated with the loss of RGCs. Increased rigidity in the prelaminar and laminar region of the optic nerve, both due to accumulation of fibrillary material and to lower vascularization, can damage axons and RGCs with age (Downs, 2015). Although Downs did not analyze the differences between sexes, our study appears to show that all these changes would affect males at an earlier stage and to a greater extent.

Scleral thickness varies between regions, being thicker at the peripapillary level and thinner at the equator (Downs, 2015). In this regard, our results show a greater percentage loss of retinal thickness at the peripheral level with time, which could be associated with the growth of the eye and elongation of that area, since the retinal area increases with body weight (Nadal-Nicolás et al., 2018) and our rats were in the midst of growth and transitioning from childhood/puberty to youth/adulthood. The growth curve of the rats in our study was similar to that reported by the supplier (Janvier-labs, France). Weight differences by sex were observed after week 12, and males exhibited higher values. However, our study shows that the highest standardized rate of neuroretinal loss occurs at week 12, when weight is similar in both sexes, and that it decreases at later stages (week 28), when the greatest weight differences were observed. Our results suggest that there is no relationship between body weight and retinal loss with data standardization. On the other hand, both sexes showed the same neuroretinal thickness pattern throughout follow-up. When thickness increased in males it also increased in females and vice versa, though the percentage loss was more intense in males (Fig. 2). This temporal sequence by sex was also described in brain development (Mangold et al., 2017).

Various authors have shown that decreased retinal thickness appears to occur first peripherally and then centrally, both because of the effect of age and in the presence of chronic stress. O'Steen et al. (O'Steen et al., 1987) conclude that male rats showed greater retinal loss and that the superior region was affected earliest, as in our study in which the peripheral superior sector was the most affected on average in males but not in females. DiLoreto et al. (1994) also showed that there is a decrease in retinal thickness with age (greater in male rats) and that the degenerative pattern differs according to sex (it develops later in females). They detected decreased retinal thickness in peripheral regions at 3 months of age and reported that at 12 months of age in the case of males, and at 18 months in that of females, accelerated peripheral cystoid retinal degeneration occurs, starting in the upper hemisphere and as detected by histological studies. In our case, at 3 months of age a decrease in thickness was found by OCT. Srinivasan et al. (2006) likewise use OCT to analyze the retinal thickness of young adult Long-Evans rats of both sexes but do not specify either their age or the number used. Nor do they analyze the differences between sexes. Their results belong to a cross-sectional study, not a longitudinal study as in our case, and the thickness is strikingly less than that obtained in our study (189.3 microns), the result being that the absence of descriptive data makes it impossible to use this information for comparison. On the other hand,

**Table 2****Prediction of neurodegeneration.** Abbreviations: ERG: electroretinography; DA: dark-adapted;  $\mu$ V: microvolts; WOA: weeks of age.

ERG parameters	PREDICTION OF NEURODEGENERATION (AUC values)		
	4 WOA	16 WOA	28 WOA
<b>Mix rod-cone response</b>	<b>a wave <math>\mu</math>V</b> (DA 3.0 cd/m <sup>2</sup> 0.067Hz/s)	0.659	0.333
	<b>b wave <math>\mu</math>V</b> (DA 3.0 cd/m <sup>2</sup> 29.412 Hz/s)	0.491	0.792
<b>Rod response</b>	<b>a wave <math>\mu</math>V</b> (DA 0.003 cd/m <sup>2</sup> 0.125 Hz/s)	0.645	0.833
	<b>b wave <math>\mu</math>V</b> (DA 0.003 cd/m <sup>2</sup> 0.125 Hz/s)	0.522	0.292

other authors (Nadal-Nicolás et al., 2018; Cuenca et al., 2014) have demonstrated a decrease in the thickness of the peripheral retina in agreement with the OCT analysis.

There are, however, differences of opinion in the literature as to whether this decrease in thickness is due to the growth of the retinal area or to a loss of cells. According to our results, it may be a consequence of both. The highest neuromodulator rate occurs in early phases (up to 16 WOA), especially in parameter R ( $-0.025 \mu\text{m/mmHg/day}$ ). The retina is made up of a large number of cell types, mainly somas with great synaptic activity and therefore with greater plasticity (Anderson et al., 2019; Tien et al., 2018; Cizeron et al., 2020). Our results suggest that total retinal thickness would be the most appropriate parameter with which to assess neurodevelopment. However, around week 16 the greatest change seems to occur in the RNFL ( $-0.019 \mu\text{m/mmHg/day}$ ) and therefore a remodeling of the axons may correspond to greater neurodegeneration. The neuroretinal sectors that suffer the greatest percentage changes throughout the study differ according to sex and throughout the different periods of development and degeneration, which implies continuous dynamism and the possible implication of multiple factors. Greater loss was detected in males from week 16 (early adulthood) onwards (Figs. 3 and 4) in the nasal and temporal sectors of the GCL (where RGC density is highest (Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás et al., 2018)), reflecting physiological neurodegeneration with ocular normotension.

Some authors (Feng et al., 2007) defend the non-loss of RGCs with age and also did not find a reduction in retinal volume even though, like us, they used both young and adult Long-Evans rats of both sexes. They did not, however, analyze differences by sex. Other researchers (Nadal-Nicolás, 2018) even found an increase in volume over time, with a reduction only occurring in very late stages (22 months), although they only used females. Harman et al. (2003) found likewise, but did not differentiate between sexes. Our results, in contrast, do suggest a progressive loss of both retinal and ganglion volume. There was also a loss of RGCs, although the rate was low and remained constant throughout the study. Weisse (1995) suggested that the rate of cell loss was similar in the center, mid-periphery and periphery but that it was more apparent in the periphery due to lower density. Others (Katz and Robison, 1986; Cavallotti et al., 2001; Neufeld and Gachie, 2003) showed a loss of RGCs with age, and Neufeld and Gachie (2003) even quantified a 1.5% loss of RGCs per month in adult male rats; Calkins (2013) did likewise as regards RNFL. Our study found a monthly loss of 1.88% in males and of 1.21% in females. With regard to male rats, Cavallotti (Cavallotti et al., 2001) also suggested that RGCs were more vulnerable to physiological loss with age than other retinal cell types, and Wang (Wang et al., 2010) demonstrated that oxidative damage of mtDNA in photoreceptors and RGCs was greater and that it increased with age as compared to other neural types. All this corroborates the results of our study, in which we found a greater percentage loss of RNFL and GCL than of R.

Although in our study the volume of the synaptic layers was not analyzed by OCT, we did evaluate the function by ERG, which showed a decrease in males and an increase in females with time. However, the

absence of complete retinal layer segmentation (outer nuclear layer [ONL] or inner plexiform layer [IPL], among others) did not allow us to study the association between the ONL and IPL and *a* and *b*-waves, respectively. Nadal-Nicolás et al. (2018) found no change in these layers, but this may be due to only using female rats in their study. In addition, our results showed that RGC (PhNR test) and photoreceptor (flash scotopic ERG) function indicated the greater vulnerability mentioned above. Photoreceptor function even predicted neurodegeneration in early adulthood (16 WOA), and RGC function worsened perceptually more in males (in males, PhNR amplitude at 16 WOA decreased by 45.19% while in females it increased by 6.95%), which would imply that neurodegeneration starts with evidence of decreased function; this occurred in the rats at 7 months of age (PhNR amplitude decreased by 57.39% in males vs 24.80% in females at 28 WOA [approximately 25 human years]). A decrease in PhNR amplitude correlated with perceptual GCL loss (20.52% in males and 14.67% in females) at 28 WOA.

Meanwhile, estrogens have been shown to increase ocular flow (Schmidl et al., 2015), which provides more oxygen and nutrients to cells and may have been why the female rats in our study exhibited less RGC loss and greater photoreceptor and bipolar functional response than males, as Chaychi et al. (2015) also showed. These authors found an increase in signal between months 2 and 6.5; in our results, however, these ranges increased between months 1 and 7 of postnatal life in Long-Evans rats. In other words, both the literature and our results suggest that retinal function differs between sexes. However, in month 1 of postnatal life (corresponding to approximately 1 year in humans) we found no differences, possibly because at this young age sex hormones have not yet had an influence. Differences were found, however, in early stages of youth, specifically at 4 months of postnatal life in rats (corresponding to approximately 16 years in humans), with lower measurements in males. In other words, these differences between sexes were found from the pubertal stage onwards. In this regard, a thorough review by Hertin & Sowell (Hertin & Sowell, 2017) presents evidence of the effects of sex hormones during puberty on brain structures, suggesting that brain development patterns are age- and sex-dependent. Various papers have identified the following characteristics in line with our findings (if we extrapolate the study of the retina, as a window, to what might happen in the brain (London A, Benhar I, Schwartz, 2013)): development of the volume of grey matter peaks in late childhood and diminishes during adolescence (in our case, both neuroretinal volume and thickness suffered a steady decline in that period); and subcortical structures decrease with pubertal maturation (perhaps being why the highest rate of loss in our study is found in the early and mid-stages, corresponding to pubertal development). On the other hand, in mid/late puberty the females exhibited a lower total volume of grey matter (as was the case in our results, where the female rats' volume was lower than that of the males), and showed estradiol levels with lower grey matter density. The occipital lobes of the males were larger than the females', though higher testosterone levels have also been linked to higher volumes of grey matter and thicker occipital cortices. In addition, elevated testosterone levels predicted thickening of somatosensory

cortical areas during childhood, but interestingly also predicted thinning in early adulthood, with lower cortical thicknesses in males (perhaps that is why our males exhibited greater neuroretinal thicknesses but also showed a greater percentage loss on follow-up). In this regard, longitudinal studies suggest that hormonal changes during puberty may be directly involved in the decrease in grey matter occurring in adulthood.

Just as the brain seems to exhibit differentiation by sex, the results of our study likewise suggest that the retina, as a neurosteroid generator, appears to be modulated, with the results showing different patterns depending on sex.

Two of the limitations of this study were that no determinations of hormone levels in the blood or histological studies corroborating OCT measurements were performed. Nevertheless, we consider the results to be extrapolatable, as various papers have shown an adequate correlation between OCT and immunocytochemistry (Cuenca et al., 2014; Adachi et al., 2016). In futures studies, it would be also interesting to analyze full segmentation and all ocular metrics using a multidimensional scaling analysis with the aim of revealing the specific metrics involved in neurodevelopment and degeneration.

## 5. Conclusions

This is not the first paper to evaluate the effect of age on healthy

retina, but it is the first to provide the baseline to better understand the implication not only of age but also of sex in rat models of neurodegenerative processes in an anatomical and functional manner. Our findings suggest that, from a structural and functional point of view, healthy Long-Evans rats present different patterns of neuronal development and degeneration by sex and age and that males appear to be more susceptible to neurodegenerative loss in presenile stages.

## Funding

This work was supported by Rio Hortega Research Grant M17/00213, PI17/01726, PI17/01946 (Instituto de Salud Carlos III), and by MAT2017-83858-C2-2 MINECO/AEI/FEDER, UE.

## Declaration of competing interest

None.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the use of the Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI), University of Zaragoza, and thank Zoco Estudio ([zocoestudio.com](http://zocoestudio.com)) for the infographics designed for this article.

## APPENDIX

**Table A.1**

**Neuroretinal thickness by OCT in healthy rat eyes (both sexes together).** Up: right eye; down: left eye. Abbreviations: OCT: optical coherence tomography; RNFL: retinal nerve fiber layer; GCL: ganglion cell layer; WOA: weeks of age; p: statistical significance p < 0.05; #: statistical significance p < 0.020, for Bonferroni correction for multiple comparisons.

OCT PARAMETERS	Right and left eyes (both sexes) NEURORETINAL THICKNESS FOLLOW-UP							
	4 WOA	p	12 WOA	p	16 WOA	p	28 WOA	p
<b>RETINAL THICKNESS</b>								
CENTRAL	278.71 ± 18.02	0.064	288.50 ± 17.69	0.312	289.40 ± 22.91	0.933	266.46 ± 22.74	0.386
	284.96 ± 16.85		277.75 ± 8.13		288.40 ± 11.99		258.92 ± 20.76	
INNER INFERIOR	262.47 ± 11.48	0.876	255.75 ± 15.19	0.708	263.00 ± 11.33	0.379	256.92 ± 8.40	0.898
	262.12 ± 12.49		252.75 ± 1.25		256.80 ± 9.65		256.38 ± 12.45	
OUTER INFERIOR	253.03 ± 8.95	0.611	240.50 ± 5.44	0.658	246.20 ± 7.53	0.357	243.38 ± 7.98	0.255
	252.16 ± 9.05		242.25 ± 5.18		241.80 ± 6.68		239.92 ± 7.11	
INNER SUPERIOR	255.80 ± 10.45	0.315	247.25 ± 6.65	0.847	249.80 ± 8.55	0.472	245.77 ± 10.36	0.260
	257.71 ± 9.17		246.50 ± 3.31		246.00 ± 7.31		240.54 ± 12.62	
OUTER SUPERIOR	256.51 ± 8.53	0.835	247.50 ± 5.19	0.842	248.00 ± 3.39	0.927	248.92 ± 9.48	0.362
	256.16 ± 9.09		248.25 ± 4.99		247.80 ± 3.27		245.31 ± 10.34	
INNER NASAL	258.68 ± 9.25	0.302	249.00 ± 7.43	0.460	256.40 ± 11.67	0.705	250.08 ± 6.97	0.857
	260.67 ± 10.85		253.75 ± 9.46		259.00 ± 9.13		249.38 ± 11.75	
OUTER NASAL	254.75 ± 8.56	0.251	242.75 ± 3.40	0.911	249.00 ± 5.78	0.483	246.85 ± 6.25	0.679
	252.84 ± 8.69		242.25 ± 7.89		245.60 ± 8.56		245.69 ± 7.72	
INNER TEMPORAL	258.14 ± 11.25	0.479	249.50 ± 8.06	0.415	251.80 ± 8.01	0.355	248.85 ± 9.30	0.930
	256.69 ± 9.97		245.75 ± 2.87		247.20 ± 6.76		249.23 ± 12.59	
OUTER TEMPORAL	254.22 ± 8.93	0.834	246.75 ± 4.42	0.469	248.80 ± 7.25	0.766	246.54 ± 7.60	0.678
	253.86 ± 8.83		249.25 ± 4.71		250.20 ± 7.12		245.31 ± 7.33	
TOTAL VOLUME	1.82 ± 0.06	0.798	1.77 ± 0.03	0.708	1.80 ± 0.05	0.725	1.76 ± 0.05	0.336
	1.83 ± 0.06		1.76 ± 0.03		1.79 ± 0.04		1.74 ± 0.05	
<b>RNFL THICKNESS</b>								
GLOBAL	47.42 ± 5.26	0.345	43.25 ± 1.25	0.603	40.80 ± 1.64	0.455	41.85 ± 3.87	0.362
	48.43 ± 5.86		44.75 ± 5.31		40.00 ± 1.58		40.46 ± 3.73	
INFERIOR TEMPORAL	48.81 ± 10.53	0.722	38.50 ± 7.50	0.620	42.20 ± 6.14	0.150	39.77 ± 3.51	0.727
	48.08 ± 11.02		43.75 ± 18.62		36.80 ± 4.43		38.77 ± 9.58	
INFERIOR NASAL	50.95 ± 10.35	0.973	47.50 ± 10.87	0.513	44.00 ± 5.14	0.393	43.62 ± 8.63	0.504
	51.02 ± 11.67		57.75 ± 27.37		40.60 ± 6.65		45.85 ± 8.10	
SUPERIOR TEMPORAL	48.98 ± 9.15	0.098	41.00 ± 6.48	0.999	42.40 ± 13.57	0.928	46.77 ± 8.34	<b>0.047</b>
	51.92 ± 9.26		41.00 ± 13.06		43.00 ± 4.69		40.92 ± 5.59	
SUPERIOR NASAL	40.69 ± 9.77	0.673	40.25 ± 8.18	0.231	39.00 ± 4.06	0.745	34.23 ± 13.71	0.668
	41.45 ± 8.81		31.50 ± 10.27		38.00 ± 5.24		36.38 ± 11.47	
NASAL	46.39 ± 9.00	0.294	46.00 ± 8.04	0.902	41.40 ± 3.20	0.233	39.92 ± 9.21	0.481
	44.71 ± 7.53		45.25 ± 8.42		38.60 ± 3.64		37.85 ± 4.94	

(continued on next page)

**Table A.1 (continued)**

OCT PARAMETERS	Right and left eyes (both sexes) NEURORETINAL THICKNESS FOLLOW-UP							
	4 WOA	P	12 WOA	P	16 WOA	P	28 WOA	P
TEMPORAL	48.75 ± 8.27	0.020	43.50 ± 4.65	0.586	37.80 ± 2.68	0.123	44.92 ± 6.04	0.294
	52.71 ± 9.27		46.00 ± 7.34		42.40 ± 5.32		42.31 ± 6.36	
<b>GCL THICKNESS</b>								
CENTRAL	22.10 ± 2.63	0.161	22.25 ± 3.30	0.348	19.40 ± 3.71	0.779	17.00 ± 3.05	0.361
	22.78 ± 2.40		20.00 ± 2.94		20.00 ± 2.73		15.92 ± 2.84	
INNER INFERIOR	27.68 ± 2.36	0.529	25.00 ± 1.41	0.999	25.00 ± 2.00	0.159	24.08 ± 1.55	0.754
	27.94 ± 1.94		25.00 ± 1.15		26.80 ± 1.64		23.85 ± 2.11	
OUTER INFERIOR	26.36 ± 1.91	0.213	24.50 ± 1.29	0.390	25.40 ± 1.67	0.576	23.69 ± 2.05	0.715
	26.76 ± 1.43		23.50 ± 1.73		26.00 ± 1.58		23.38 ± 2.18	
INNER SUPERIOR	26.29 ± 2.19	0.130	25.25 ± 2.50	0.284	23.20 ± 0.44	0.344	20.15 ± 2.19	0.091
	26.88 ± 1.84		23.75 ± 0.50		21.40 ± 3.97		17.77 ± 4.36	
OUTER SUPERIOR	25.53 ± 2.60	0.553	25.75 ± 1.25	0.003 <sup>#</sup>	25.40 ± 0.54	0.565	23.46 ± 2.72	0.388
	25.78 ± 1.82		22.50 ± 0.57		24.80 ± 2.16		22.62 ± 2.14	
INNER NASAL	25.69 ± 2.38	0.064	25.00 ± 1.63	0.488	24.20 ± 1.30	0.090	19.92 ± 3.09	0.313
	26.51 ± 2.15		24.00 ± 2.16		22.20 ± 1.92		18.85 ± 2.15	
OUTER NASAL	26.44 ± 2.10	0.700	24.50 ± 1.29	0.171	25.20 ± 0.83	0.371	22.31 ± 3.27	0.887
	26.29 ± 1.83		23.25 ± 0.95		24.60 ± 1.14		22.15 ± 2.03	
INNER TEMPORAL	25.76 ± 3.32	0.151	22.75 ± 2.87	0.501	22.00 ± 3.74	0.697	19.54 ± 3.68	0.509
	26.53 ± 1.95		20.75 ± 4.78		22.80 ± 2.38		18.54 ± 3.90	
OUTER TEMPORAL	26.56 ± 2.40	0.080	24.25 ± 2.98	0.573	24.80 ± 2.38	0.751	22.08 ± 3.66	0.529
	27.27 ± 1.71		22.50 ± 5.06		25.20 ± 1.30		21.23 ± 3.05	
TOTAL VOLUME	0.18 ± 0.01	0.132	0.17 ± 0.00	0.194	0.17 ± 0.01	0.371	0.15 ± 0.01	0.303
	0.18 ± 0.00		0.16 ± 0.01		0.16 ± 0.00		0.14 ± 0.01	

**Table A2**

Neuroretinal function by dark- and light-adapted ERG in healthy pubertal young and early adult Long-Evans rats (both sexes). Data extracted from right eyes expressed as mean ± sd. Abbreviations: DA: dark-adapted; PhNR: photopic negative response;  $\mu$ V: microvolts; ms: milliseconds; WOA: weeks of age.

ERG SCOTOPIC_50.00Nv/DIV		4 WOA	16 WOA	28 WOA
<b>DA 0.0003 (0.2 Hz/s)</b>	a_[ms]	19.73 ± 7.69	14.94 ± 3.60	19.75 ± 6.89
	b_[ms]	29.73 ± 10.55	35.74 ± 16.68	38.35 ± 19.95
	a_[ $\mu$ V]	18.13 ± 20.53	3.87 ± 1.94	18.08 ± 14.55
	b_[ $\mu$ V]	43.99 ± 22.92	34.24 ± 22.91	32.05 ± 17.87
<b>DA 0.003 (0.125 Hz/s)</b>	a_[ms]	24.37 ± 8.26	17.82 ± 7.06	23.97 ± 7.64
	b_[ms]	48.27 ± 4.16	50.00 ± 0.00	61.26 ± 10.97
	a_[ $\mu$ V]	21.78 ± 17.95	12.32 ± 6.55	22.12 ± 21.57
	b_[ $\mu$ V]	87.62 ± 46.03	143.08 ± 69.62	289.78 ± 104.76
<b>DA 0.03 (8.929 Hz/s)</b>	a_[ms]	22.37 ± 7.03	22.20 ± 7.48	23.34 ± 7.39
	b_[ms]	49.46 ± 1.17	49.72 ± 0.62	54.68 ± 14.76
	a_[ $\mu$ V]	60.56 ± 44.97	53.64 ± 20.68	39.33 ± 26.57
	b_[ $\mu$ V]	127.81 ± 56.12	143.12 ± 25.61	171.49 ± 62.75
<b>DA 0.03 (0.111 Hz/s)</b>	a_[ms]	22.92 ± 5.16	20.70 ± 4.48	22.60 ± 5.44
	b_[ms]	48.23 ± 3.02	49.18 ± 1.83	56.17 ± 6.55
	a_[ $\mu$ V]	38.37 ± 21.88	38.38 ± 27.08	43.42 ± 23.71
	b_[ $\mu$ V]	433.52 ± 161.06	535.92 ± 161.95	562.48 ± 119.03
<b>DA 0.3 (0.077 Hz/s)</b>	a_[ms]	21.94 ± 1.68	20.40 ± 0.86	21.12 ± 1.85
	b_[ms]	49.00 ± 3.30	49.04 ± 2.14	53.89 ± 6.45
	a_[ $\mu$ V]	167.41 ± 72.55	166.60 ± 59.77	190.92 ± 82.41
	b_[ $\mu$ V]	601.31 ± 204.22	669.50 ± 223.52	731.50 ± 221.14
<b>DA 3.0 (0.067 Hz/s)</b>	a_[ms]	14.44 ± 1.60	14.38 ± 1.74	13.75 ± 1.18
	b_[ms]	45.84 ± 6.29	46.84 ± 2.41	52.52 ± 7.49
	a_[ $\mu$ V]	285.25 ± 121.26	264.76 ± 87.49	266.33 ± 88.87
	b_[ $\mu$ V]	694.67 ± 237.51	701.48 ± 247.40	780.75 ± 264.33
<b>DA 3.0 (29.412 Hz/s)</b>	a_[ms]	19.71 ± 8.51	17.96 ± 8.32	22.97 ± 9.23
	b_[ms]	36.99 ± 13.97	30.70 ± 17.02	37.47 ± 13.61
	a_[ $\mu$ V]	35.36 ± 38.57	24.42 ± 9.30	25.46 ± 21.44
	b_[ $\mu$ V]	78.56 ± 74.18	44.61 ± 30.63	50.68 ± 23.53
<b>PhNR_200microV/div</b>				
Test	a_[ms]	15.49 ± 5.64	10.94 ± 1.50	16.08 ± 6.78
	b_[ms]	31.32 ± 13.19	32.76 ± 19.91	30.86 ± 12.27
	PhNR_[ms]	46.98 ± 3.77	45.38 ± 6.20	47.11 ± 3.10
	a_[ $\mu$ V]	20.00 ± 19.27	4.12 ± 3.50	14.92 ± 12.32
	b_[ $\mu$ V]	48.22 ± 36.73	17.27 ± 11.85	28.00 ± 11.54
	PhNR_[ $\mu$ V]	28.41 ± 22.78	21.72 ± 9.11	15.97 ± 11.49

**Table A3**

**Neuroretinal function by dark- and light-adapted ERG by sex in healthy pubertal young and early adult Long-Evans rats.** Data extracted from right eyes expressed as mean  $\pm$  sd. Abbreviations: DA: dark-adapted; PhNR: photopic negative response;  $\mu$ V: microvolts; ms: milliseconds; WOA: weeks of age.

ERG SCOTOPIC_50.00Nv/DIV	4 WOA		P	16 WOA		P	28 WOA		P		
	MALE	FEMALE		MALE	FEMALE		MALE	FEMALE			
<b>DA 0.003 (0.2 Hz/ s)</b>	a_[ms]	17.39 $\pm$ 5.82	21.55 $\pm$ 8.66	0.206	12.35 $\pm$ 2.89	16.66 $\pm$ 3.25	0.229	19.46 $\pm$ 6.76	20.08 $\pm$ 7.67	0.878	
	b_[ms]	26.01 $\pm$ 9.00	32.60 $\pm$ 11.10	0.141	30.80 $\pm$ 27.15	39.03 $\pm$ 12.13	0.660	45.00 $\pm$ 23.38	30.60 $\pm$ 12.86	0.207	
	a_[ $\mu$ V]	8.38 $\pm$ 13.01	25.63 $\pm$ 22.49	0.043	4.40 $\pm$ 1.69	3.52 $\pm$ 2.38	0.690	17.44 $\pm$ 17.62	18.08 $\pm$ 14.55	0.945	
	b_[ $\mu$ V]	41.31 $\pm$ 14.83	46.062 $\pm$ 28.07	0.633	41.10 $\pm$ 43.84	29.66 $\pm$ 3.33	0.656	42.33 $\pm$ 30.15	32.05 $\pm$ 17.87	0.481	
<b>DA 0.003 (0.125 Hz/s)</b>	a_[ms]	22.12 $\pm$ 6.82	26.12 $\pm$ 9.09	0.260	13.70 $\pm$ 1.97	20.56 $\pm$ 8.33	0.355	21.63 $\pm$ 7.98	26.70 $\pm$ 6.85	0.249	
	b_[ms]	49.59 $\pm$ 0.86	47.26 $\pm$ 5.36	0.191	50.00 $\pm$ 0.00	50.00 $\pm$ 0.00	0.999	71.01 $\pm$ 0.49	49.88 $\pm$ 0.29	0.000	
	a_[ $\mu$ V]	25.88 $\pm$ 22.12	18.64 $\pm$ 14.11	0.349	11.00 $\pm$ 4.24	13.20 $\pm$ 8.60	0.767	32.20 $\pm$ 25.36	10.37 $\pm$ 6.02	0.065	
	b_[ $\mu$ V]	91.75 $\pm$ 54.66	84.45 $\pm$ 40.23	0.716	125.10 $\pm$ 84.14	155.06 $\pm$ 74.94	0.703	349.86 $\pm$ 81.70	219.70 $\pm$ 85.93	0.017	
<b>DA 0.03 (8.929 Hz/ s)</b>	a_[ms]	24.74 $\pm$ 7.71	20.55 $\pm$ 6.16	0.161	14.05 $\pm$ 0.49	27.63 $\pm$ 1.06	0.001	23.87 $\pm$ 7.71	22.73 $\pm$ 7.67	0.795	
	b_[ms]	49.59 $\pm$ 1.07	49.37 $\pm$ 1.29	0.666	50.00 $\pm$ 0.00	49.53 $\pm$ 0.80	0.495	64.09 $\pm$ 3.89	43.72 $\pm$ 15.39	0.006	
	a_[ $\mu$ V]	73.14 $\pm$ 55.13	50.90 $\pm$ 34.58	0.249	62.05 $\pm$ 26.37	48.03 $\pm$ 19.74	0.538	24.18 $\pm$ 20.37	56.98 $\pm$ 22.39	0.018	
	b_[ $\mu$ V]	134.00 $\pm$ 61.81	123.05 $\pm$ 49.07	0.654	145.50 $\pm$ 53.41	141.53 $\pm$ 9.93	0.892	198.71 $\pm$ 39.67	139.73 $\pm$ 72.89	0.091	
<b>DA 0.03 (0.111 Hz/ s)</b>	a_[ms]	22.52 $\pm$ 5.51	23.24 $\pm$ 5.09	0.749	17.15 $\pm$ 9.68	23.06 $\pm$ 4.00	0.391	20.84 $\pm$ 6.39	24.65 $\pm$ 3.57	0.223	
	b_[ms]	47.59 $\pm$ 3.45	48.73 $\pm$ 2.70	0.382	50.00 $\pm$ 0.00	48.63 $\pm$ 2.36	0.495	61.46 $\pm$ 3.90	50.00 $\pm$ 0.00	0.000	
	a_[ $\mu$ V]	45.89 $\pm$ 30.79	32.60 $\pm$ 9.18	0.153	53.00 $\pm$ 5.65	28.63 $\pm$ 33.09	0.399	39.16 $\pm$ 23.54	48.38 $\pm$ 25.09	0.508	
	b_[ $\mu$ V]	439.65 $\pm$ 158.10	428.81 $\pm$ 169.58	0.877	493.75 $\pm$ 235.53	564.03 $\pm$ 147.48	0.700	514.14 $\pm$ 99.59	618.88 $\pm$ 122.52	0.117	
<b>DA 0.3 (0.077 Hz/s)</b>	a_[ms]	21.57 $\pm$ 1.52	22.23 $\pm$ 1.80	0.362	20.55 $\pm$ 0.91	20.30 $\pm$ 1.01	0.799	20.14 $\pm$ 1.22	22.27 $\pm$ 1.88	0.032	
	b_[ms]	48.35 $\pm$ 4.98	49.52 $\pm$ 0.92	0.415	50.00 $\pm$ 0.00	48.40 $\pm$ 2.77	0.495	58.60 $\pm$ 4.80	48.40 $\pm$ 2.24	0.001	
	a_[ $\mu$ V]	160.82 $\pm$ 62.23	172.49 $\pm$ 81.74	0.711	137.65 $\pm$ 71.06	185.90 $\pm$ 56.78	0.456	132.01 $\pm$ 34.49	259.63 $\pm$ 65.96	0.001	
	b_[ $\mu$ V]	598.57 $\pm$ 195.78	603.43 $\pm$ 218.42	0.956	572.60 $\pm$ 288.92	734.10 $\pm$ 206.25	0.510	601.29 $\pm$ 159.62	883.41 $\pm$ 188.04	0.014	
<b>DA 3.0 (0.067 Hz/s)</b>	a_[ms]	14.79 $\pm$ 2.05	14.19 $\pm$ 1.19	0.383	14.05 $\pm$ 1.48	14.60 $\pm$ 2.19	0.781	14.19 $\pm$ 1.36	13.23 $\pm$ 0.72	0.153	
	b_[ms]	43.83 $\pm$ 7.19	47.40 $\pm$ 5.28	0.184	48.65 $\pm$ 1.90	45.63 $\pm$ 2.08	0.202	56.94 $\pm$ 7.40	47.37 $\pm$ 3.10	0.013	
	a_[ $\mu$ V]	286.98 $\pm$ 132.82	283.92 $\pm$ 117.14	0.954	243.95 $\pm$ 124.94	278.63 $\pm$ 82.36	0.726	216.57 $\pm$ 70.97	324.38 $\pm$ 73.48	0.021	
	b_[ $\mu$ V]	681.96 $\pm$ 234.48	704.45 $\pm$ 248.89	0.828	638.65 $\pm$ 349.09	743.36 $\pm$ 234.32	0.707	612.43 $\pm$ 216.09	977.12 $\pm$ 160.39	0.006	
<b>DA 3.0 (29.412 Hz/ s)</b>	a_[ms]	18.98 $\pm$ 9.11	20.28 $\pm$ 8.35	0.725	9.95 $\pm$ 0.49	23.30 $\pm$ 5.63	0.050	21.63 $\pm$ 8.20	24.53 $\pm$ 10.87	0.594	
	b_[ms]	31.93 $\pm$ 17.03	40.89 $\pm$ 10.12	0.130	12.70 $\pm$ 3.39	42.70 $\pm$ 5.80	0.008	40.31 $\pm$ 14.51	34.15 $\pm$ 12.92	0.439	
	a_[ $\mu$ V]	45.68 $\pm$ 38.35	27.44 $\pm$ 38.32	0.271	28.75 $\pm$ 2.61	21.53 $\pm$ 11.76	0.476	23.57 $\pm$ 22.68	27.67 $\pm$ 21.79	0.747	
	b_[ $\mu$ V]	79.58 $\pm$ 103.08	77.79 $\pm$ 46.03	0.956	27.28 $\pm$ 37.21	56.16 $\pm$ 26.16	0.373	54.95 $\pm$ 18.74	45.70 $\pm$ 29.18	0.503	
<b>PhNR_200microV/div</b>	Test	a_[ms]	13.91 $\pm$ 4.42	16.74 $\pm$ 6.33	0.221	10.15 $\pm$ 0.63	11.46 $\pm$ 1.81	0.415	16.30 $\pm$ 7.01	15.82 $\pm$ 7.14	0.904
		b_[ms]	33.61 $\pm$ 15.17	29.53 $\pm$ 11.68	0.454	11.30 $\pm$ 1.83	47.07 $\pm$ 4.90	0.003	34.50 $\pm$ 11.28	26.62 $\pm$ 12.98	0.266
		PhNR_[ms]	46.14 $\pm$ 4.52	47.65 $\pm$ 3.10	0.331	38.60 $\pm$ 0.14	49.90 $\pm$ 0.51	0.000	47.43 $\pm$ 2.58	46.73 $\pm$ 3.84	0.705
		a_[ $\mu$ V]	18.31 $\pm$ 22.04	21.34 $\pm$ 17.55	0.705	6.85 $\pm$ 4.87	2.30 $\pm$ 0.45	0.178	18.88 $\pm$ 14.53	10.30 $\pm$ 7.95	0.225
		b_[ $\mu$ V]	48.47 $\pm$ 48.69	48.02 $\pm$ 25.85	0.976	9.14 $\pm$ 12.38	22.70 $\pm$ 9.71	0.258	29.27 $\pm$ 14.10	26.52 $\pm$ 8.73	0.687
		PhNR_[ $\mu$ V]	38.04 $\pm$ 27.87	20.85 $\pm$ 14.85	0.059	20.85 $\pm$ 5.30	22.30 $\pm$ 12.28	0.889	16.21 $\pm$ 13.40	15.68 $\pm$ 10.07	0.939

## References

- Adachi, K., Takahashi, S., Yamauchi, K., Mounai, N., Tanabu, R., Nakazawa, M., 2016. Optical coherence tomography of retinal degeneration in royal college of surgeons rats and its correlation with morphology and electroretinography. *PLoS One* 11 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162835>.
- Alonso, Ricardo, González-Morón, Dolores, Orlando, Garcea, 2018. Optical coherence tomography as a biomarker of neurodegeneration in multiple sclerosis: a review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 22, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.03.007>.
- Anderson, S.R., Zhang, J., Steele, M.R., Romero, C.O., Kautzman, A.G., Schafer, D.P., Vetter, M.L., 2019. Complement targets newborn retinal ganglion cells for phagocytic elimination by microglia. *J. Neurosci.: the official journal of the Society for Neuroscience* 39 (11), 2025–2040. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1854-18.2018>.
- Ben-Shlomo, G., Ofri, R., 2006. Development of inner retinal function, evidenced by the pattern electroretinogram, in the rat. *Exp. Eye Res.* 83 (2), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.020>.
- Bosco, A., Romero, C.O., Breen, K.T., Chagovetz, A.A., Steele, M.R., Ambati, B.K., Vetter, M.L., 2015. Neurodegeneration severity can be predicted from early microglia alterations *in vivo* in a mouse model of chronic glaucoma.
- Cascio, C., Deidda, I., Russo, D., Guarneri, P., 2015. The estrogenic retina: the potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. *Steroids* 103, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.002>.
- Cascio, C., Russo, D., Drago, G., Galizzi, G., Passantino, R., Guarneri, R., Guarneri, P., 2007. 17beta-estradiol synthesis in the adult male rat retina. *Exp. Eye Res.* 85 (1), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.02.008>.
- Cavallotti, C., Artico, M., Pescosolido, N., Feher, J., 2001. Age-related changes in rat retina. *Jpn. J. Ophthalmol.* 45 (1), 68–75. [https://doi.org/10.1016/s0021-5155\(00\)00294-x](https://doi.org/10.1016/s0021-5155(00)00294-x).
- Chaychi, S., Polosa, A., Lachapelle, P., 2015. Differences in retinal structure and function between aging male and female sprague-dawley rats are strongly influenced by the estrus cycle. *PLoS One* 10 (8), e0136056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136056>.
- Chu, C.J., Hermann, P., Carvalho, L.S., Liyanage, S.E., Bainbridge, J.W., Ali, R.R., Dick, A.D., Luthmann, U.F., 2013. Assessment and *in vivo* scoring of murine experimental autoimmune uveoretinitis using optical coherence tomography. *PLoS One* 8 (5), e63002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063002>.
- Disease models & mechanisms 8 (5), 443–455. <https://doi.org/10.1242/dmm.018788>.
- Calkins, D.J., 2013. Age-related changes in the visual pathways: blame it on the axon. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (14), ORSF37–ORSF41. <https://doi.org/10.1167/iosv.13-12784>.

- Cizeron, M., Qiu, Z., Koniaris, B., Gokhale, R., Komiyama, N.H., Fransén, E., Grant, S., 2020. A brainwide atlas of synapses across the mouse life span. *Science* (New York, N.Y.) 369 (6501), 270–275. <https://doi.org/10.1126/science.aba3163>.
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Sauvé, Y., et al., 2014. Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front. Neuroanat.* 8, 151. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00151>.
- Damisah, E.C., Hill, R.A., Rai, A., Chen, F., Rothlin, C.V., Ghosh, S., Grutzendler, J., 2020. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal *in vivo*. *Science advances* 6 (26), eaba3239. <https://doi.org/10.1126/sciadv.eaba3239>.
- DiLoreto Jr., D., Cox, C., Grover, D.A., Lazar, E., del Cerro, C., del Cerro, M., 1994. The influences of age, retinal topography, and gender on retinal degeneration in the Fischer 344 rat. *Brain Res.* 647 (2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91316-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91316-1).
- Ding, C., Wang, P., Tian, N., 2011. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp. Eye Res.* 92 (6), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.03.016>.
- Downs, J.C., 2015. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. *Exp. Eye Res.* 133, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.011>.
- Du, M., Mangold, C.A., Bixler, G.V., Brucklacher, R.M., Masser, D.R., Stout, M.B., Elliott, M.H., Freeman, W.M., 2017. Retinal gene expression responses to aging are sexually divergent. *Mol. Vis.* 10 (23), 707–717.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1985. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early treatment diabetic retinopathy study report No. Arch. Ophthalmol. 103 (12), 1796–1806.
- Feng, L., Sun, Z., Han, H., Zhou, Y., Zhang, M., 2007. No age-related cell loss in three retinal nuclear layers of the Long-Evans rat. *Viss. Neurosci.* 24 (6), 799–803. <https://doi.org/10.1017/S0952523807070721>.
- Gallego, B.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A.I., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Valiente-Soriano, F.J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Trivino, A., Ramírez, J.M., 2012. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J. Neuroinflammation* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-92>.
- Harman, A.M., MacDonald, A., Meyer, P., Ahmat, A., 2003. Numbers of neurons in the retinal ganglion cell layer of the rat do not change throughout life. *Gerontology* 49 (6), 350–355. <https://doi.org/10.1159/000073762>.
- Herting, M.M., Sowell, E.R., 2017. Puberty and structural brain development in humans. *Front. Neuroendocrinol.* 44, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.12.003>.
- Huang, A.S., Mohindroo, C., Weinreb, R.N., 2016. Aqueous humor outflow structure and function imaging at the bench and bedside: a review. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 7 (4), 578. <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000578>.
- Jonas, J.B., Aung, T., Bourne, R.R., Bron, A.M., Ritch, R., Panda-Jonas, S., 2017. Glaucoma. *Lancet* 390 (10108), 2183–2193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31469-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1).
- Katz, M.L., Robison Jr., W.G., 1986. Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Exp. Eye Res.* 42 (4), 293–304. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(86\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0014-4835(86)90022-9).
- Klistorner, A., Graham, E.C., Yiannikas, C., Barnett, M., Parratt, J., Garrick, R., Wang, C., You, Y., Graham, S.L., 2017. Progression of retinal ganglion cell loss in multiple sclerosis is associated with new lesions in the optic radiations. *Eur. J. Neurol.* 24 (11), 1392–1398. <https://doi.org/10.1111/ene.13404>.
- Knier, B., Berthele, A., Buck, D., Schmidt, P., Zimmer, C., Mühlau, M., Hemmer, B., Korn, T., 2016. Optical coherence tomography indicates disease activity prior to clinical onset of central nervous system demyelination. *Mult. Scler.* 22 (7), 893–900. <https://doi.org/10.1177/1352458515604496>.
- London, A., Benhar, I., Schwartz, M., 2013. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 9 (1), 44–53. <https://doi.org/10.1038/nrnol.2012.227>.
- Lozano, D.C., Hartwick, A.T.E., Twa, M.D., 2015. Circadian rhythm of intraocular pressure in the adult rat. *Chronobiol. Int.* May 32 (4), 513–523. <https://doi.org/10.3109/07420052.2015.1008135>.
- Mangold, C.A., Wronowski, B., Du, M., Masser, D.R., Hadad, N., Bixler, G.V., Brucklacher, R.M., Ford, M.M., Sonntag, W.E., Freeman, W.M., 2017. Sexually divergent induction of microglial-associated neuroinflammation with hippocampal aging. *J. Neuroinflammation* <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0920-8>, 14 1–19.
- Mohr, M.A., Wong, A.M., Tomm, R.J., Soma, K.K., Micevych, P.E., 2019. Pubertal development of estradiol-induced hypothalamic progesterone synthesis. *Horm. Behav.* 111, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.12.007>.
- Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve-injured retinas. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (8), 3860–3868. <https://doi.org/10.1167/ios.08.3267>.
- Nadal-Nicolás, F.M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2018. The aging rat retina: from function to anatomy. *Neurobiol. Aging* 61, 146–168. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.021>.
- Nakazawa, T., Takahashi, H., Shimura, M., 2006. Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain Res.* 1093 (1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.084>.
- Neufeld, A.H., Gachie, E.N., 2003. The inherent, age-dependent loss of retinal ganglion cells is related to the lifespan of the species. *Neurobiol. Aging* 24 (1), 167–172. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00059-3).
- Neumann, F., Wurm, A., Linnertz, R., et al., 2010. Sex steroids inhibit osmotic swelling of retinal glial cells. *Neurochem. Res.* 35 (4), 522–530. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0092-8>.
- Normando, E.M., Davis, B.M., De Groef, L., Nizari, S., Turner, L.A., Ravindran, N., Pahlitzsch, M., Brenton, J., Malaguera, G., Guo, L., Somavarapu, S., Cordeiro, M.F., 2016. The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of resiglitazone in the eye and brain. *Acta Neuropathol Commun* 4 (1), 86. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0346-z>.
- Nuzzi, R., Scalabrin, S., Becco, A., Panzica, G., 2018. Gonadal hormones and retinal disorders: a review. *Front. Endocrinol.* 9, 66. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00066>.
- Nuzzi, R., Scalabrin, S., Becco, A., Panzica, G., 2019. Sex hormones and optic nerve disorders: a review. *Front. Neurosci.* 13, 57. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00057>.
- O'Steen, W.K., Sweat, A.J., Eldridge, J.C., Brodish, A., 1987. Gender and chronic stress effects on the neural retina of young and mid-aged Fischer-344 rats. *Neurobiol. Aging* 8 (5), 449–455. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(87\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(87)90040-6).
- Pietroboni, A.M., Dell'Arti, L., Caprioli, M., et al., 2019. The loss of macular ganglion cells begins from the early stages of disease and correlates with brain atrophy in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 25 (1), 31–38. <https://doi.org/10.1177/1352458517740214>.
- Pietrucha-Dutczak, M., Amadio, M., Govoni, S., Lewin-Kowalik, J., Smedowski, A., 2018. The role of endogenous neuroprotective mechanisms in the prevention of retinal ganglion cell degeneration. *Front. Neurosci.* 12, 834. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.000834>.
- Quinn, R., 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2 (6), 775–777. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.04.002>.
- Rajan, K.B., Wilson, R.S., Weuve, J., Barnes, L.L., Evans, D.A., 2015. Cognitive impairment 18 years before clinical diagnosis of Alzheimer disease dementia. *Neurology* 85 (10), 898–904. <https://doi.org/10.1212/WNL..0000000000001774>.
- Ross, M., Honig, H., Ezra-Elia, R., Banin, E., Obolensky, A., Averbukh, E., Rosov, A., Gootwine, E., Ofri, R., 2018. Consecutive unilateral recording of the two eyes affects dark adapted ERG responses, when compared to simultaneous bilateral recording. *Doc. Ophthalmol.* 137 (3), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s10633-018-9661-y>.
- Saleh, M., Nagaraju, M., Porciatti, V., 2007. Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (10), 4564–4572. <https://doi.org/10.1167/ios.07.0483>.
- Salyer, D.L., Lund, T.D., Fleming, D.E., Lephart, E.D., Horvath, T.L., 2001. Sexual dimorphism and aromatase in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 126 (1), 131–136. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00147-4).
- Sandalon, S., Ofri, R., 2012. Age-related changes in the pattern electroretinogram of normal and glatiramer acetate-immunized rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (10), 6532–6540. <https://doi.org/10.1167/ios.12.10103>.
- Sengupta, P., 2013. The laboratory rat: relating its age with Human's. *Int. J. Prev. Med.* 4 (6), 624–630.
- Schmidl, D., Schmetterer, L., Garhöfer, G., Popa-Cherecheanu, A., 2015. Gender differences in ocular blood flow. *Curr. Eye Res.* 40 (2), 201–212. <https://doi.org/10.3109/02713683.2014.906625>.
- Shi, Z., Cao, X., Hu, J., Jiang, L., Mei, X., Zheng, H., Chen, Y., Wang, M., Cao, J., Li, W., Li, T., Li, C., Shen, Y., 2020. Retinal nerve fiber layer thickness is associated with hippocampus and lingual gyrus volumes in nondemented older adults. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 99, 109824. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109824>.
- Shi, Z., Zheng, H., Hu, J., Jiang, L., Cao, X., Chen, Y., Mei, X., Li, C., Shen, Y., 2019. Retinal nerve fiber layer thinning is associated with brain atrophy: a longitudinal study in nondemented older adults. *Front. Aging Neurosci.* 11 (11), 69. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00069>.
- Srinivasan, V.J., Ko, T.H., Wojtkowski, M., et al., 2006. Noninvasive volumetric imaging and morphometry of the rodent retina with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (12), 5522–5528. <https://doi.org/10.1167/ios.06-0195>.
- Tenkorang, M.A., Snyder, B., Cunningham, R.L., 2018. Sex-related differences in oxidative stress and neurodegeneration. *Steroids* 133, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.010>.
- Tien, N.W., Kerschensteiner, D., 2018. Homeostatic plasticity in neural development. *Neural Dev.* 13 (1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0105-x>.
- Tower, J., 2017. Sex-specific gene expression and life span regulation. *Trends Endocrinol. Metabol.* 28 (10), 735–747. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.002>.
- Umeya, N., Yoshizawa, Y., Fukuda, K., Ikeda, K., Kamada, M., Miyawaki, I., 2019. Availability of multistep light stimulus method for evaluation of visual dysfunctions. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 96, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.12.005>.

- Vajarantan, T.S., Pasquale, L.R., 2012. Estrogen deficiency accelerates aging of the optic nerve. *Menopause* 9 (8), 942–947. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3182443137>.
- Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Neufeld, A.H., 2010. Age-related increase in mitochondrial DNA damage and loss of DNA repair capacity in the neural retina. *Neurobiol. Aging* 31 (11), 2002–2010. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.10.019>.
- Wang, V.C., Neese, S.L., Korol, D.L., Schantz, S.L., 2011. Estradiol impairs response inhibition in young and middle-aged, but not old rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (3), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.01.003>.
- Wang, X., Zhao, L., Zhang, J., Fariss, R.N., Ma, W., Kretschmer, F., Wang, M., Qian, H.H., Badea, T.C., Diamond, J.S., Gan, W.B., Roger, J.E., Wong, W.T., 2016. Requirement for microglia for the maintenance of synaptic function and integrity in the mature retina. *J. Neurosci.* : the official journal of the Society for Neuroscience 36 (9), 2827–2842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3575-15.2016>.
- Weisse, I., 1995. Changes in the aging rat retina. *Ophthalmic Res.* 27 (Suppl. 1), 154–163. <https://doi.org/10.1159/000267862>.
- Wickham, L.A., Gao, J., Toda, I., Rocha, E.M., Ono, M., Sullivan, D.A., 2000. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol. Scand.* 78 (2), 146–153. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0420.2000.078002146.x>.
- Yap, T.E., Donna, P., Almonte, M.T., Cordeiro, M.F., 2018. Real-time imaging of retinal ganglion cell apoptosis. *Cells* 7 (6), 60. <https://doi.org/10.3390/cells7060060>.
- Zhao, Y., Chen, J., Yu, X., Xu, J., Sun, X., Hong, J., 2018. Age-related changes in human Schlemm's canal: an in vivo optical coherence tomography-based study. *Front. Physiol.* 9, 630.

**9.2 ARTÍCULO 2: Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia:  
Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models.**

*Mendez-Martinez S, Martinez-Rincon T, Subias M, Pablo LE, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo D, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E, Rodrigo MJ.*

*J Clin Med.* 2021;10(16):3697

DOI: 10.3390/jcm10163697

ISSN: 2077-0383

PMID: 3441992

Factor de impacto (JCR 2020): 4,242

Posición entre las revistas de Medicina, General e Interna (Medicine, General & Internal) en el JCR 2020: 39/167 (Cuartil 1)



Article

# Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models

Silvia Mendez-Martinez <sup>1,2,\*</sup>, Teresa Martínez-Rincón <sup>1,2</sup>, Manuel Subias <sup>1,2</sup>, Luis E. Pablo <sup>1,2,3</sup>, David García-Herranz <sup>4,5,6</sup>, Julian García Feijoo <sup>3,7</sup>, Irene Bravo-Osuna <sup>3,4,5</sup>, Rocío Herrero-Vanrell <sup>3,4,5</sup>, Elena García-Martin <sup>1,2,3</sup> and María J. Rodrigo <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain; teresamrincon@gmail.com (T.M.-R.); manusubias@gmail.com (M.S.); lpablo@unizar.es (L.E.P.); egmvivax@yahoo.com (E.G.-M.); mariajesusrodrigo@hotmail.es (M.J.R.)

<sup>2</sup> Miguel Servet Ophthalmology Research Group (GIMSO), Aragon Health Research Institute (IIS Aragon), 50009 Zaragoza, Spain

<sup>3</sup> National Ocular Pathology Network (OFTARED), Carlos III Health Institute, 28040 Madrid, Spain; jgarciafeijoo@hotmail.com (J.G.F.); ibravo@ucm.es (I.B.-O.); rociohv@farm.ucm.es (R.H.-V.)

<sup>4</sup> Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology (InnOftal) Research Group, UCM 920415 Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; davgar07@ucm.es

<sup>5</sup> Health Research Institute, San Carlos Clinical Hospital (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

<sup>6</sup> University Institute for Industrial Pharmacy (IUFI), School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>7</sup> Department of Ophthalmology, San Carlos Clinical Hospital (IdISSC), Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: oftalmosmm@gmail.com; Tel.: +34-9-7676-5558



**Citation:** Mendez-Martinez, S.; Martínez-Rincón, T.; Subias, M.; Pablo, L.E.; García-Herranz, D.; Feijoo, J.G.; Bravo-Osuna, I.; Herrero-Vanrell, R.; García-Martin, E.; Rodrigo, M.J. Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3697. <https://doi.org/10.3390/jcm10163697>

Academic Editor: Maria Letizia Salvetat

Received: 19 July 2021

Accepted: 17 August 2021

Published: 20 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

An increase in intraocular pressure (IOP) is the main factor for developing primary open-angle glaucoma (POAG), which leads to chronic progressive optic neuropathy and is a leading cause of irreversible blindness worldwide [1]. An association between POAG and high myopia was found, as highly myopic patients experience increased risk and earlier onset [2] of this sight-threatening disease [3–6]. The prevalence of myopia and high myopia (spherical equivalent less than −6.00 D) in the global population is currently 28.3%, and this is expected to increase by 2050 [7]. Highly myopic eyes suffer from structural changes such as peripheral retinal atrophic areas, tilted nerve appearance, temporal crescent of

the optic disc [8], vitreoretinal traction, retinoschisis, lamellar or complete macular hole, retinal pigment epithelium (RPE) alterations and myopic choroidal neovascularization, lacquer cracks and chorioretinal atrophy, decreased choroidal thickness, scleral thinning with irregular curvature and staphyloma [9], and decreased retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness, among others [10]. All these structural differences in myopic eyes are probably related to biomechanical stretching resulting from the imbalance between IOP and the elastic properties of the sclera [11–14]. Several animal and human studies have claimed the baropathic nature of axial myopia [15]. Indeed, several topical ocular hypotensive drugs were used in animal [16,17] and in human [18] studies to demonstrate the influence of IOP on axial length and refractive errors.

Unfortunately, POAG is difficult to diagnose in highly myopic eyes as the structural configuration of the optic nerve acts as a confounder variable in diagnostic tests such as spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT), visual fields and electroretinography (ERG) [19–22]. Commercially available OCT devices still do not accurately measure RNFL thickness using automatic segmentation protocols in highly myopic eyes, exhibiting thinner average distributions in the superior, nasal, and inferior sectors, with greater temporal thickness, and a temporal shift in the superior and inferior peak locations [9].

To overcome the difficulties of structural diagnosis, OCT-based ganglion cell layer (GCL) analysis was proposed as a parameter for earlier detection of glaucomatous damage in myopic patients [23]. However, glaucoma is an aging-linked neurodegenerative pathology, so age could be a confounding factor in SD-OCT measurements. Indeed, animal studies showed contradictory results, with no definitive correlation between aging and thinning of the GCL [24–27] as detected in other neurodegenerative diseases [28], especially with the RNFL parameter [29–31]. Electrophysiological tests also showed functional impairment in patients affected by ocular hypertension, glaucoma, demyelinating optic neuropathies and Alzheimer's disease in both human [32] and animal studies [33,34], with a functional electrical deficit followed by structural tomographic thinning [35], even without visual dysfunction [34]. Hence, there is ample scope for studying the physiopathology of neurodegenerative diseases, aging, myopia and glaucoma.

The aim of this study is to analyze the impact of chronic ocular hypertension (OHT) on the refractive error, structure and function of the neuroretina in two different OHT-inducing animal models, comparing it with a control cohort presenting ocular normotension (ONT) over 24 weeks.

## 2. Materials and Methods

A retrospective study was conducted by collecting data from a proprietary database of animal glaucoma projects (PI17/01946, MAT2017-83858-C2-2). To investigate the impact of IOP on the eye, 260 rat eyes were classified as inclusion criteria into ONT (if IOP was <20 mmHg) or OHT (if IOP was >20 mmHg) cohorts.

### 2.1. Animals

Long-Evans rats (40% male, 60% female) were used for the study. All animals were four weeks old, their weights ranged from 50–100 g at the start of the study and were similar to that reported by the supplier (Janvier-labs, Le Genest-Saint-Isle, France) over the study. The animal study was carried out in the experimental surgery department of the Biomedical Research Center of Aragon (CIBA). The experiments were previously approved by the Ethics Committee for Animal Research (PI34/17) and were carried out in strict accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology's Statement for the use of Animals.

The control ONT cohort included non-intervened eyes. The OHT cohort comprised the episcleral sclerosis (ES) group, in which OHT was induced by biweekly sclerosis of the episcleral veins with hypertonic (1.8M) solution as described [36]. The microspheres (MS) group, in which OHT was induced by injecting poly-lactic-acid-glycolic (PLGA) microspheres into the anterior chamber at baseline biweekly for the first month and then

once monthly until week 20 as described [35,37]. All OHT injections were performed in the right eye under surgical conditions: controlled temperature, topical tetracaine (1 mg/mL + oxibuprocaine 4 mg/mL) eye drops (Anestesico doble Colircusí®, Alcon Cusi® SA, Barcelona, Spain) and intraperitoneal (60 mg/kg of Ketamine + 0.25 mg/kg of Dexmedetomidine) anesthetic. Afterwards, the rats were left to recover in an enriched 2.5% oxygen atmosphere and were treated with antibiotic ointment (erythromycin 5 mg/g (Oftalmolosa Cusi® eritromicina, Alcon Cusi® SA, Barcelona, Spain)).

For detailed methodology characteristics, consult the original articles [27,35,37,38].

## 2.2. Intraocular Pressure

IOP measurements using a Tonolab® tonometer (Tonolab, TiolatOy Helsinki, Helsinki, Finland) were recorded in the morning every week. The IOP value was obtained from the average of 18 rebounds. This procedure was accomplished using a sedative mixture of 3% sevoflurane gas and 1.5% oxygen for less than 3 min in order to avoid hypotension effects [39].

## 2.3. Optical Coherence Tomography

SD-OCT (Spectralis, Heidelberg® Engineering, Heidelberg, Germany) was used to analyze the refractive status and the structure of the neuroretina over six months. Recordings were performed at the initial (0 weeks), middle (12 weeks) and end time of the study (24 weeks). In addition, an intermediate test was performed at week 8 of the study, which corresponds to 12 weeks of age of the rat. At this age, development and growth of the retina end and the retina reaches maturity [40]. A plane power polymethylmethacrylate (PMMA) contact lens with a thickness of 270 µm and a diameter of 5.2 mm (Cantor+Nissel®, Northamptonshire, UK) was adapted to the cornea to obtain high-quality images [41].

**Refractive status** was measured in diopters (D). The RNFL protocol was used for imaging acquisition. This protocol explores the optic nerve head, which is the most posterior structure of the rat eye, as the eye is elongated. Retinal images were adjusted and acquired by focusing on the retinal vascular structure. The diopters obtained through focusing were then analyzed as the diopter power of the eyeball.

**Structural analysis:** The RNFL, retina posterior pole (R) and GCL protocol with automatic segmentation were used to quantify neuroretinal thickness (in micrometers). These protocols analyze an area of 1, 2 and 3 mm around the center of the optic disc using 61 scans. Subsequent follow-up examinations were acquired at the same location using the eye-tracking software and follow-up application. Biased examinations were discarded or manually corrected by a masked, trained technician if the algorithm had obviously erred. The R and GCL analyzed the 9 ETDRS areas (central area and inner or outer sectors divided into inferior, superior, nasal, and temporal sectors) and the total volume. The RNFL protocol analyzed 6 peripapillary sectors (inferotemporal, temporal, superotemporal, superonasal, nasal, and inferonasal).

For ERG and OCT acquisition, the rats were anesthetized by intraperitoneal administration of 60 mg/kg of Ketamine + 0.25 mg/kg of Dexmedetomidine.

## 2.4. Electroretinography

Electroretinography performed to analyze the outer and inner neuroretinal cells' functionality at weeks 0, 12 and 24. The electroretinography device (Roland consult® RETIanimal ERG, Brandenburg an der Havel, Germany) was used to stimulate simultaneously both eyes and explore them in multisteps using the flash scotopic and the photopic negative response (PhNR) protocols. Scotopic test examined rod response: step 1: -40 dB, 0.0003 cds/m<sup>2</sup>, 0.2 Hz (20 recordings averaged); step 2: -30 dB, 0.003 cds/m<sup>2</sup>, 0.125 Hz (18 recordings averaged); step 3: -20 dB, 0.03 cds/m<sup>2</sup>, 8.929 Hz (14 recordings averaged); step 4: -20 dB, 0.03 cds/m<sup>2</sup>, 0.111 Hz (15 recordings averaged). Photopic test examined retinal ganglion cell functionality: blue background 470 nm, 25 cds/m<sup>2</sup> and red LED flash

625 nm, 0.30 cds/m<sup>2</sup>, 1.199 Hz (20 recordings averaged). For this purpose, the animals were prepared and the ERG tests were performed as [27,35] described.

### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by a blinded researcher. Descriptive analysis of quantitative variables was performed using (mean  $\pm$  standard deviation [SD]). As the Kolmogorov–Smirnov test showed a non normal distribution of the variables, comparisons between both the ONT and OHT cohorts and ES and MS groups were conducted using the non-parametric Mann–Whitney U test and comparisons among the ONT, ES and MS cohorts were made using the Kruskal–Wallis H test. Eyes in every cohort were divided into two groups: those with a diopter power higher or lower than 17 D for the ONT eyes and 6 D for the OHT eyes. These sub-groups were used to study the logistic regression to the model so that correlations between refraction and OCT parameters or IOP values could be made. Correlations with the refractive status of the eye, age, OCT thicknesses, and ERG parameters were performed using Spearman correlation coefficient and logistic regression analysis. *p* values  $< 0.05$  were considered statistical significant; the Bonferroni correction for multiple comparisons was also calculated to avoid a high false-positive rate.

## 3. Results

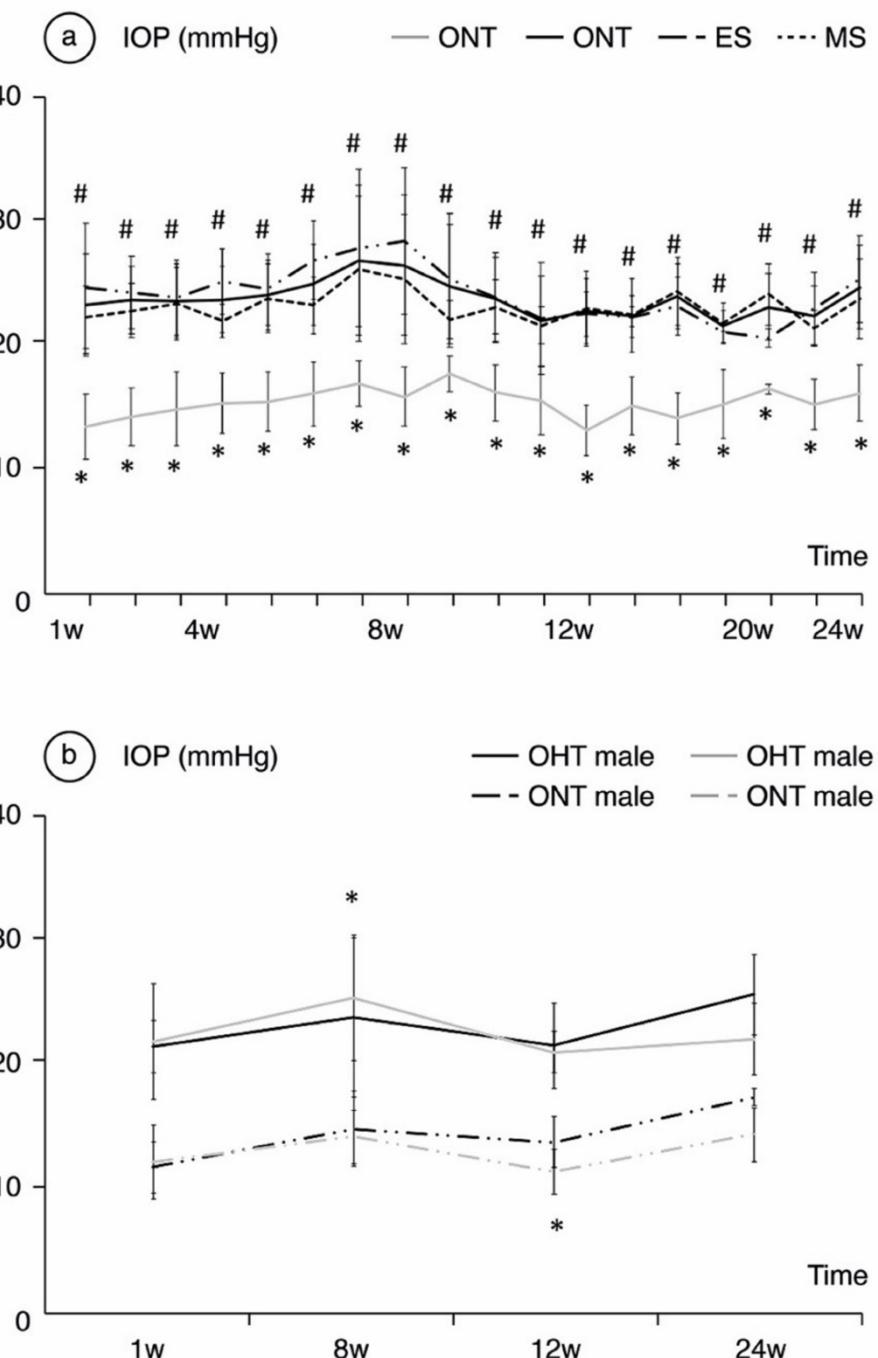
A total of 260 eyes of Long–Evans rats were analyzed from two different cohorts: 74 eyes with an IOP lower than 20 mmHg (ONT cohort serving as control), and 186 eyes with an IOP higher than 20 mmHg, named the OHT cohort, which in turn was divided into two sub-groups by induced OHT model: 62 eyes based on the ES model and 124 eyes based on the biodegradable MS model.

### 3.1. IOP Analysis

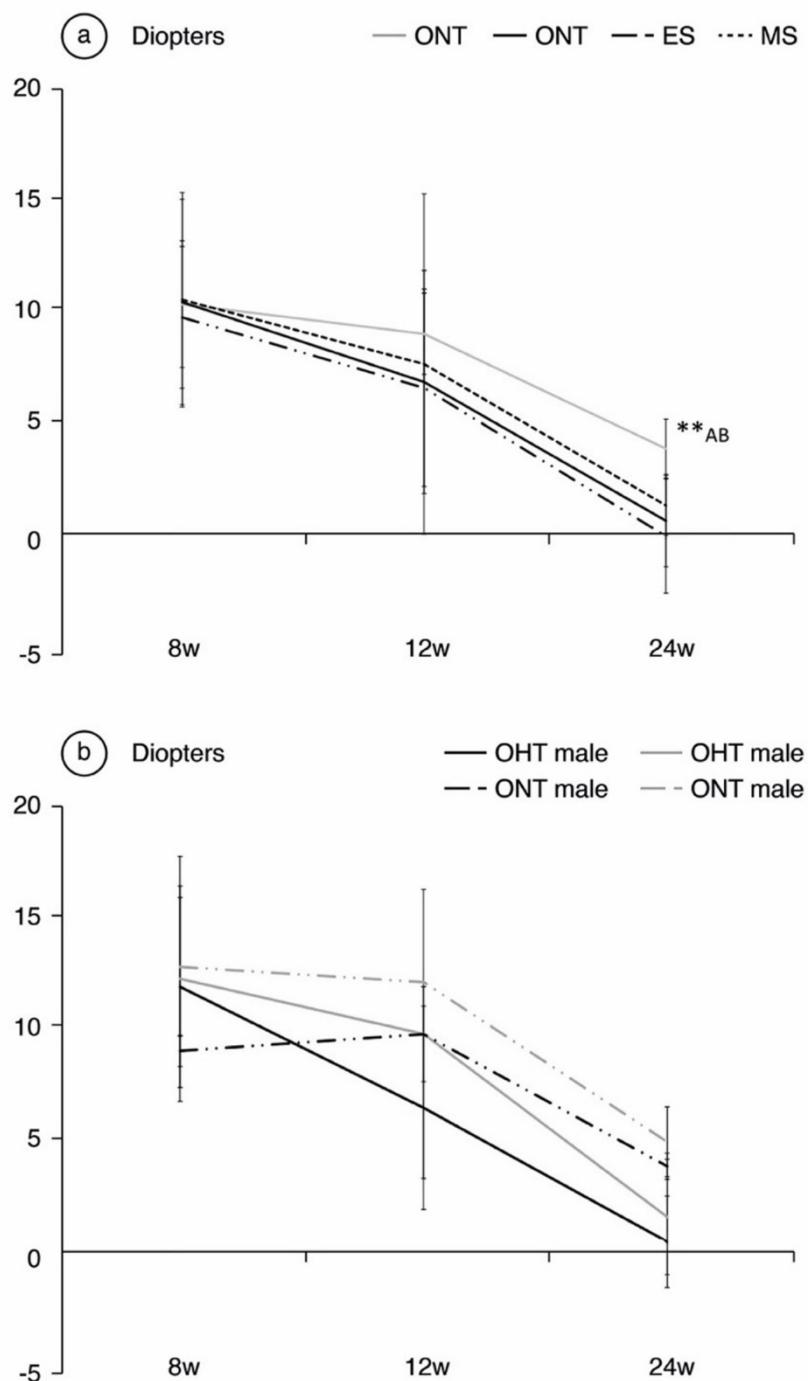
**Comparing ONT and OHT cohorts.** ONT eyes ( $16.09 \pm 2.25$  mmHg (range: 13.37–17.62 mmHg)) showed statistically significant ( $p < 0.05$ ) lower IOP than OHT eyes ( $23.66 \pm 1.40$  mmHg (range 21.44–26.74 mmHg)). **Comparing both OHT groups.** The ES group presented the highest IOP values up to week 12, after which the trend reversed ( $p < 0.001$ ) (Figure 1a). Analyzing by sex, males suffered from slightly higher IOP values in both the ONT and OHT groups, and reached statistical significance at weeks 8, 10 and 16 ( $p = 0.022$ ,  $p < 0.001$  and  $p = 0.023$ , respectively) (Figure 1b).

### 3.2. Refraction

**Comparing ONT and OHT cohorts.** Both the ONT and OHT cohorts experienced a physiological trend toward emmetropia throughout the follow-up, especially over the first weeks of the study; from  $35.16 \pm 6.38$  D at baseline (Table S1 Supplementary Materials) to  $11.87 \pm 3.21$  D in the ONT and  $11.98 \pm 5.21$  in the OHT at 8 weeks. However, the OHT cohort exhibited lower refractive power that reached statistical significance at week 24 ( $+4.54 \pm 1.5$  D in the ONT cohort vs.  $+0.88 \pm 2.36$  D in the OHT cohort,  $p < 0.001$ ) (Figure 2). **Comparing both OHT groups.** A small difference between both OHT groups was also detected ( $p = 0.001$ ), with slightly lower dioptric values for the ES group ( $+1.66 \pm 1.53$  D in MS vs.  $+0.10 \pm 2.91$  D in ES) (Figure 2a). No statistically significant differences were found in refraction between sexes ( $p > 0.05$ ), although males consistently presented lower dioptric power throughout the follow-up, especially in the OHT cohort (Figure 2b).



**Figure 1.** Analysis of intraocular pressure (IOP) in mmHg over the 24-week follow-up comparing the ocular normotension (ONT) and ocular hypertension (OHT) cohorts (a) and comparing both sexes (b). Abbreviations: w: week; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; \*: statistical differences between the ONT and the OHT cohorts; #: statistical differences between the ES and MS groups.



**Figure 2.** Analysis of refractive power in diopters over the 24-week follow-up, comparing the ocular normotension (ONT) and ocular hypertension (OHT) cohorts (a) and comparing both sexes (b). Abbreviations: w: week; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; \*\*: statistical differences between groups (ONT vs. ES vs. MS) (Kruskal Wallis); A: statistical differences between ONT and ES; B: statistical differences between ONT and MS.

### 3.3. Analysis of the Correlation between Refraction, Ocular Hypertension, and OCT Parameters

There were no statistically significant correlations between the OCT values and the refractive status of the eye. IOP > 20 mmHg at week 24 was positively correlated to lower dioptric values with a B coefficient of 4.01 ( $p = 0.01$ ) for the OHT cohort vs. 4.65 ( $p = 0.009$ ) for the ONT cohort.

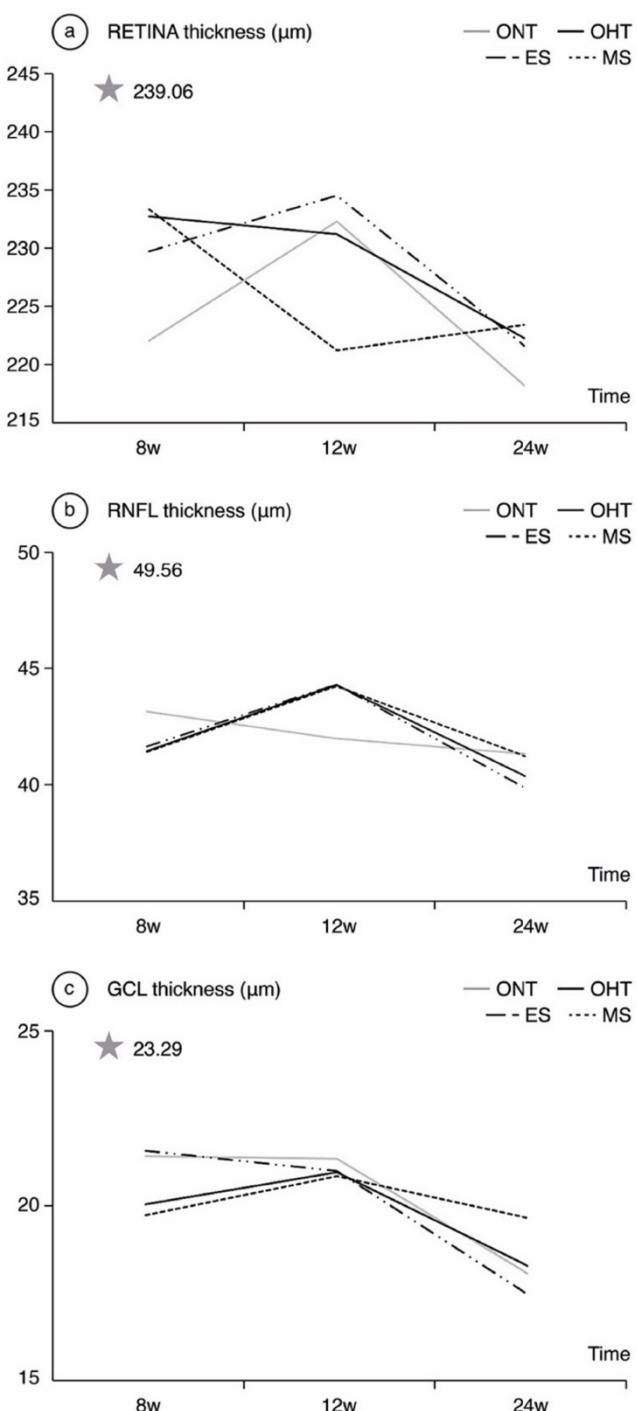
### 3.4. OCT Analysis

**Comparing ONT and OHT cohorts.** The most significant differences were found in week 8, when the OHT cohort exhibited thicker R values in the inner temporal sector and all the outer sectors (Table 1). The highest percentage differences by sector also followed the glaucomatous rule inferior > superior > nasal > temporal until week 12. The ONT cohort experienced a progressive decrease in RNFL thickness over time, and the OHT cohort showed an increase in RNFL thickness at week 12 in both the ES and MS groups (Figure 3). **Comparing both OHT groups.** Differences between the ONT and OHT cohorts were usually related to the values found in the MS group.

**Table 1.** Statistically significant differences found by optical coherence tomography parameters analyzed at weeks 8, 12 and 24.

Time	OCT Protocol	Sector	ONT (Mean ± SD in μm)	OHT (Mean ± SD in μm)	D%	p *	OHT Groups (Mean ± SD in μm)	p †
8 W	R	Central	277.20 ± 17.86	<b>263.21 ± 22.03</b>	-5.05	0.022	MS <b>263.80 ± 22.89</b> ES <b>260.30 ± 17.86</b>	0.022
		Temporal Inner	<b>244.70 ± 8.35</b>	251.90 ± 18.50	+2.86	0.047	MS <b>250.78 ± 14.82</b> ES 257.50 ± 31.74	0.047
		Inferior Outer	<b>239.90 ± 6.19</b>	250.50 ± 11.13	+4.23	0.003	MS <b>251.40 ± 11.34</b> ES <b>246.00 ± 9.30</b>	0.003
		Nasal Outer	<b>243.30 ± 4.34</b>	253.60 ± 12.85	+4.06	0.002	MS <b>253.96 ± 11.84</b> ES <b>251.90 ± 17.60</b>	0.002
		Superior Outer	<b>246.30 ± 4.19</b>	256.86 ± 17.28	+4.13	0.017	MS <b>257.04 ± 16.69</b> ES <b>256.00 ± 20.89</b>	0.017
	GCL	Temporal Outer	<b>245.00 ± 6.48</b>	254.10 ± 16.10	+3.58	0.013	MS <b>253.12 ± 12.17</b> ES 259.00 ± 29.37	0.013
		Central	19.80 ± 3.39	<b>17.03 ± 3.34</b>	-13.99	0.014	MS <b>16.78 ± 3.27</b> ES 18.30 ± 3.62	0.014
		Superior Inner	24.10 ± 1.85	<b>20.91 ± 4.03</b>	-13.24	0.004	MS <b>20.53 ± 4.04</b> ES 22.80 ± 3.61	0.004
12 W	R	Central	285.33 ± 18.90	<b>266.00 ± 16.73</b>	-6.76	0.039	MS <b>267.33 ± 17.21</b> ES <b>265.56 ± 17.61</b>	0.039
24 W	RNFL	Nasal Superior	39.27 ± 7.25	28.88 ± 11.99	-26.46	0.036	MS 31.00 ± 10.66 ES <b>27.60 ± 13.10</b>	0.050

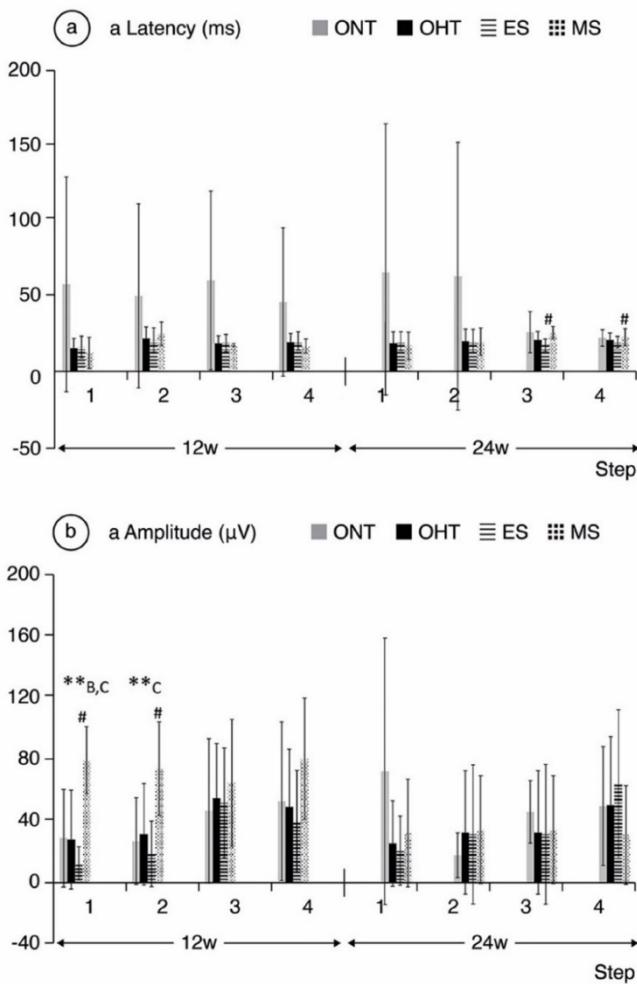
OCT: optical coherence tomography; R: retina; GCL: ganglion cell layer complex; RNFL: retinal nerve fiber layer; W: week; ONT: ocular normotension cohort; OHT: ocular hypertension cohort; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; D%: differences in percentage; p: statistical differences (<0.05); \* U Mann Whitney; † Kruskal Wallis; the lowest thickness values are highlighted in bold.



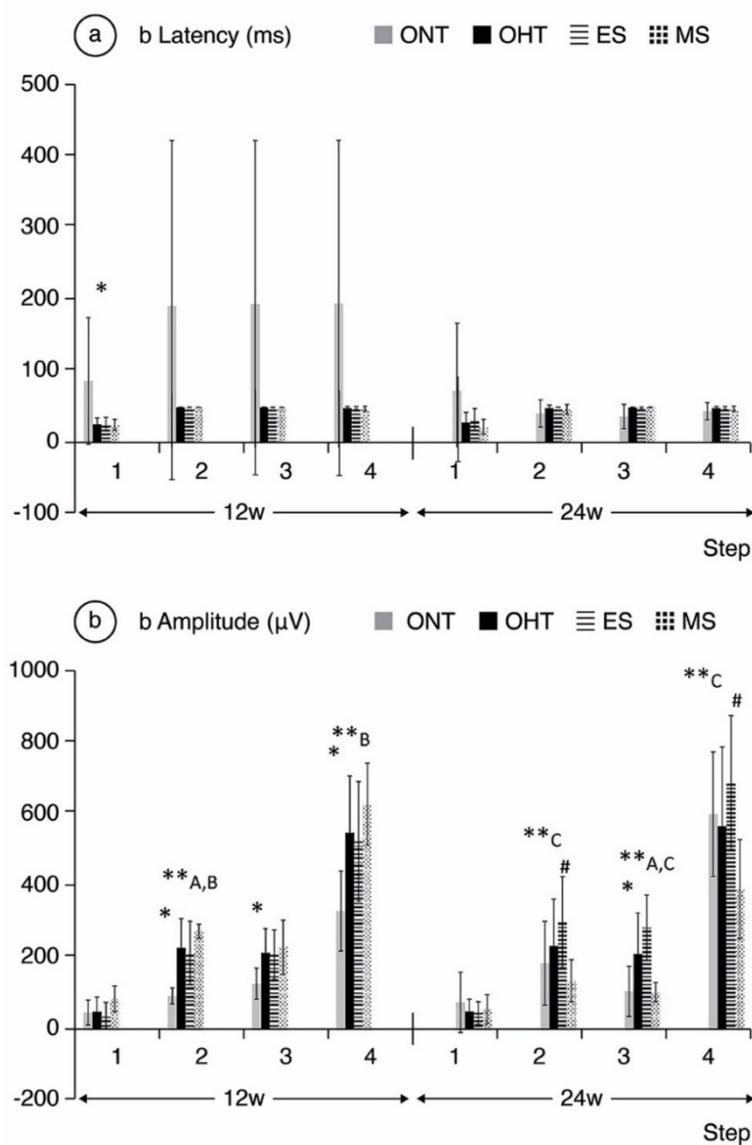
**Figure 3.** Neuroretinal thickness measured by optical coherence tomography in both the ocular normotension and ocular hypertension cohorts and the ocular hypertension sub-groups at 8, 12, 24 weeks follow-up. (a) Retina thickness, (b) Retina nerve fiber layer thickness, (c) Ganglion cell layer thickness. The analysis is based on the mean values of all the OCT sectors. ONT: ocular normotension cohort; OHT: ocular hypertension cohort; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; RNFL: retinal nerve fiber layer; GCL: ganglion cell layer;  $\mu\text{m}$ : thickness in micrometers; W: week; star: baseline thickness.

### 3.5. ERG Analysis

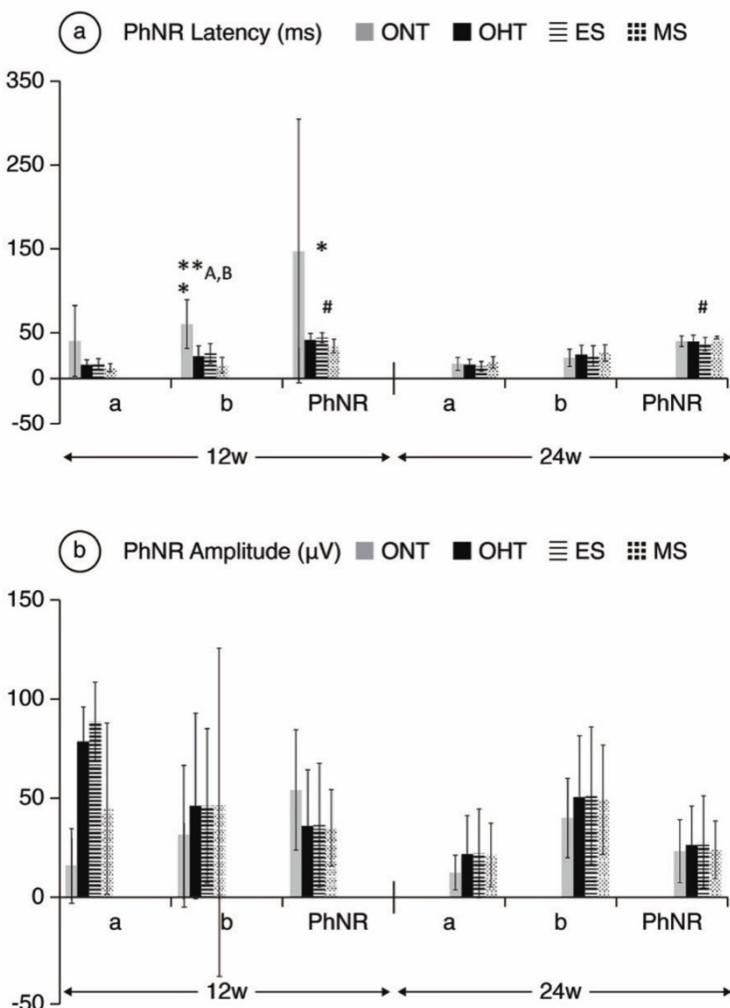
**Comparing ONT and OHT cohorts.** The ONT cohort presented wider variability in subject responses compared to the OHT cohort (Figures 4–6). In the OHT cohort, a stronger response was found in scotopic and photopic conditions in week 12, with shorter latencies (Figures 4a, 5a and 6a) and greater amplitudes (Figures 4b, 5b and 6b). However, maintenance of hypertension over time (week 24) decreased the electrical signal in the ERG, which almost matched the ONT values, especially in the later stages. **Comparing both OHT groups.** Generally, the MS groups exhibited faster latency and greater amplitude in week 12 in scotopic and photopic conditions, although this trend reversed in week 24.



**Figure 4.** a-wave electroretinographic response in both the ocular normotension and ocular hypertension cohorts and the ocular hypertension sub-groups at weeks 12 and 24. (a) a-latency in milliseconds of photoreceptors under scotopic conditions. (b) a-amplitude in microvolts of photoreceptors under scotopic conditions. Abbreviations: ONT: ocular normotension group; OHT: ocular hypertension group; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; w: week; ms: milliseconds;  $\mu$ V: microvolts; \*\*: statistical differences between groups (ONT vs. ES vs. MS) (Kruskal–Wallis); #: statistical differences between the ES and MS groups; A: statistical differences between ONT and ES; B: statistical differences between ONT and MS; C: statistical differences between ES and MS. Scotopic test (rod response): step 1:  $-40\text{ dB}, 0.0003\text{ cds/m}^2, 0.2\text{ Hz}$  (20 recordings averaged); step 2:  $-30\text{ dB}, 0.003\text{ cds/m}^2, 0.125\text{ Hz}$  (18 recordings averaged); step 3:  $-20\text{ dB}, 0.03\text{ cds/m}^2, 8.929\text{ Hz}$  (14 recordings averaged); step 4:  $-20\text{ dB}, 0.03\text{ cds/m}^2, 0.111\text{ Hz}$  (15 recordings averaged).



**Figure 5.** b-wave electroretinographic response in both the ocular normotension and ocular hypertension cohorts and the ocular hypertension sub-groups at weeks 12 and 24. (a) b-latency in milliseconds of intermediate cells under scotopic conditions. (b) b-amplitude in microvolts of intermediate cells under scotopic conditions. ONT: ocular normotension group; OHT: ocular hypertension group; ES: episceral sclerosis group; MS: microspheres group; w: week; ms: milliseconds;  $\mu$ V: microvolts; \*: statistical differences between the ONT and OHT cohorts. \*\*: statistical differences between groups (ONT vs. ES vs. MS) (Kruskal-Wallis); #: statistical differences between the ES and MS groups; A: statistical differences between ONT and ES; B: statistical differences between ONT and MS; step 1:  $-40$  dB,  $0.0003$   $\text{cds}/\text{m}^2$ ,  $0.2$  Hz (20 recordings averaged); step 2:  $-30$  dB,  $0.003$   $\text{cds}/\text{m}^2$ ,  $0.125$  Hz (18 recordings averaged); step 3:  $-20$  dB,  $0.03$   $\text{cds}/\text{m}^2$ ,  $8.929$  Hz (14 recordings averaged); step 4:  $-20$  dB,  $0.03$   $\text{cds}/\text{m}^2$ ,  $0.111$  Hz (15 recordings averaged).



**Figure 6.** PhNR wave electroretinographic response in both the ocular normotension and ocular hypertension cohorts and the ocular hypertension sub-groups at weeks 12 and 24. (a) PhNR latency of in milliseconds under photopic conditions. (b) PhNR amplitude in microvolts under photopic conditions. Abbreviations: ONT: ocular normotension group; OHT: ocular hypertension group; ES: episcleral sclerosis group; MS: microspheres group; w: week; ms: milliseconds;  $\mu$ V: microvolts; \*: statistical differences between the ONT and OHT cohorts. \*\*: statistical differences between groups (ONT vs. ES vs. MS) (Kruskal-Wallis); #: statistical differences between the ES and MS groups; A: Statistical differences between ONT and ES; B: Statistical differences between ONT and MS; C: Statistical differences between ES and MS. Photopic test: blue background 470 nm, 25  $\text{cds}/\text{m}^2$  and red LED flash 625 nm, 0.30  $\text{cds}/\text{m}^2$ , 1.199 Hz (20 recordings averaged).

#### 4. Discussion

The effects of ocular hypertension have been described in a multitude of short-term animal studies, generally up to a maximum of 8 weeks of follow-up [37,42–44]. This study analyzes the effect of chronic OHT maintained over time focusing the study between 8 and 24 weeks of chronicity. To our knowledge, this is the first retrospective longitudinal 24-week study carried out in young-adult Long-Evans rats *in vivo* using automatically segmented OCT images that analyze the effect of mild-moderate OHT (between 20–30 mmHg) on refraction from the neuroretinal perspective (structure and function) and employs two

different OHT-inducing models (ES vs. MS), in comparison to healthy controls. This allows us to analyze the neurodegenerative process in conditions of chronic OHT on myopia.

#### 4.1. Refractive Analysis

The total optic power of the eye depends on factors such as axial length, corneal power and lens power. At birth, human eyes are usually hyperopic, and afterwards there is a trend toward emmetropia as the cornea structure stabilizes, though axial length may continue to grow until the second decade. However, in high myopia there is continuous, progressive axial elongation throughout life, possibly due to genetic, environmental and behavioral factors [45,46]. Although all the mechanisms involved in this progressive enlargement of the eyeball are not completely understood, the effect of IOP on axial elongation of the posterior pole [47,48], the importance of sclera stiffness [49] and the dynamic responses of the sclera after a chronic increase in IOP [50] have been factors involved in the emmetropization process.

Ocular hypertension in congenital glaucoma occurs in developing loose tissue, meaning the sclera still exhibit great plasticity and stretch, increasing axial length [51]. This is similar to what occurs in high myopia [52,53], which supports the incidence of high myopia in adulthood [54]. When ocular hypertension occurs in older ages, scleral tissues are more rigid and stiffen [55], explaining the greater glaucomatous damage (IOP spikes are more poorly mitigated by less elastic sclera), the outward shift of the lamina cribrosa and remodeling of connective tissue [56], and the deeper anterior chamber described in both the ES model and DBA/2J glaucomatous mice (not observed in OHT models using cauterization, probably due to the experimental intervention itself) [57,58]. Indeed, there is increasing evidence about the development of delayed and sustained OHT associated with repeated intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections in retinal diseases, such as age-related macular degeneration [59,60]. Several structure optic nerve head manifestations after intravitreal volume injections have been lately described as a mechanical displacement of the optic nerve head and canal expansion, with a widening and deepening of the optic, a prelaminar tissue thinning and a Bruch membrane opening expansion, suggesting structural changes after IOP and volume increase in aged patients, with rigid sclera [61]. Our experiments started when the rats were 4 weeks old, so they should not be considered either adults or newborns, but young rats. The refractive status was likewise not consistent with high myopia ( $-6$  D) so, in our opinion, eye elongation was presumably more similar to what occurs in human POAG. Our OHT models supported the pre-existing evidence, as the ES cohort presented higher IOP, greater axonal damage, and lower dioptric power.

This study demonstrated the influence of sustained mild–moderate IOP on the emmetropization process. The baseline optical power was  $35.16 \pm 6.28$  D (as [62] reported), with a progressive trend toward emmetropia in both ONT and OHT eyes. However, the statistically significant correlations to refraction were found only with mild–moderate OHT at week 24 in both ES and MS models, and were not found with functional or structural alterations. Therefore, a chronic sustained increase in IOP was considered the main risk factor involved in the loss of refractive power in OHT eyes. In this regard, animal and human studies also correlated hypotensive treatments such as trabeculectomy [63] and topical drugs such as latanoprost [16] to a decrease in total axial length, although studies with drugs such as timolol showed inconsistencies in both human [18] and animal models [17]. One of the next steps worth studying in future prospective studies is the influence of prompt normalization of IOP on refraction in these OHT models as a possible treatment for myopia.

Nowadays, high myopia is increasingly prevalent in populations that carry out near-vision activities [64,65]. Sharp focus on a near image requires concomitant activation of both inferior and medial rectus muscles, and the subsequent compression of the eyeball by both muscles may cause an increase in IOP [66], similar to what happens in other compressive pathologies [67,68]. In addition, greatest drainage of aqueous humor occurs mainly via

the nasal and lower episcleral veins [69–73], so sustained compression of these muscles at these locations during near-vision activities for extended periods of time would increase IOP. Moreover, in childhood and early adulthood, when eye elongation is easily achieved as it is less rigid, refractive power may consequently decrease [74]. Indeed, lower dioptric power would require higher demand for more synkinesis accommodation/convergence, creating a vicious circle [75]. Current studies with atropine drops are showing promising results in controlling myopia by producing a reversible anti-accommodative effect [76,77], and the dose-dependent anti-muscarinic effect on the smooth muscles of the episcleral veins could also balance the outflow.

In this study, the ES model, in which the outflow of the episcleral veins is limited, induced higher IOP and higher negative dioptric power. MS model produced a progressive alteration of the trabecular meshwork due to the mechanical clogging [78], but in a slower and more progressive structural and functional damage, more similar to that of the human POAG, and a lower negative dioptric power [35]. Moreover, a trend toward higher dioptric power was found in females, as well as lower levels of IOP, attributed to estrogens [79]. Scleral stiffness depends on choroidal vascular factors, among others, so estrogens could contribute to vascular protection against peripapillary rigidity and posterior location of the optic nerve head, which could explain the higher myopia rates found in male rats.

To our knowledge, this is the first study that longitudinally monitors eye growth *in vivo* (by indirect study of optical power) using non-invasive, simple, objective OCT technology that demonstrates progressive myopization in glaucomatous rats, influenced by sex and the OHT-inducing model. Refractive study in small animals usually requires invasive, expensive or low-reliability techniques such as enucleation, magnetic resonance imaging or ultrasound biomicroscopy, respectively, which makes longitudinal studies with the same animal impracticable. Previous ocular biometric studies using OCT on healthy [80,81] and glaucomatous mice [50,82] have been performed. However, only one study of healthy rats measured biometrics *in vivo* using high-resolution A-scan ultrasonography [62], and no convincing evidence of emmetropization during normal eye development was detected. Similar results were found in this study, in which the ONT cohort never experienced negative optical power (myopia), unlike rats in the OHT cohort.

Analysis of refractive status constitutes a methodological limitation. As it was a retrospective study, it was not designed to analyze axial length, so the refractive status of the eye was measured with the OCT focuser, which improves image quality when acquiring OCT scans. The value obtained via this method is acceptable, but less accurate than axial length. Moreover, the use of a rigid contact lens for OCT imaging from which the retinal focusing data were obtained, introduces a tear lens, whose power will vary according to the mismatch between the fixed, posterior radius of curvature of the lens and anterior corneal radius, which can be expected to increase with age, and may also be altered in response to intracameral injections of MS. However, the lens was used in each examination, so the induced error would be constant, and the refractive trend found in our results would be constant throughout the study.

#### 4.2. Structural Analysis

A decrease in RNFL thickness is a common feature in both myopic [83] and glaucomatous patients, though RNFL segmentation errors in automated SD-OCT analysis are frequent in myopia [84]. The good correlation observed between GCL and RNFL analysis has surpassed total retinal quantification, and GCL analysis has emerged as a more appropriate imaging tool for detecting early glaucomatous progression in myopic patients [85].

When analyzing the R, RNFL and GCL values, OCT protocols were performed around the optic disc as rats do not have macula, so central values could lead to misinterpretations. This is one of the main reasons why correlations to human retina are limited. As regards general trends, differences in R thickness between the ONT and OHT cohorts were seen up to week 8, although they then decreased through week 24, possibly due to a neurodegener-

ative process, with an initial inflammatory response that causes an increase in thickness (activated microglia and other inflammatory mediators [31]), and a final atrophic pattern. The greater thickness found in external sectors of peripheral retina could be attributed to peripheral immune infiltration [31]. On the other hand, it is important to highlight that there were no correlations between refraction and R, GCL, and RNFL thicknesses. IOP was therefore the most important factor modifying retinal thickness, meaning that the RNFL thinning observed in the OHT cohorts in week 24 was secondary to neurodegeneration rather than a stretching of the retinal tissue. Hence, OCT has demonstrated its reliability when analyzing retinal structures in neurodegenerative diseases [28], even during the emmetropization process.

Comparing both OHT groups, the ES group exhibited thicker R, RNFL and GCL values at week 8, but the thickness loss rate was also higher over time, reaching the lowest thickness at the end of follow-up. As this cohort suffered from higher IOP levels, these eyes could have suffered intense damage (a more extreme response) at GCL level that explains this drop. Conversely, RNFL analysis of the OHT cohorts showed an initial increase in thickness until week 12, after which the trend reversed in both groups, although it did so more dramatically in the ES group, supporting this theory.

The lack of histological studies is the main handicap of structural analysis, but several studies reflected the good correlation between immunohistochemistry and OCT thicknesses, making SD-OCT reliable for research in retinal degeneration [28]. Another limitation of this study was not having considered the lateral magnification that occurs as the anterior chamber increases, which overstates the retinal thickness. Most myopic eyes may therefore have even smaller retinal thicknesses [86].

#### 4.3. Functional Analysis

ERG showed supranormal responses in the OHT cohorts, especially in the MS group in week 12. These outcomes were also observed in other animal studies with acute [43,47] and chronic [48] non-ischemic increases in IOP. This noxa could lead to initial hyperstimulation of the neuronal structures, especially bipolar and intermediate cells, while the process is neither ischemic nor chronic. In other words, we are possibly witnessing the beginning of the disease in an early or even reversible phase. However, this initially stronger electrical response disappeared at week 24, suggesting the decline of this phenomenon, probably due to ischemia or neurodegenerative damage, as occurs in POAG. It has also been hypothesized that the supranormal ERG responses could be related to the increase in illuminated retinal area during the test (greater axial length means greater retinal area, compared to normal axial length), though this hypothesis could not explain all the ERG findings [44], among them the fact that the supranormal electrical response is not sustained over time, but only when the eye is more hyperopic (in early phases of the study). In contrast, human studies showed a negative correlation between axial length (but not refractive error) and the values of ERG responses in healthy adults [20,87], as occurs here at later stages. This pattern of electrical response was more extreme in the MS group and was consistent throughout the steps, showing a coherent pattern of electrical behavior in photoreceptor and bipolar cells. However, because the ES model is more aggressive, this suprasignal could have occurred before week 12 in the ES model. We may therefore have witnessed an ongoing decay phase.

This functional behavior could be somehow correlated to the structural OCT findings of this study. At week 12, the GCL and RNFL are not as damaged, and their status is reversible, which could be correlated to the ERG hyperresponsive pattern. This could be supported by a previous study (also using Long–Evans rats) with a similar electrical pattern after chronic IOP elevation (by circumlimbal suture) that returned to baseline after suture removal [88]. This functional damage was not correlated with structural damage to GCL density, but with a reduction in the RNFL in week 15 in the post-hoc analysis [88]. Again, it is important to note that the only parameter that was statistically correlated to the refraction

was IOP > 20 mmHg, not the ERG parameters. Our results therefore suggest that refractive status also appears to be an independent factor for ERG tests when analyzing POAG.

## 5. Conclusions

In this article, we pointed out the relationship between ocular hypertension and refraction over time. Visual disturbances in glaucomatous patients could also be associated with a progressive negative refractive error, in addition to the neurodegenerative damage associated with glaucoma, so frequent assessment of refraction may be important in these patients over time. The study of functional and structural tests in early and late stages in two different POAG models produced a deeper understanding of the pathophysiological retinal damage caused by the increase in IOP, with an initial increase in electrical signal associated with a thickening pattern detected using OCT, followed by functional and structural impairment. In addition, the lack of correlation between the refractive status of the eye and the structure and function of the retina provided further insight into the usefulness of OCT and ERG in relation to the emmetropia process.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10163697/s1>, Table S1: Baseline characteristics of the study.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.R., L.E.P. and E.G.-M.; methodology, M.J.R., S.M.-M. and E.G.-M.; software, E.G.-M.; validation, M.J.R., and E.G.-M.; formal analysis E.G.-M.; investigation, S.M.-M., T.M.-R., M.S., M.J.R.; resources, L.E.P., J.G.F., I.B.-O., R.H.-V., E.G.-M.; data curation, S.M.-M., T.M.-R., M.S., M.J.R., D.G.-H.; writing—original draft preparation, S.M.-M.; writing—review and editing, S.M.-M. and M.J.R.; visualization, S.M.-M. and M.J.R.; supervision, E.G.-M., M.J.R.; project administration, E.G.-M., L.E.P., M.J.R.; funding acquisition, E.G.-M., L.E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Rio Hortega Research Grants M17/00213, PI17/01726, PI17/01946 and PI20/00437 (Carlos III Health Institute), and by MAT2017-83858-C2-2, MAT2017-83858-C2-1 and PID2020-113281RB-C2-2 MINECO/AEI/ERDF, EU, UCM Research Group 920415, ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” RETICS Oftared, RD16/0008/0004, RD16/0008/0009, and RD16/0008/029. D.G.H. acknowledges a UCM-Santander fellowship (CT17/17-CT17-18).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee for Animal Research (PI34/17) and were carried out in strict accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology’s Statement for the use of Animals.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data are available only upon request to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Agis Investigators. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am. J. Ophthalmol.* **2000**, *130*, 429–440. [[CrossRef](#)]
- Shim, S.H.; Sung, K.R.; Kim, J.M.; Kim, H.T.; Jeong, J.; Kim, C.Y.; Lee, M.Y.; Park, K.H. Korean Ophthalmological Society the Prevalence of Open-Angle Glaucoma by Age in Myopia: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Curr. Eye Res.* **2017**, *42*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wong, T.Y.; Klein, B.E.K.; Klein, R.; Knudtson, M.; Lee, K.E. Refractive errors, intraocular pressure, and glaucoma in a white population. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 211–217. [[CrossRef](#)]
- Xu, L.; Wang, Y.; Wang, S.; Wang, Y.; Jonas, J.B. High myopia and glaucoma susceptibility the Beijing Eye Study. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 216–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ikuno, Y. Overview of the Complications of High Myopia. *Retina* **2017**, *37*, 2347–2351. [[CrossRef](#)]
- Saw, S.M.; Gazzard, G.; Shin-Yen, E.C.; Chua, W.H. Myopia and associated pathological complications. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2005**, *25*, 381–391. [[CrossRef](#)]

7. Holden, B.A.; Fricke, T.R.; Wilson, D.A.; Jong, M.; Naidoo, K.S.; Sankaridurg, P.; Wong, T.Y.; Naduvilath, T.J.; Resnikoff, S. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 1036–1042. [[CrossRef](#)]
8. Kim, T.-W.; Kim, M.; Weinreb, R.N.; Woo, S.J.; Park, K.H.; Hwang, J.-M. Optic Disc Change with Incipient Myopia of Childhood. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 21.e3–26.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ng, D.S.C.; Cheung, C.Y.L.; Luk, F.O.; Mohamed, S.; Brelen, M.E.; Yam, J.C.S.; Tsang, C.W.; Lai, T.Y.Y. Advances of optical coherence tomography in myopia and pathologic myopia. *Eye* **2016**, *30*, 901–916. [[CrossRef](#)]
10. Leung, C.K.S.; Mohamed, S.; Leung, K.S.; Cheung, C.Y.L.; Chan, S.L.W.; Cheng, D.K.Y.; Lee, A.K.C.; Leung, G.Y.O.; Rao, S.K.; Lam, D.S.C. Retinal nerve fiber layer measurements in myopia: An optical coherence tomography study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 5171–5176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Schmid, K.L.; Hills, T.; Abbott, M.; Humphries, M.; Pyne, K.; Wildsoet, C.F. Relationship between intraocular pressure and eye growth in chick. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2003**, *23*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Read, S.A.; Collins, M.J.; Annis-Brown, T.; Hayward, N.M.; Lillyman, K.; Sherwin, D.; Stockall, P. The short-term influence of elevated intraocular pressure on axial length. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2011**, *31*, 398–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tokoro, T.; Funata, M.; Akazawa, Y. Influence of intraocular pressure on axial elongation. *J. Ocul. Pharmacol.* **1990**, *6*, 285–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. McBrien, N.A.; Jobling, A.I.; Gentle, A. Biomechanics of the Sclera in Myopia: Extracellular and Cellular Factors. *Optom. Vis. Sci.* **2009**, *86*, E23–E30. [[CrossRef](#)]
15. McMonnies, C.W. An examination of the baropathic nature of axial myopia. *Clin. Exp. Optom.* **2014**, *97*, 116–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. El-Nimri, N.W.; Wildsoet, C.F. Effects of topical latanoprost on intraocular pressure and myopia progression in young guinea pigs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 2644–2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schmid, K.L.; Abbott, M.; Humphries, M.; Pyne, K.; Wildsoet, C.F. Timolol lowers intraocular pressure but does not inhibit the development of experimental myopia in chick. *Exp. Eye Res.* **2000**, *70*, 659–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Huang, J.; Wen, D.; Wang, Q.; McAlinden, C.; Flitcroft, I.; Chen, H.; Saw, S.M.; Chen, H.; Bao, F.; Zhao, Y.; et al. Efficacy comparison of 16 interventions for myopia control in children: A network meta-analysis. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 697–708. [[CrossRef](#)]
19. Patel, N.B.; Garcia, B.; Harwerth, R.S. Influence of anterior segment power on the scan path and RNFL thickness using SD-OCT. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 5788–5798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sachidanandam, R.; Ravi, P.; Sen, P. Effect of axial length on full-field and multifocal electroretinograms. *Clin. Exp. Optom.* **2017**, *100*, 668–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Biswas, S.; Lin, C.; Leung, C.K.S. Evaluation of a myopic normative database for analysis of retinal nerve fiber layer thickness. *JAMA Ophthalmol.* **2016**, *134*, 1032–1039. [[CrossRef](#)]
22. Biswas, S.; Jhanji, V.; Leung, C.K.S. Prevalence of glaucoma in myopic corneal refractive surgery candidates in Hong Kong China. *J. Refract. Surg.* **2016**, *32*, 298–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shoji, T.; Nagaoaka, Y.; Sato, H.; Chihara, E. Impact of high myopia on the performance of SD-OCT parameters to detect glaucoma. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 1843–1849. [[CrossRef](#)]
24. Neufeld, A.H.; Gachie, E.N. The inherent, age-dependent loss of retinal ganglion cells is related to the lifespan of the species. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 167–172. [[CrossRef](#)]
25. Harman, A.M.; MacDonald, A.; Meyer, P.; Ahmat, A. Numbers of neurons in the retinal ganglion cell layer of the rat do not change throughout life. *Gerontology* **2003**, *49*, 350–355. [[CrossRef](#)]
26. Levkovich-Verbin, H.; Vander, S.; Makarovskiy, D.; Lavinsky, F. Increase in retinal ganglion cells' susceptibility to elevated intraocular pressure and impairment of their endogenous neuroprotective mechanism by age. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 2011–2022. [[PubMed](#)]
27. Rodrigo, M.J.; Martinez-Rincon, T.; Subias, M.; Mendez-Martinez, S.; Luna, C.; Pablo, L.E.; Polo, V.; Garcia-Martin, E. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. *Exp. Eye Res.* **2020**, *200*, 108208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cuenca, N.; Fernández-Sánchez, L.; Sauvé, Y.; Segura, F.J.; Martínez-Navarrete, G.; Tamarit, J.M.; Fuentes-Broto, L.; Sanchez-Cano, A.; Pinilla, I. Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front. Neuroanat.* **2014**, *8*, 1–20. [[CrossRef](#)]
29. Garcia-Martin, E.; Pablo, L.E.; Bambo, M.P.; Alarcia, R.; Polo, V.; Larrosa, J.M.; Vilades, E.; Cameo, B.; Orduna, E.; Ramirez, T.; et al. Comparison of peripapillary choroidal thickness between healthy subjects and patients with Parkinson's disease. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177163. [[CrossRef](#)]
30. Garcia-Martin, E.; Pueyo, V.; Martin, J.; Almarcegui, C.; Ara, J.R.; Dolz, I.; Honrubia, F.M.; Fernandez, F.J. Progressive changes in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Ophthalmol.* **2010**, *20*, 167–173. [[CrossRef](#)]
31. Ramirez, A.I.; de Hoz, R.; Salobrar-Garcia, E.; Salazar, J.J.; Rojas, B.; Ajoy, D.; López-Cuenca, I.; Rojas, P.; Triviño, A.; Ramírez, J.M. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Parisi, V. Correlation between morphological and functional retinal impairment in patients affected by ocular hypertension, glaucoma, demyelinating optic neuritis and Alzheimer's disease. *Semin. Ophthalmol.* **2003**, *18*, 50–57. [CrossRef]
33. Chouhan, A.K.; Guo, C.; Hsieh, Y.-C.; Ye, H.; Senturk, M.; Zuo, Z.; Li, Y.; Chatterjee, S.; Botas, J.; Jackson, G.R.; et al. Uncoupling neuronal death and dysfunction in Drosophila models of neurodegenerative disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2016**, *4*, 62. [CrossRef] [PubMed]
34. Moschos, M.M.; Markopoulos, I.; Chatziralli, I.; Rouvas, A.; Papageorgiou, S.G.; Ladas, I.; Vassilopoulos, D. Structural and Functional Impairment of the Retina and Optic Nerve in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 782–788. [CrossRef] [PubMed]
35. Rodrigo, M.J.; Garcia-Herranz, D.; Subias, M.; Martinez-Rincón, T.; Mendez-Martínez, S.; Bravo-Osuna, I.; Carretero, A.; Ruberte, J.; Garcia-Feijoo, J.; Pablo, L.E.; et al. Chronic Glaucoma Using Biodegradable Microspheres to Induce Intraocular Pressure Elevation. Six-Month Follow-Up. *Biomedicines* **2021**, *9*, 682. [CrossRef]
36. Morrison, J.C.; Moore, C.G.; Deppmeier, L.M.H.; 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]
37. Garcia-Herranz, D.; Rodrigo, M.J.; Subias, M.; Martinez-Rincon, T.; Mendez-Martinez, S.; Bravo-Osuna, I.; Bonet, A.; Ruberte, J.; Garcia-Feijoo, J.; Pablo, L.; et al. Novel Use of PLGA Microspheres to Create an Animal Model of Glaucoma with Progressive Neuroretinal Degeneration. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 237. [CrossRef]
38. Rodrigo, M.J.; Cardiel, M.J.; Fraile, J.M.; Mendez-Martinez, S.; Martinez-Rincon, T.; Subias, M.; Polo, V.; Ruberte, J.; Ramirez, T.; Vispe, E.; et al. Brimonidine-LAPONITE® intravitreal formulation has an ocular hypotensive and neuroprotective effect throughout 6 months of follow-up in a glaucoma animal model. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 6246–6260. [CrossRef]
39. Ding, C.; Wang, P.; Tian, N. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp. Eye Res.* **2011**, *92*, 512–520. [CrossRef]
40. Nadal-Nicolás, F.M.; Vidal-Sanz, M.; Agudo-Barriuso, M. The aging rat retina: From function to anatomy. *Neurobiol. Aging* **2018**, *61*, 146–168. [CrossRef]
41. Liu, X.; Wang, C.H.; Dai, C.; Camesa, A.; Zhang, H.F.; Jiao, S. Effect of contact lens on optical coherence tomography imaging of rodent retina. *Curr. Eye Res.* **2013**, *38*, 1235–1240. [CrossRef] [PubMed]
42. Pang, I.H.; Clark, A.F. Inducible rodent models of glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, *75*. [CrossRef]
43. Choh, V.; Gurdita, A.; Tan, B.; Prasad, R.C.; Bizheva, K.; Joos, K.M. Short-term moderately elevated intraocular pressure is associated with elevated scotopic electroretinogram responses. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 2140–2151. [CrossRef] [PubMed]
44. Tan, B.; Gurdita, A.; Choh, V.; Joos, K.M.; Prasad, R.; Bizheva, K. Morphological and functional changes in the rat retina associated with 2 months of intermittent moderate intraocular pressure elevation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7727. [CrossRef] [PubMed]
45. Summers Rada, J.A.; Shelton, S.; Norton, T.T. The sclera and myopia. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 185–200. [CrossRef] [PubMed]
46. Harper, A.R.; Summers, J.A. The Dynamic Sclera: Extracellular Matrix Remodeling in Normal Ocular Growth and Myopia Development. *Exp. Eye Res.* **2015**, *133*, 100–111. [CrossRef] [PubMed]
47. Tan, B.; MacLellan, B.; Mason, E.; Bizheva, K. Structural, functional and blood perfusion changes in the rat retina associated with elevated intraocular pressure, measured simultaneously with a combined OCT+ERG system. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193592. [CrossRef]
48. Frankfort, B.J.; Kareem Khan, A.; Tse, D.Y.; Chung, I.; Pang, J.J.; Yang, Z.; Gross, R.L.; Wu, S.M. Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 762–770. [CrossRef] [PubMed]
49. Campbell, I.C.; Hannon, B.G.; Read, A.T.; Sherwood, J.M.; Schwaner, S.A.; Ethier, C.R. Quantification of the efficacy of collagen cross-linking agents to induce stiffening of rat sclera. *J. R. Soc. Interface* **2017**, *14*, 20170014. [CrossRef]
50. Cone-Kimball, E.; Nguyen, C.; Oglesby, E.N.; Pease, M.E.; Steinhart, M.R.; Quigley, H.A. Scleral structural alterations associated with chronic experimental intraocular pressure elevation in mice. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 2023–2039.
51. Pruett, R.C. Progressive myopia and intraocular pressure: What is the linkage? A literature review. *Acta Ophthalmol. Suppl.* **1988**, *185*, 117–127. [CrossRef]
52. Shen, L.; You, Q.S.; Xu, X.; Gao, F.; Zhang, Z.; Li, B.; Jonas, J.B. Scleral and Choroidal Thickness in Secondary High Axial Myopia. *Retina* **2016**, *36*, 1579–1585. [CrossRef]
53. Jonas, J.B.; Holbach, L.; Panda-Jonas, S. Histologic differences between primary high myopia and secondary high myopia due to congenital glaucoma. *Acta Ophthalmol.* **2016**, *94*, 147–153. [CrossRef]
54. Yassin, S.A. Long-Term Visual Outcomes in Children with Primary Congenital Glaucoma. *Eur. J. Ophthalmol.* **2017**, *27*, 705–710. [CrossRef]
55. 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]
56. Downs, J.C. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. *Exp. Eye Res.* **2015**, *133*, 19–29. [CrossRef] [PubMed]
57. Nissirios, N.; Chanis, R.; Johnson, E.; Morrison, J.; Cepurna, W.O.; Jia, L.; Mittag, T.; Danias, J. Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: An ultrasound biomicroscopic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 2478–2482. [CrossRef]

58. Morrison, J.C.; Cepurna, W.O.; Johnson, E.C. Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 23–32. [CrossRef]
59. Sudhalkar, A.; Bilgic, A.; Vasavada, S.; Kodjikian, L.; Mathis, T.; De Ribot, F.M.; Papakostas, T.; Vasavada, V.; Vasavada, V.; Srivastava, S.; et al. Current intravitreal therapy and ocular hypertension: A review. *Indian J. Ophthalmol.* **2021**, *69*, 236–243. [CrossRef] [PubMed]
60. Hoguet, A.; Chen, P.P.; Junk, A.K.; Mruthyunjaya, P.; Nouri-Mahdavi, K.; Radhakrishnan, S.; Takusagawa, H.L.; Chen, T.C. The Effect of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents on Intraocular Pressure and Glaucoma: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 611–622. [CrossRef] [PubMed]
61. Rebolledo, G.; Puerto, B.; De Juan, V.; Gómez-Mariscal, M.; Muñoz-Negrete, F.J.; Casado, A. Optic nerve head biomechanic and IOP changes before and after the injection of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 5688–5695. [CrossRef] [PubMed]
62. Guggenheim, J.A.; Creer, R.C.; Qin, X.J. Postnatal refractive development in the Brown Norway rat: Limitations of standard refractive and ocular component dimension measurement techniques. *Curr. Eye Res.* **2004**, *29*, 369–376. [CrossRef]
63. Usui, S.; Ikuno, Y.; Uematsu, S.; Morimoto, Y.; Yasuno, Y.; Otori, Y. Changes in axial length and choroidal thickness after intraocular pressure reduction resulting from trabeculectomy. *Clin. Ophthalmol.* **2013**, *7*, 1155–1161. [CrossRef] [PubMed]
64. Leo, S.W. Scientific Bureau of World Society of Paediatric Ophthalmology and Strabismus (WSPOS) Current approaches to myopia control. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2017**, *28*, 267–275. [CrossRef] [PubMed]
65. Spillmann, L. Stopping the rise of myopia in Asia. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2020**, *258*, 943–959. [CrossRef]
66. De Jong, P.T.V.M. Myopia: Its historical contexts. *Br. J. Ophthalmol.* **2018**, *102*, 1021–1027. [CrossRef]
67. Kalman, R.; Mourits, M.P. Prevalence and management of elevated intraocular pressure in patients with Graves' orbitopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **1998**, *82*, 754–757. [CrossRef]
68. Kim, W.S.; Chun, Y.S.; Cho, B.Y.; Lee, J.K. Biometric and refractive changes after orbital decompression in Korean patients with thyroid-associated orbitopathy. *Eye* **2016**, *30*, 400–405. [CrossRef]
69. Huang, A.S.; Li, M.; Yang, D.; Wang, H.; Wang, N.; Weinreb, R.N. Aqueous Angiography in Living Nonhuman Primates Shows Segmental, Pulsatile, and Dynamic Angiographic Aqueous Humor Outflow. *Ophthalmology* **2017**, *124*, 793–803. [CrossRef] [PubMed]
70. Huang, A.S.; Francis, B.A.; Weinreb, R.N. Structural and functional imaging of aqueous humour outflow: A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2018**, *46*, 158–168. [CrossRef] [PubMed]
71. Huang, A.S.; Camp, A.; Xu, B.Y.; Penteado, R.C.; Weinreb, R.N.; Huang, A. Aqueous Angiography: Aqueous Humor Outflow Imaging in Live Human Subjects HHS Public Access. *Ophthalmology* **2017**, *124*, 1249–1251. [CrossRef] [PubMed]
72. Lin, K.Y.; Mosaed, S. Ab externo imaging of human episcleral vessels using fiberoptic confocal laser endomicroscopy. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **2019**, *14*, 275–284. [CrossRef]
73. Khatib, T.Z.; Meyer, P.A.R.; Lusthaus, J.; Manyakin, I.; Mushtaq, Y.; Martin, K.R. Hemoglobin Video Imaging Provides Novel In Vivo High-Resolution Imaging and Quantification of Human Aqueous Outflow in Patients with Glaucoma. *Ophthalmol. Glaucoma* **2019**, *2*, 327–335. [CrossRef] [PubMed]
74. Jensen, H. Myopia progression in young school children and intraocular pressure. *Doc. Ophthalmol.* **1992**, *82*, 249–255. [CrossRef] [PubMed]
75. Greene, P.R. Mechanical considerations in myopia: Relative effects of accommodation, convergence, intraocular pressure, and the extraocular muscles. *Am. J. Optom. Physiol. Opt.* **1980**, *57*, 902–914. [CrossRef] [PubMed]
76. Lee, C.-Y.; Sun, C.-C.; Lin, Y.-F.; Lin, K.-K. Effects of topical atropine on intraocular pressure and myopia progression: A prospective comparative study. *BMC Ophthalmol.* **2016**, *16*, 114. [CrossRef]
77. Yam, J.C.; Jiang, Y.; Tang, S.M.; Law, A.K.P.; Chan, J.J.; Wong, E.; Ko, S.T.; Young, A.L.; Tham, C.C.; Chen, L.J.; et al. Low-Concentration Atropine for Myopia Progression (LAMP) Study: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial of 0.05%, 0.025%, and 0.01% Atropine Eye Drops in Myopia Control. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 113–124. [CrossRef]
78. Biswas, S.; Wan, K.H. Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmol.* **2019**, *97*, e331–e340. [CrossRef]
79. Schmidl, D.; Schmetterer, L.; Garhöfer, G.; Popa-Cherecheanu, A. Gender Differences in Ocular Blood Flow. *Curr. Eye Res.* **2015**, *40*, 201–212. [CrossRef]
80. Zhou, X.; Xie, J.; Shen, M.; Wang, J.; Jiang, L.; Qu, J.; Lu, F. Biometric measurement of the mouse eye using optical coherence tomography with focal plane advancement. *Vis. Res.* **2008**, *48*, 1137–1143. [CrossRef]
81. Jiang, M.; Wu, P.C.; Fini, M.E.; Tsai, C.L.; Itakura, T.; Zhang, X.; Jiao, S. Single-shot dimension measurements of the mouse eye using SD-OCT. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging* **2012**, *43*, 252–256. [CrossRef] [PubMed]
82. Chou, T.H.; Kocaoglu, O.P.; Borja, D.; Ruggeri, M.; Uhlhorn, S.R.; Manns, F.; Porciatti, V. Postnatal elongation of eye size in DBA/2J mice compared with C57BL/6J mice: In vivo analysis with whole-eye OCT. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 3604–3612. [CrossRef] [PubMed]
83. Hsu, C.-H.; Chen, R.I.; Lin, S.C. Myopia and glaucoma: Sorting out the difference. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2015**, *26*, 90–95. [CrossRef] [PubMed]
84. Suwan, Y.; Rettig, S.; Park, S.C.; Tantraworasin, A.; Geyman, L.S.; Effert, K.; Silva, L.; Jarukasetphorn, R.; Ritch, R. Effects of Circumpapillary Retinal Nerve Fiber Layer Segmentation Error Correction on Glaucoma Diagnosis in Myopic Eyes. *J. Glaucoma* **2018**, *27*, 1. [CrossRef]

- 
- 85. Kansal, V.; Armstrong, J.J.; Pintwala, R.; Hutnik, C. Optical coherence tomography for glaucoma diagnosis: An evidence based meta-analysis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190621. [[CrossRef](#)]
  - 86. Lozano, D.C.; Twa, M.D. Development of a rat schematic eye from in vivo biometry and the correction of lateral magnification in SD-OCT imaging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 6446–6455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  - 87. Westall, C.A.; Dhaliwal, H.S.; Panton, C.M.; Sigesmun, D.; Levin, A.V.; Nischal, K.K.; Héon, E. Values of electroretinogram responses according to axial length. *Doc. Ophthalmol.* **2001**, *102*, 115–130. [[CrossRef](#)]
  - 88. Liu, H.-H.; He, Z.; Nguyen, C.T.O.; Vingrys, A.J.; Bui, B.V. Reversal of functional loss in a rat model of chronic intraocular pressure elevation. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2017**, *37*, 71–81. [[CrossRef](#)]

**9.3 ARTÍCULO 3: Influence of sex on neuroretinal degeneration: 6-month follow-up in rats with chronic glaucoma.**

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Pablo LE, Polo V, Aragon-Navas A, Garcia-Herranz D, Garcia Feijoo J, Bravo Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E.*

*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2021;62(13):9.

DOI: 10.1167/iovs.62.13.9 ISSN: 2077-0383

ISSN: 0146-0404

PMID: 34643665

Factor de impacto (JCR 2020):4,799.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2020. 8/62 (Cuartil 1)

## Influence of Sex on Neuroretinal Degeneration: Six-Month Follow-Up in Rats With Chronic Glaucoma

Maria J. Rodrigo,<sup>1–3</sup> Teresa Martinez-Rincon,<sup>1,2</sup> Manuel Subias,<sup>1,2</sup> Silvia Mendez-Martinez,<sup>1,2</sup> Luis E. Pablo,<sup>1–3</sup> Vicente Polo,<sup>1,2</sup> Alba Aragon-Navas,<sup>4,5</sup> David Garcia-Herranz,<sup>4,5</sup> Julian García Feijoo,<sup>3,5,6</sup> Irene Bravo Osuna,<sup>3–5,7</sup> Rocio Herrero-Vanrell,<sup>3–5,7</sup> and Elena Garcia-Martin<sup>1–3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

<sup>2</sup>Miguel Servet Ophthalmology Research Group (GIMSO), Aragon Health Research Institute (IIS Aragon), University of Zaragoza, Spain

<sup>3</sup>National Ocular Pathology Network (OFTARED), Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Ophthalmology Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development (InnOftal) Research Group, UCM 920415, Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Health Research Institute, San Carlos Clinical Hospital (IdISSC), Madrid, Spain

<sup>6</sup>Department of Ophthalmology, San Carlos Clinical Hospital, UCM, Madrid, Spain

<sup>7</sup>University Institute for Industrial Pharmacy (IUIF), School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence: Elena Garcia-Martin, C/ Padre Arrupe, Servicio de Oftalmología, Edificio de consultas externas, planta 1, 50009 Zaragoza (Spain); [egmvivax@yahoo.com](mailto:egmvivax@yahoo.com).

Received: June 16, 2021

Accepted: September 7, 2021

Published: October 13, 2021

Citation: Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of sex on neuroretinal degeneration: Six-month follow-up in rats with chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2021;62(13):9. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.13.9>

**PURPOSE.** To evaluate differences by sex in the neuroretina of rats with chronic glaucoma over 24 weeks of follow-up, and to assess by sex the influence on neurodegeneration of different methods of inducing ocular hypertension.

**METHODS.** Forty-six Long-Evans rats—18 males and 28 females—with induced chronic glaucoma were analyzed. Glaucoma was achieved via 2 models: repeatedly sclerosing the episcleral veins (9 male/14 female) or by injecting poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres measuring 20 to 10 µm (Ms20/10) into the anterior chamber (9 male/14 female). The IOP was measured weekly by tonometer; neuroretinal function was recorded by dark/light-adapted electroretinography at baseline and weeks 12 and 24; and structure was analyzed by optical coherence tomography using the retina posterior pole, retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer protocols at baseline and weeks 8, 12, 18, and 24.

**RESULTS.** Males showed statistically significant ( $P < 0.05$ ) higher IOP in both chronic glaucoma models, and greater differences were found in the episcleral model at earlier stages. Males with episclerally induced glaucoma showed a statistically higher increase in retinal thickness in optical coherence tomography recordings than females and also when comparing Ms20/10 at 12 weeks. Males showed a higher percentage of retinal nerve fiber layer thickness loss in both models. Ganglion cell layer thickness loss was only detected in the Ms20/10 model. Males exhibited worse dark/light-adapted functionality in chronic glaucoma models, which worsened in the episcleral sclerosis model at 12 weeks, than females.

**CONCLUSIONS.** Female rats with chronic glaucoma experienced lower IOP and structural loss and better neuroretinal functionality than males. Sex and the ocular hypertension-inducing method influenced neuroretinal degeneration.

Keywords: sex, glaucoma, retina, neurodegeneration, PLGA microspheres, animal model

**T**raditionally, the eye was considered a sex-neutral organ. Recent publications, however, have evidenced male/female sex divergence. There are sex steroid receptors in nearly every part of the eye<sup>1,2</sup> and even the retina synthesizes neuroestrogens via aromatase enzymes.<sup>3</sup> Differences in ocular blood flow were found between sexes,<sup>4</sup> and variations in the optic nerve head were described according to phase of menstrual cycle and were correlated to hormonal levels.<sup>5,6</sup> Premenopausal females showed better recordings by perimetry<sup>7</sup> and electroretinography

(ERG).<sup>8</sup> Physiological ophthalmologic changes caused by hyperestrogenism are also described in pregnancy.<sup>9–11</sup> Moreover, a clear tendency to gender difference is found in ophthalmologic,<sup>12,13</sup> neuropsychiatric, and neurodevelopmental pathologies with immune system implications<sup>14,15</sup> and modulation of aging-linked genes influenced by sex.<sup>16,17</sup>

Glaucoma is the second biggest cause of blindness worldwide and will affect 111.8 million people by 2040.<sup>18</sup> Glaucoma is considered an aging-linked pathology caused by progressive death of retinal ganglion cells (RGCs). The IOP



is the major modifiable risk factor, with other well-known nonmodifiable factors being age and race.<sup>19</sup> However, there are discrepancies regarding gender in the literature.<sup>20</sup> There is evidence of higher incidence of POAG in men (adjusted by age),<sup>18</sup> although the higher prevalence and risk of blindness are found in elderly women, possibly owing to their increased life-expectancy.<sup>21</sup> Nonetheless, ophthalmic research data on sex differences in glaucoma remain scarce.

The protective effect of estrogens on cardiovascular areas is widely known and it has been suggested that they have a similar effect on the eye, delaying the start of glaucomatous pathology.<sup>13</sup> In fact, the risk of POAG increases in conditions of low estrogenic exposure, such as late menarche onset, early menopause, or polycystic ovarian syndrome<sup>13,22</sup> and better ophthalmologic parameters were found in studies with hormone replacement therapy, although its use is not recommended.<sup>20,23–25</sup> Estrogens, and especially 17 $\beta$  estradiol, activate endothelial nitric oxide (NO) synthase, which diminishes vascular resistance, increases blood flow in the optic nerve<sup>26</sup> and decreases the IOP. All of these effects of estrogens could explain the increase in IOP occurring after the onset of menopause,<sup>27</sup> when estrogenic hormone levels decrease abruptly. Furthermore, estrogens exert a protective effect on the extracellular matrix of the trabecular meshwork and lamina cribrosa.<sup>28</sup> In contrast, estrogens act as an endogenous neuroprotector owing to their chemical properties and phenolic ring,<sup>29,30</sup> helping to maintain RGC viability<sup>31,32</sup> and intraretinal synapsis.<sup>12,33</sup> Neuroprotection exerted by estrogens has been demonstrated by topical, intravitreal and systemic administration in animal studies,<sup>34–36</sup> even under conditions of induced ocular hypertension (OHT).

Sex equity in animal studies has been recently recommended on ethical grounds. Moreover, there is growing interest in increasing knowledge about the influence of sex on aging and aging-linked pathologies such as glaucoma.<sup>37</sup> Most animal glaucoma studies are performed by inducing OHT, but usually only 1 sex is used. Moreover, even when both sexes are used, differences between them are not analyzed.

To our knowledge, this study is the first to analyze differences by sex in IOP and neuroretinal structure and function under conditions of chronic glaucoma in 2 different OHT models. We demonstrate that females showed physiological protection because they suffered from lower OHT and less structural and functional neuroretinal damage than age-matched males at an early stage of chronic glaucoma. We also showed that the induced model used to increase IOP influenced sex-dependent neuroretinal degeneration. We therefore suggest our outcomes be considered in future studies into neurodegeneration and protection.

## METHODS

### Animals

All work with animals was approved by the Ethics Committee for Animal Research (PI34/17) and was carried out in strict accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology's Statement on the Use of Animals at the Biomedical Research Center of Aragon (CIBA: *Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón*). Long-Evans rats at 4 weeks of age and weighing 50 to 100 g at the beginning of the study were housed in standard cages. To keep the same animals together throughout the study, and to preserve the animals' welfare, a maximum of either 3 males or 4 females were placed in each cage and given environmental enrich-

ment and water and food ad libitum. They were kept under animal welfare conditions (e.g., a 12-hour dark-light cycled room, temperature of 22 °C, and relative humidity of 55%). Body weight was measured periodically to calculate anesthetic dosage.

A total of 46 animals were used: 18 males and 28 females. Chronic glaucoma models were induced using 2 OHT methods. OHT was induced by biweekly sclerosing injections of the episcleral veins (EPI model), as described by Morrison et al.<sup>38</sup> in 23 rats (9 male/14 female). In the other 23 rats (9 male/14 female), OHT was induced by injecting a suspension of Ms20/10 (10% w/v) into the anterior chamber of the eye (Ms20/10 model) at baseline, doing so biweekly for the first month and then once monthly until week 20, as described by Rodrigo et al.<sup>39</sup> The Ms were made of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) according to the oil in water emulsion solvent extraction-evaporation technique previously described by Garcia-Herranz et al.<sup>40</sup> and were prepared by the Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology (InnOftal) Research Group (Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain). All OHT injections were performed in the right eye under surgical conditions: controlled temperature, topical tetracaine (1 mg/mL + oxibuprocaine 4 mg/mL) eye drops (Anestesico doble Colirrusi, Alcon Cusí SA, Barcelona, Spain) and intraperitoneal (60 mg/kg of ketamine + 0.25 mg/kg of dexmedetomidine) anesthetic. Afterward, the rats were left to recover in an enriched 2.5% oxygen atmosphere and were treated with antibiotic ointment (erythromycin 5 mg/g [Oftalmolosa Cusí eritromicina, Alcon Cusí SA]). The Ms20/10 were injected at baseline and at weeks 2, 4, 8, 12, 16, and 20. Episcleral injections were administered biweekly if the IOP was less than 20 mm Hg. Animal weight during the study was similar to that reported by the supplier (Janvier-labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Glaucoma induction did not alter the morphometric weight parameter versus healthy animals. No correlation studies were carried out between body weight and retinal loss since these parameters have been previously demonstrated—by means of data standardization—to be independent.<sup>41</sup>

### Ophthalmologic Clinical Evaluation

IOP measurements were recorded weekly, using a rodent-specific rebound tonometer (Tonolab, TiolatOy, Helsinki, Finland), under a sedative mixture of 3% sevoflurane gas and 1.5% oxygen for less than 3 minutes as recommended.<sup>42</sup> The IOP value was obtained by averaging three consecutive measurements, taken from the average of 6 rebounds.

Optical coherence tomography (OCT) (OCT Spectralis, Heidelberg Engineering, Germany) was used to quantify the neuroretinal structure in vivo, using a contact lens adapted to the rat's cornea in order to obtain higher quality recordings. The retina posterior pole, retinal nerve fiber layer (RNFL), and ganglion cell layer (GCL) protocols were used.<sup>39–41,43,44</sup> All of them measured a 3-mm-diameter area centered on the optic disc using 61 b-scans, and subsequent follow-up examinations were performed at this same location using eye-tracking software and a follow-up application. The retina posterior pole protocol analyzed the thickness from the inner limiting membrane to the retinal pigment epithelium divided into the 9 Early Treatment Diabetic Retinopathy areas,<sup>45</sup> which included a central 1-mm circle centered on the optic disc (no fovea exists in rats), and inner (inferior, superior, nasal, temporal) and outer (inferior, superior, nasal, temporal) rings measuring 2 and 3 mm in diameter,

respectively, as well as total volume; the RNFL protocol analyzed the thickness from the inner limiting membrane to the GCL boundaries divided into 6 sectors (inferotemporal, inferonasal, superotemporal, superonasal, nasal, and temporal); and the GCL protocol analyzed from the RNFL to the inner nuclear layer boundaries within the Early Treatment Diabetic Retinopathy areas.

ERG (Roland consult RETIanimal ERG, Germany) was used to quantify neuroretinal functionality using the scotopic full-field ERG and the light-adapted photopic negative response protocols. The scotopic ERG test was performed after 12 hours of dark adaptation and the eyes were prepared to full dilatation using topical eye drops containing tetracaine 1 mg/mL + oxibuprocaine 4 mg/mL (Anestesico doble Colirrusi, Alcon Cusí SA) and mydratics (tropicamide 10 mg/mL, phenylephrine 100 mg/mL [Alcon Cusí SA]). Eyes were lubricated with hydromellose 2% (Methocel OmniVision, Puchheim, Germany). Active electrodes were placed on the cornea, references were placed at both sides under the skin, and the ground electrode was placed near the tail. Electrode impedance with a difference of less than 2 kΩ between electrodes was accepted.

Both eyes were tested simultaneously using a Ganzfeld Q450 SC sphere with white LED flashes for stimuli, and 7 steps with increasing luminance intensity and intervals were performed (rod response: step 1: -40 dB, 0.0003 cds/m<sup>2</sup>, 0.2 Hz [20 recordings averaged]; step 2: -30 dB, 0.003 cds/m<sup>2</sup>, 0.125 Hz [18 recordings averaged]; step 3: -20 dB, 0.03 cds/m<sup>2</sup>, 8.929 Hz [14 recordings averaged]; step 4: -20 dB, 0.03 cds/m<sup>2</sup>, 0.111 Hz [15 recordings averaged]; step 5: -10 dB, 0.3 cds/m<sup>2</sup>, 0.077 Hz [15 recordings averaged]; mixed rod-cone response: step 6: 0 dB, 3.0 cds/m<sup>2</sup>, 0.067 Hz [12 recordings averaged]; and oscillatory potentials: step 7: 0 dB, 3.0 cds/m<sup>2</sup>, 29.412 Hz [10 recordings averaged]). The photopic negative response protocol was performed after light adaptation to a blue background (470 nm, 25 cds/m<sup>2</sup>), and a red LED flash (625 nm, -10 dB, 0.30 cds/m<sup>2</sup>, 1.199 Hz [20 recordings averaged]) was used as stimulus. Latency (in

milliseconds) and amplitude (in microvolts) were studied in *a*, *b* and photopic negative response waves.

OCT tests were performed at baseline, 8 weeks, 12 weeks, 18 weeks, and 24 weeks; ERG tests were performed at baseline, 12 weeks, and 24 weeks, both under intraperitoneally administered anesthesia (60 mg/kg of ketamine + 0.25 mg/kg of dexmedetomidine, as mentioned above for ocular injections). A trained, masked researcher rejected or manually corrected the recordings if the algorithm had clearly failed.

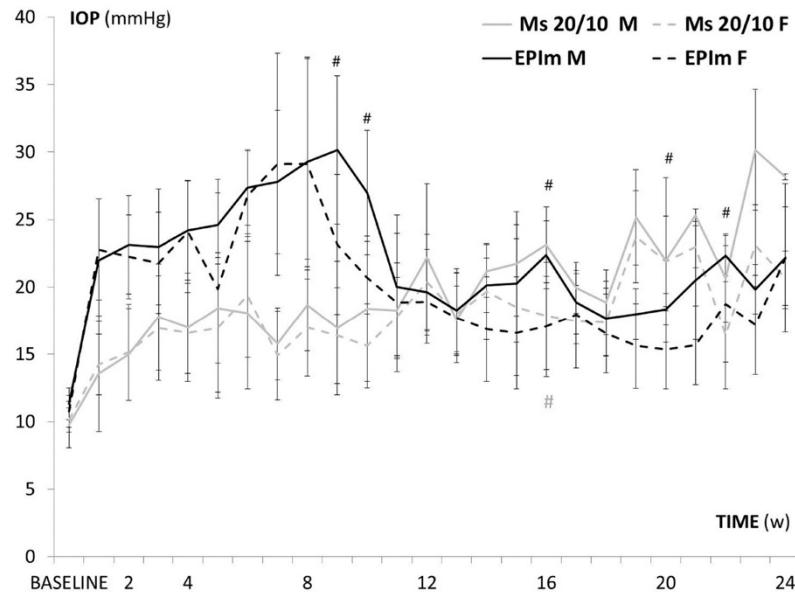
### Statistical Analysis

Data from this longitudinal study were recorded in an Excel database and statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). To assess sample distribution, the Kolmogorov-Smirnov test was used; however, given the nonparametric distribution of most of the data, the Mann-Whitney *U* test was performed to evaluate the differences between both cohorts, and a paired Wilcoxon test was used to compare the changes recorded in each eye over the 24-week study period. All values were expressed as means ± standard deviations. Values of *P* < 0.05 (expressed as \*) were considered to indicate statistical significance, and the Bonferroni correction for multiple comparisons was calculated to avoid a high false-positive rate. The level of significance for each variable was established based on Bonferroni calculations (expressed as #).

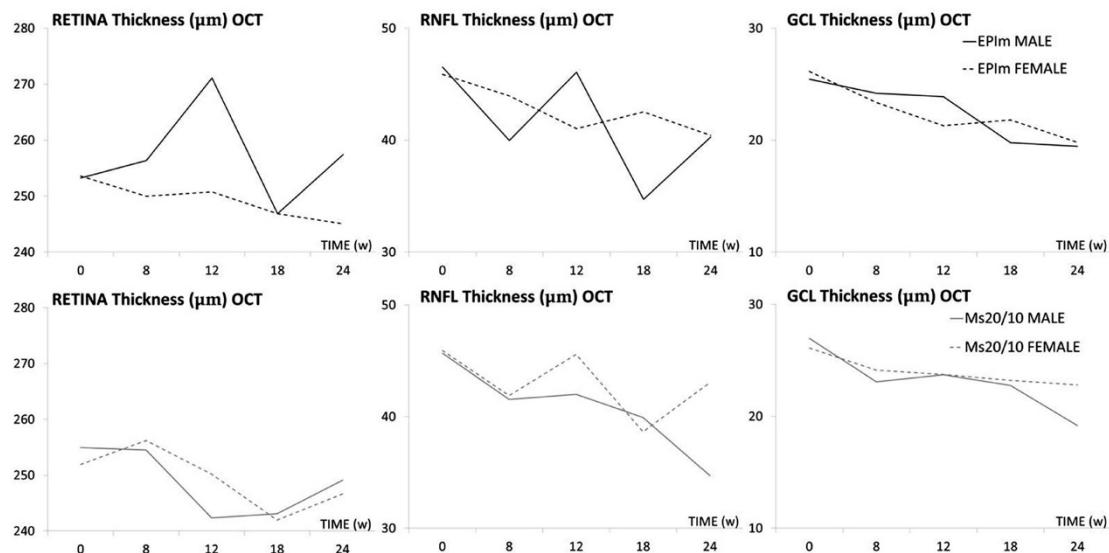
## RESULTS

### IOP

Both OHT models showed an increase in IOP over follow-up, which occurred earlier and more abruptly in the episcleral sclerosis model. Males in both OHT models, but especially the episcleral model, showed statistically significant higher IOP measurements than females (Fig. 1 and Supplementary Table S1).



**FIGURE 1.** IOP curve in both sexes and chronic glaucoma models over follow-up. EPIm, episcleral sclerosis model; Ms 20/10, microsphere 20/10 model; M, male; F, female. #*P* < 0.020, for Bonferroni correction for multiple comparisons.



**FIGURE 2.** Structural analysis of the neuroretina using OCT in both sexes and chronic glaucoma models. EPIm, episcleral sclerosis model; Ms 20/10, microsphere 20/10 model; OCT, optical coherence tomography; RNFL, retinal nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer complex; average thickness in microns ( $\mu\text{m}$ ).

### Structural Neuroretinal Analysis by in VIVO OCT

Neuroretinal thickness in males and females was quantified over the study in both chronic glaucoma models (see Supplementary Tables S2 and S3). Males in the episcleral sclerosis model had greater retinal thickness (but similar RNFL and GCL) than females at the end of the study. Moreover, males showed greater fluctuations in retina posterior pole and RNFL thickness than females, which exhibited a progressive and sustained decrease in all three OCT parameters. However, these features were not observed in the Ms20/10 model, in which males had lesser thicknesses and females exhibited greater fluctuations in RNFL (Fig. 2).

The percentages of thickness loss in both sexes and both chronic glaucoma models were then analyzed and compared over the study. As can be seen in Figure 3, the percentage of RNFL thickness loss was greater in males in both OHT models. It was also greater in the GCL and retina posterior pole in the Ms20/10 model, reaching statistical significance at an early stage (week 8). Interestingly, increased retina posterior pole thickness was found in males in the episcleral sclerosis model.

Although perceptual loss of OCT thickness in each sector was also analyzed to identify a sex-dependent neuroretinal degeneration pattern, no obvious pattern was found. Both chronic glaucoma models and sexes lost more (on average) in the inner retina posterior pole and GCL sectors and in the superior-inferior axis sectors in the RNFL. Furthermore, losses in contiguous sectors were found in females in the Ms20/10 model. The patterns of degeneration found are shown in Figure 4.

To standardize the neuroretinal loss, the right eye loss rate per day and the millimeters of mercury of increased IOP each week were calculated from the average of all OCT sectors and expressed in micrometers per millimeters of mercury per day. The parameter most affected in both

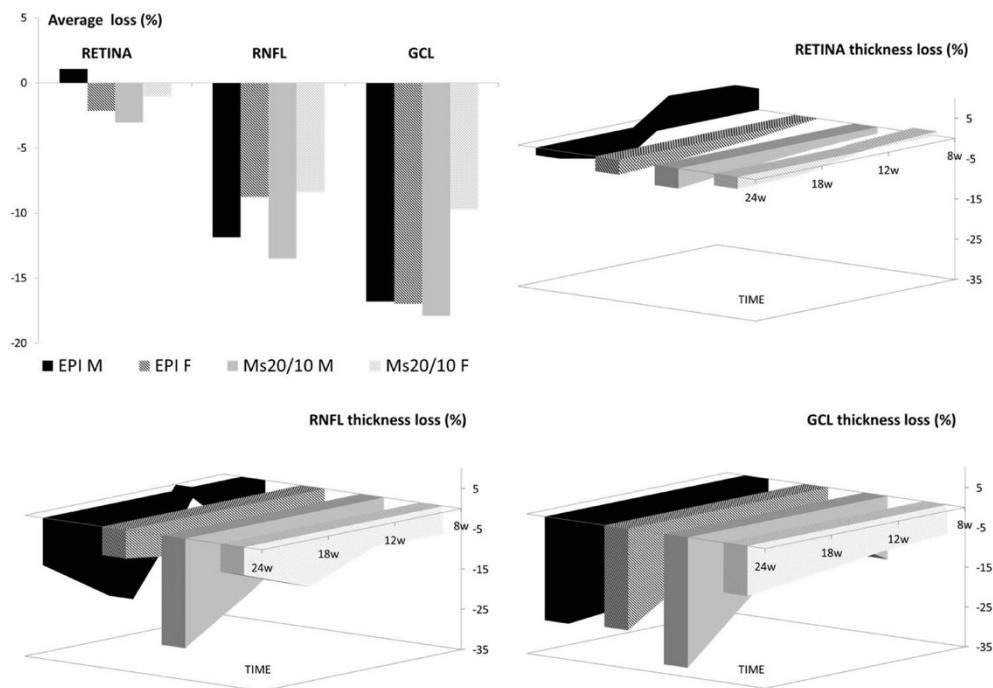
OHT models per millimeter of mercury increase was GCL followed by RNFL and, finally, retina posterior pole. In the Ms20/10 model, both sexes showed a similar rate of GCL loss over time; in the episcleral sclerosis model, a similar loss rate was only observed in the later stages. This feature was also observed in retina posterior pole, although males in the episcleral sclerosis model experienced an inverted loss rate in the early stages. RNFL was the parameter that exhibited widest variations between sexes and models. At the end of the study (week 24), the loss rate in the episcleral sclerosis model was similar between sexes; however, in the Ms20/10 model females showed a slightly lower loss rate than males (Fig. 5).

### Functional Neuroretinal Analysis by in VIVO ERG

In the episcleral sclerosis model, males exhibited statistically significant lower scotopic ERG signals at week 12; in the Ms20/10 model, no differences by sex were found. In the light-adapted photopic negative response test exploring RGC functionality the males showed a clear tendency to produce worse measurements in both chronic glaucoma models up to week 24. Lower recordings were measured in both models over time, with the episcleral sclerosis model producing the lowest values (see Fig. 6).

### DISCUSSION

Several models have been developed for the study of glaucoma. However, the results regarding neurodegeneration differ among different groups, and it has been proposed that this may be due to the use of different animals, animal strains, amounts of injected solution, injection times, and even particle sizes when using microbeads.<sup>46,47</sup> However, until now, no study considered sex as an influential factor



**FIGURE 3.** Percentage neuroretinal structure loss measured using OCT in both sexes and chronic glaucoma models over 24 weeks of follow-up. EPI, episcleral sclerosis model; Ms20/10, microsphere 20/10 model; RNFL, retinal nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer complex; M, male; F, female.

in glaucomatous degeneration (Table). In fact, most studies employed only one sex and, when males and females were used together, differences between sexes were not analyzed.<sup>48–82</sup> Glaucoma is a neurodegenerative disease in which associations with another neurodegenerative diseases that are influenced by sex, such as Alzheimer's disease, have been found.<sup>83,84</sup>

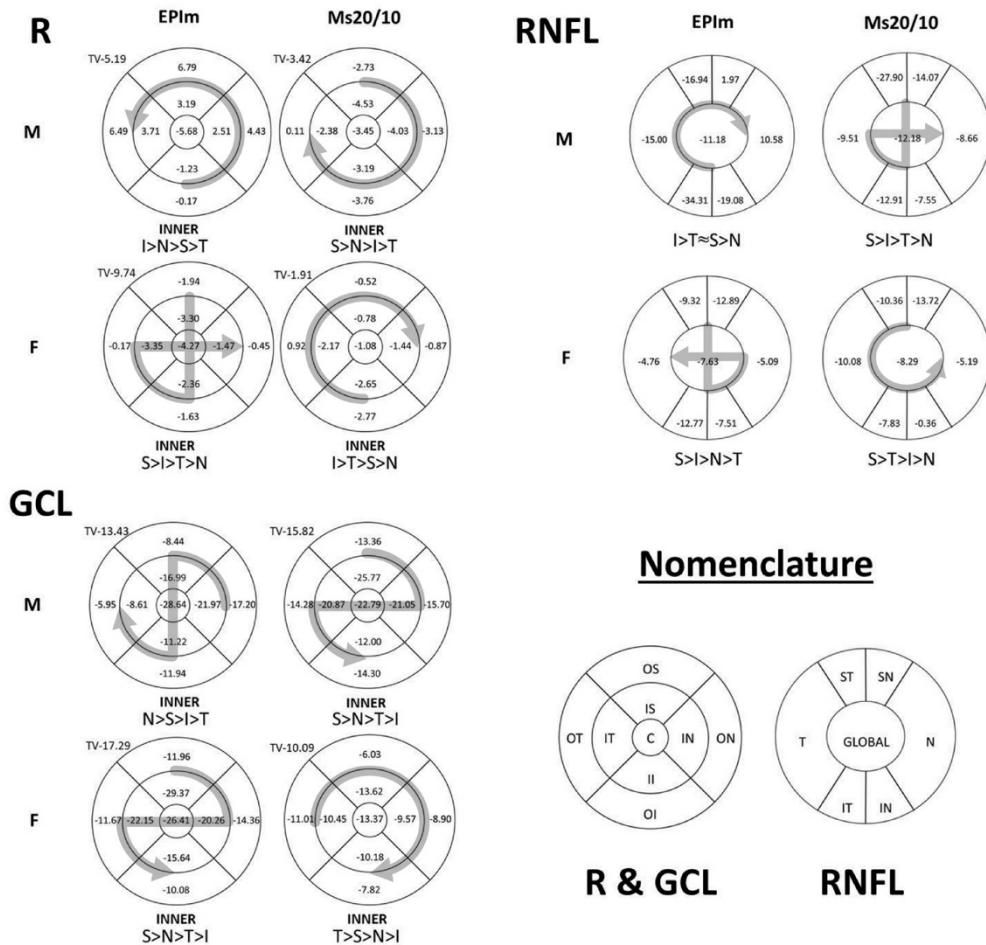
Given the lack of knowledge about the influence of sex in glaucoma, and given current needs,<sup>85</sup> the purpose of our study was to investigate the existence of differences between males and females in 2 animal models of glaucoma (sclerosis of episcleral veins and injection of PLGA microspheres in the anterior chamber of the eye).

As stated elsewhere in this article, IOP is the main risk factor for development and worsening of glaucomatous pathology. Several glaucoma models have been developed to induce increased IOP. The episcleral sclerosis model produces very high pressures at early stages, leading to faster neuroretinal degeneration. However, the microsphere model, in which it is possible to modify injection frequency, allows for modulation of the hypertensive curve, thereby achieving a slower and more progressive IOP increase,<sup>86</sup> as is consistent with our results. Our results also showed that females exhibit lower IOP levels than males in both models. A possible explanation for this finding is the presence of estrogenic receptors in the trabecular meshwork and endothelial cells that regulate NO synthase, these being responsible for increased vasodilation and a lower IOP.<sup>4</sup> Therefore, females may also benefit from a protective effect in OHT. However, both sexes suffered from higher IOP in the episcleral model. This finding may be due to the induction

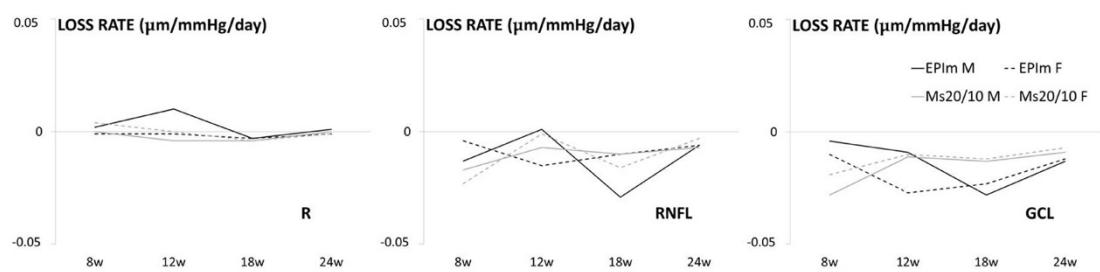
method itself, because hypersaline solution is injected into the episcleral veins and, via a retrograde pathway, reaches the trabecular meshwork and may even opacify the lens as evidence of the solution entering the eye.<sup>47</sup> The hyperosmotic effect could damage the endothelial cells, altering the effect of the NO synthase and eliminating, at least partially, the protective effect exerted by estrogen on the vasodilation-mediated enzyme (NO synthase) and increasing IOP in both sexes. In contrast, mineralocorticoid receptors have been found in the iris, ciliary body, endothelial cells, and even in the neuroretina and pigmentary epithelium.<sup>87</sup> In addition to an NaCl imbalance (as with 1.8 M NaCl solution), aldosterone is upregulated and binds to the mineralocorticoid receptors, causing endothelial dysfunction and vasculopathy.<sup>88</sup> However, because this damage would not occur so abruptly with the injection of microspheres, it seems that the OHT-inducing method could influence the results differently by sex.

As the increase in IOP produces neuroretinal degeneration, an OCT-based study was designed to evaluate the changes in the neuroretina over time. This technology allows consecutive re-explorations while decreasing the number of euthanized animals. In addition, several studies have shown an adequate correlation between OCT and immunocytochemistry and ERG.<sup>89–91</sup> The OCT recordings were performed from baseline with first re-exploration at 8 weeks of follow-up (corresponding to 12 weeks of rat life). At this age, development and growth of the retina end and the retina reaches maturity.<sup>92</sup>

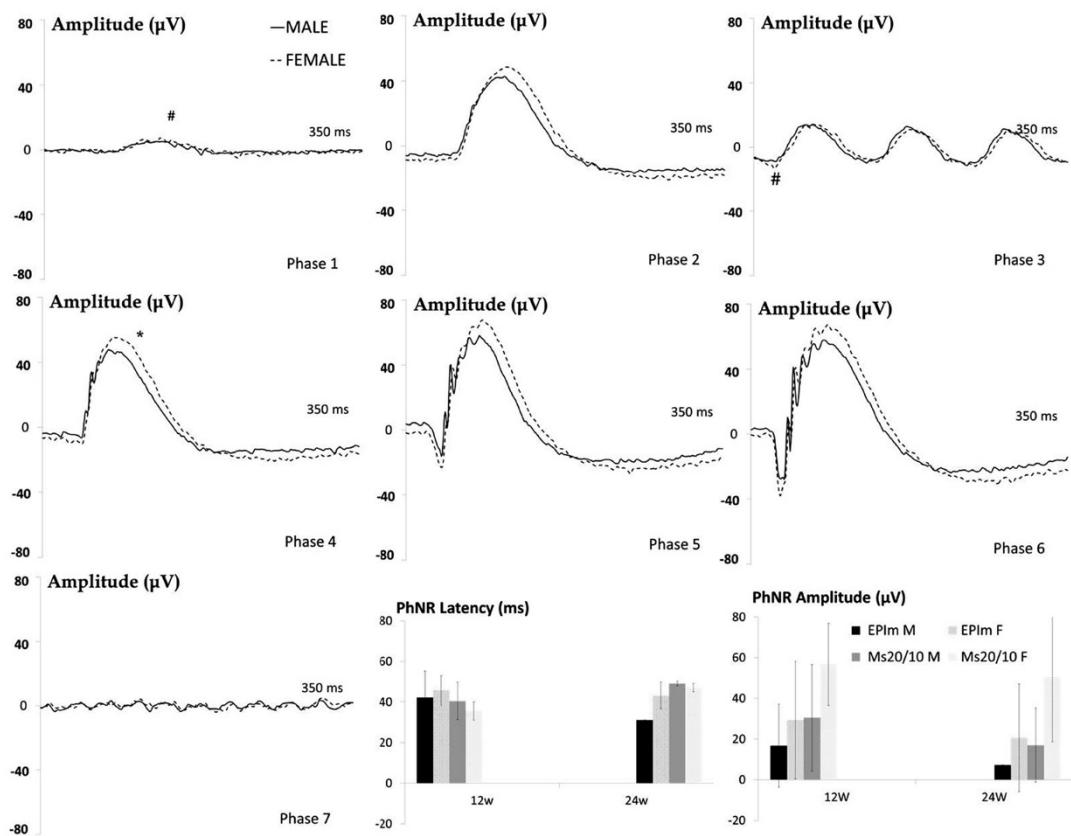
In a previous article, we demonstrated that the episcleral sclerosis model induced a more aggressive retinal glial



**FIGURE 4.** Neuroretinal percentage loss in OCT sectors and loss trend averaged over 24 weeks of follow-up. R, retina; C, central; II, inner inferior; OI, outer inferior; IS, inner superior; OS, outer superior; IN, inner nasal; ON, outer nasal; IT, inner temporal; OT, outer temporal; IT, inferior temporal; IN, inferior nasal; ST, superior temporal; SN, superior nasal; N, nasal; T, temporal; EPIm, episcleral sclerosis model; Ms20/10, microsphere 20/10 model; TV, total volume; I, inferior; S, superior; N, nasal; T, temporal; >, greater loss than; ≈, similar; M, male; F, female.



**FIGURE 5.** Neuroretinal loss rate measured using OCT in both sexes and chronic glaucoma models. EPIm, episcleral sclerosis model; Ms20/10, microsphere 20/10 model; M, male; F, female.



**FIGURE 6.** Neuroretinal functionality using dark- and light-adapted ERG in both chronic glaucoma models and sexes. PhNR, photopic negative response; EPIm, episcleral sclerosis model; Ms20/10, microsphere 20/10 model; M, male; F, female; Phases 1 to 7 of dark-adapted ERG in the EPIm at week 12.

TABLE. Sex in Rodent Glaucoma Models

Model	Sex	References
Episcleral vein sclerosis model	Male	48, 49, 50, 56, 58, 62, 63, 66, 67, 68, 69, 71, 73, 74, 76
	Female	-
	Sex not mentioned	59, 60, 64, 65, 70, 75, 77
	Both sexes	61, 72 (sex differences not analyzed in either)
Microsphere model	Male	51, 53, 57, 82
	Female	52, 54, 55, 78, 81
	Sex not mentioned	80
	Both sexes	79 (sex differences not analyzed)

reaction than the microsphere model.<sup>39</sup> However, differences between the sexes were not evaluated. This article now shows that these differences are mainly found in males. It seems that the glaucoma-inducing method could also influence sex-dependent neurodegeneration. Our results showed a significant increase in retinal thickness in males at week 12 (which decreased at week 18 and increased again at week 24) in the episcleral sclerosis model; it did not occur in females and did not occur in the Ms20/10 model. These fluctuations<sup>39</sup> may be due to greater immune infiltration<sup>93</sup> or increased glia sensitivity to hydroelectrolytic or vascular changes, especially in males. A potential transfer of

hyperosmotic solution to the posterior pole could have upregulated aldosterone. It has been demonstrated that the systemic administration of aldosterone decreases RNFL thickness under ocular normotensive conditions, and that it was counteracted by the antagonist, spironolactone.<sup>94</sup> In this sense, Takasago et al.<sup>95</sup> found a significant negative correlation between the aldosterone levels in plasma and the number of RGCs, which decreased earlier on the periphery and later in central sectors. However, these authors only analyzed males in their study. The mineralocorticoid receptors of the neuroretina and pigment epithelium act in retinal/choroidal homeostasis by balancing sodium and

reabsorbing the fluid,<sup>96</sup> but mineralocorticoid receptor overactivation could induce damage that has been linked to central serous chorioretinopathy.<sup>97</sup> Central serous chorioretinopathy courses with increased capillary permeability and pressure in choroidal vessels<sup>98</sup> that increase retinal thickness and cause edema. Moreover, this pathological entity is oddly more prevalent in males. Testosterone increases the risk of central serous chorioretinopathy with increased retinal thickness, and its improvement with finasteride has been demonstrated.<sup>99</sup> According to the facts mentioned elsewhere in this article, bimonthly injections with hyperosmolar solution for 6 months could overactivate mineralocorticoid receptors and increase retinal thickness, although no evident edema was detected by OCT. In contrast, it is known that glial cell edema (which is also present in glaucoma) is produced by intracellular Na overload (which could be aggravated by the hyperosmotic solution). In both models, a similar pattern of RNFL fluctuation was detected, with increases in thickness at 12 and 24 weeks after induction of the increased IOP. Increases in thickness owing to immune infiltration<sup>39</sup> or edema have been detected before cell death.<sup>100</sup> In our episcleral sclerosis model results, fluctuations in RNFL were observed in males, but it seems that premenopausal females counteracted it. In this regard, Neuman et al.<sup>101</sup> showed that sex steroids such as progesterone inhibit the swelling of glial cells. The suggestion therefore is that the episcleral sclerosis model would affect males more. In contrast, in the Ms20/10 model a greater fluctuation occurred in females. This suggests that sex influences axonal damage (measured as RNFL thickness change) depending on whether the hypertensive Noxa is pretrabecular (Ms 20/10 model) or post-trabecular (episcleral sclerosis model), although other unknown factors may also exert an influence.

Furthermore, O'Steen et al.<sup>102</sup> demonstrated in rats that, in a situation of chronic stress, retinal thickness (especially in the outer layers) decreased significantly in both sexes, although males lost more than females. The degeneration began on the periphery and later affected the inner sectors. Previous OCT studies by our group found damage at an earlier stage in the outer retinal sectors and affection of the inner sectors over the follow-up.<sup>39,40</sup> In this study, the degeneration pattern showed greater loss (on average) in the inner sectors, which could be explained by greater damage or could be a consequence of the averaged result already including the inner sectors.

Estrogens have demonstrated a neuroretinal protective effect,<sup>12,31–36</sup> as has progesterone in attenuating microglial-driven neurodegeneration,<sup>103</sup> and our results showed that females experienced less neurodegeneration in all parameters in the Ms20/10 model as well as in the RNFL in the episcleral sclerosis model. O'Steen<sup>104</sup> proposed that 17 $\beta$ -estradiol was to protect photoreceptors from light damage and Chaychi et al.<sup>8</sup> showed greater functionality in premenopausal female rats than in males. We found similar results even with OHT Noxa in the episcleral sclerosis model, as the females had greater amplitudes in the scotopic ERG. Interestingly, even when the percentage loss of GCL in the episcleral sclerosis model was similar between sexes (or even slightly higher in females), ERG, and photopic negative response functionality were better preserved in females than in males, indicating better synaptic function in females. In this regard, neurosteroids (such as estrogens) synthesized in the retina have been reported to modulate the gamma-aminobutyric acid and glutamate receptors interven-

ing in the synaptic function,<sup>85</sup> and estrogens have shown an improvement in synaptic functionality in neuroretinal models. Nevertheless, our results partially contradict the results of other authors who claim that RGC dysfunction occurs earlier and progressively preceding cell death. It is worth mentioning that these studies were carried out with monkeys (sex was not mentioned), and with male rats.<sup>105</sup> In our study, the same outcomes were found in males, but not in females. Thus, there could be a lag, or maintenance of the function and/or nonidentical sequence in females.

A study in humans with POAG showed that photopic negative response was decreased in the early stages of the disease. Patients showed lower photopic negative response amplitude with the decrease in visual field sensitivity, which was correlated with the vertical cupping/disc ratio. However, no differences were found between the sexes.<sup>106</sup> Nevertheless, the results from our study showed that females exhibited greater photopic negative response amplitudes than males in both models.

In a previous study<sup>41</sup> analyzing differences in neurodegeneration in healthy Long-Evans rats by age and sex, we found that males had higher IOP by the end of the study (7 months of age), exhibited greater neuroretinal thickness but higher structural percentage loss, and had worse dark- and light-adapted function than females. These facts served as hypotheses for this article analyzing whether sex could also influence the findings in the OHT models studied. Moreover, as mentioned elsewhere in this article, the episcleral sclerosis model and Ms 20/10 models induce differing extents of damage at different stages of the study. episcleral sclerosis model showed earlier damage than the Ms20/10 model.<sup>39</sup> This study constitutes a step forward; indeed, analyzing data by sex has been essential to detecting changes that would have otherwise gone unnoticed. If sex had not been considered, the average of both the male and female curves would have been taken, masking differences that would not be statistically significant in the structural and functional tests owing to an underestimation or overestimation of results (in males and females, respectively) that would counteract each other. Similarly, if the OHT model had not been considered separately, we would be facing the same dilemma owing to underestimation or overestimation (episcleral sclerosis model and Ms 20/10 model, respectively) of the thicknesses and electrical responses, ignoring differences existing since intermediate stages of the study. This argument would also apply to the analysis of the response to potential neuroprotective and hypotensive drugs. Therefore, we demonstrate that Noxa type and sex are important factors in glaucoma onset and progression.

Our group is aware of the main limitation of this study, which is the absence of histologic analysis, even when OCT is a reliable method, so it would be beneficial to support our results with histologic studies. Furthermore, hormone levels were not measured, and our animals did not reach senescence, which is when the prevalence of glaucoma rises, especially in women. It would therefore be advantageous to study more advanced ages in future research.

In conclusion, to our knowledge this study is the first to analyze the influence of sex in 2 different animal POAG models. Our results showed different patterns of degeneration and different loss rates between males and females in the same hypertensive model and also between different models. Premenopausal females exhibited lower IOP and less neuroretinal damage in glaucoma than age-matched males. Differences or discrepancies in the results of

## Influence of Sex on the Neuroretina in Chronic Glaucoma

previous studies could be due in part to a sex bias, as well as to the OHT-inducing model used. It would be beneficial to consider both sex and the OHT-inducing model in future studies when evaluating both hypotensive and neuroprotective therapies, since our results suggest that premenopausal females maintained a protective effect in relation to OHT and the therapeutic outcomes could be overestimated or underestimated.

**Acknowledgments**

The authors thank the use of the General Research Support Service (SAI), University of Zaragoza, and to thank Zoco Estudio (zocoestudio.com) for the infographics designed for this article.

Supported by Rio Hortega Research Grants M17/00213, PI17/01726 and PI17/01946 (Carlos III Health Institute), and by MAT2017-83858-C2-2 and MAT2017-83858-C2-1 MINECO/AEI/ERDF, EU, Research Group UCM 920415, ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” RETICS Ofstared, RD16/0008/0004, RD16/0008/0009, and RD16/0008/029. D.G.H. acknowledges a UCM-Santander fellowship (CT17/17-CT17-18) and AAN thanks Spain’s Ministry of Science and Innovation for the fellowship granted (PRE2018-083951).

**Disclosure:** **M.J. Rodrigo**, None; **T. Martinez-Rincon**, None; **M. Subias**, None; **S. Mendez-Martinez**, None; **L.E. Pablo**, None; **V. Polo**, None; **A. Aragon-Nava**, None; **D. Garcia-Herranz**, None; **J.G. Feijoo**, None; **I.B. Osuna**, None; **R. Herrero-Vanrell**, None; **E. Garcia-Martin**, None

**References**

- Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000;78(2):146–153, doi:[10.1034/j.1600-0420.2000.078002146.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0420.2000.078002146.x).
- Kobayashi K, Kobayashi H, Ueda M, Honda Y. Estrogen receptor expression in bovine and rat retinas. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(11):2105–2110.
- Salyer DL, Lund TD, Fleming DE, Lephart ED, Horvath TL. Sexual dimorphism and aromatase in the rat retina. *Dev Brain Res.* 2001;126(1):131–136, doi:[10.1016/S0165-3806\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00147-4).
- Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Gender differences in ocular blood flow. *Curr Eye Res.* 2015;40(2):201–212, doi:[10.3109/02713683.2014.906625](https://doi.org/10.3109/02713683.2014.906625).
- Akar ME, Taskin O, Yucel I, Akar Y. The effect of the menstrual cycle on optic nerve head analysis in healthy women. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82(6):741–745, doi:[10.1111/j.1600-0420.2004.00351.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2004.00351.x).
- Dewundara S, Wiggs J, Sullivan DA, Pasquale LR. Is estrogen a therapeutic target for glaucoma? HHS Public Access. *Semin Ophthalmol.* 2016;31(2):140–146, doi:[10.3109/08820538.2015.1114845](https://doi.org/10.3109/08820538.2015.1114845).
- Akara Y, Yucela I, Akar ME, Taskin O, Özera HO, Akar Y. Menstrual cycle-dependent changes in visual field analysis of healthy women. *Ophthalmologica.* 2005;219(1):30–35, doi:[10.1159/000081780](https://doi.org/10.1159/000081780).
- Chaychi S, Polosa A, Lachapelle P. Differences in retinal structure and function between aging male and female Sprague-Dawley rats are strongly influenced by the estrus cycle. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136056, doi:[10.1371/journal.pone.0136056](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136056).
- Phillips CI, Gore SM. Ocular hypotensive effect of late pregnancy with and without high blood pressure. *Br J Ophthalmol.* 1985;69(2):117–119, doi:[10.1136/bjo.69.2.117](https://doi.org/10.1136/bjo.69.2.117).
- Weinreb RN, Lu A, Beeson C. Maternal corneal thickness during pregnancy. *Am J Ophthalmol.* 1988;105(3):258–260, doi:[10.1016/0002-9394\(88\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0002-9394(88)90006-2).
- Wilke K. Episcleral venous pressure and pregnancy [proceedings]. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1975;(125):40–41, doi:[10.1111/j.1755-3768.1975.tb01228.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1975.tb01228.x).
- Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Gonadal hormones and retinal disorders: A review. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:66, doi:[10.3389/fendo.2018.00066](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00066).
- Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Sex hormones and optic nerve disorders: a review. *Front Neurosci.* 2019;13:57, doi:[10.3389/fnins.2019.00057](https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00057).
- Hanamsagar R, Bilbo SD. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;160:127–133, doi:[10.1016/j.jsbmb.2015.09.039](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.039).
- Mangold CA, Wronowski B, Du M, et al. Sexually divergent induction of microglial-associated neuroinflammation with hippocampal aging. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):1–19, doi:[10.1186/s12974-017-0920-8](https://doi.org/10.1186/s12974-017-0920-8).
- Du M, Mangold CA, Bixler G V, et al. Retinal gene expression responses to aging are sexually divergent. *Mol Vis.* 2017;23:707–717.
- Tower J. Sex-specific gene expression and life span regulation HHS Public Access. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(10):735–747, doi:[10.1016/j.tem.2017.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.002).
- 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):2081–2090, doi:[10.1016/j.ophtha.2014.05.013](https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.05.013).
- Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Pandajonas S. Glaucoma. *Lancet.* 2017;390(10108):2183–2193, doi:[10.1016/S0140-6736\(17\)31469-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1).
- Tehrani S. Gender difference in the pathophysiology and treatment of glaucoma. *Curr Eye Res.* 2015;40(2):191–200, doi:[10.3109/02713683.2014.968935](https://doi.org/10.3109/02713683.2014.968935).
- Vajaranant TS, Nayak S, Wilensky JT, Joslin CE. Gender and glaucoma: what we know and what we need to know. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21(2):91–99, doi:[10.1097/ICU.0b013e3283360b7e](https://doi.org/10.1097/ICU.0b013e3283360b7e).
- Yu S, Eh H, Mh K, H C, M S. The association between female reproductive factors and open-angle glaucoma in Korean Women: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey V. *J Ophthalmol.* 2018;2018:27507863, doi:[10.1155/2018/2750786](https://doi.org/10.1155/2018/2750786).
- Deschénes MC, Descovich D, Moreau M, et al. Postmenopausal hormone therapy increases retinal blood flow and protects the retinal nerve fiber layer. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2587–2600, doi:[10.1167/iovs.09-3710](https://doi.org/10.1167/iovs.09-3710).
- Rossoow JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women’s health initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288(3):321–333, doi:[10.1001/jama.288.3.321](https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321).
- Hulley S, Grady D, Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA.* 1998;280(7):605–613, doi:[10.1001/jama.280.7.605](https://doi.org/10.1001/jama.280.7.605).
- Tobe LA, Harris A, Trinidad J, et al. Should men and women be managed differently in glaucoma? *Ophthalmol Ther.* 2012;1(1):1, doi:[10.1007/s40123-012-0001-0](https://doi.org/10.1007/s40123-012-0001-0).

27. Altıntaş Ö, Çağlar Y, Yüksel N, Demirci A, Karabaş L. The effects of menopause and hormone replacement therapy on quality and quantity of tear, intraocular pressure and ocular blood flow. *Ophthalmologica*. 2004;218(2):120–129, doi:[10.1159/000076148](https://doi.org/10.1159/000076148).
28. Zalewski A, Cecchini EL, Deroo BJ. Expression of extracellular matrix components is disrupted in the immature and adult estrogen receptor  $\beta$ -null mouse ovary. *PLoS One*. 2012;7(1):e29927, doi:[10.1371/journal.pone.0029937](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029937).
29. Pietrucha-Dutczak M, Amadio M, Govoni S, Lewin-Kowalik J, Smedowski A. The role of endogenous neuroprotective mechanisms in the prevention of retinal ganglion cells degeneration. *Front Neurosci*. 2018;12:834, doi:[10.3389/fnins.2018.00834](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00834).
30. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):8867–8872, doi:[10.1073/pnas.96.16.8867](https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8867).
31. Nakazawa T, Takahashi H, Shimura M. Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain Res*. 2006;1093(1):141–149, doi:[10.1016/j.brainres.2006.03.084](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.084).
32. Chen X, Liu Y, Zhang Y, Kam WR, Pasquale LR, Sullivan DA. Impact of aromatase absence on murine intraocular pressure and retinal ganglion cells. *Sci Rep*. 2018;8(1), doi:[10.1038/s41598-018-21475-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21475-x).
33. Kaja S, Yang SH, Wei J, et al. Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of Vesl-1L/Homer 1c immunoreactive synaptic connections. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(7):3155–3162, doi:[10.1167/iovs.02-1204](https://doi.org/10.1167/iovs.02-1204).
34. Prokai-Tatrai K, Xin H, Nguyen V, et al. 17 $\beta$ -estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an *in vivo* model of glaucoma. *Mol Pharm*. 2013;10(8):3253–3261, doi:[10.1021/mp400313u](https://doi.org/10.1021/mp400313u).
35. Russo R, Cavaliere F, Watanabe C, et al. 17 $\beta$ -Estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. *Prog Brain Res*. 2008;173:583–590, doi:[10.1016/S0079-6123\(08\)01144-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)01144-8).
36. Zhou X, Li F, Ge J, et al. Retinal ganglion cell protection by 17 $\beta$ -estradiol in a mouse model of inherited glaucoma. *Dev Neurobiol*. 2007;67(5):603–616, doi:[10.1002/dneu.20373](https://doi.org/10.1002/dneu.20373).
37. Cascio C, Deidda I, Russo D, Guarneri P. The estrogenic retina: The potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. *Steroids*. 2015;103:31–41, doi:[10.1016/j.steroids.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.002).
38. Morrison JC, Moore CG, Deppemeier LMH, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*. 1997;64(1):85–96, doi:[10.1006/exer.1996.0184](https://doi.org/10.1006/exer.1996.0184).
39. Rodrigo MJ, Garcia-Herranz D, Subias M, et al. Chronic glaucoma using biodegradable microspheres to induce intraocular pressure elevation. six-month follow-up. *Biomedicines*. 2021;9(6):682, doi:[10.3390/biomedicines9060682](https://doi.org/10.3390/biomedicines9060682).
40. Garcia-Herranz D, Rodrigo MJ, Subias M, et al. Novel use of PLGA microspheres to create an animal model of glaucoma with progressive neuroretinal degeneration. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):237, doi:[10.3390/pharmaceutics13020237](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020237).
41. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. *Exp Eye Res*. August 2020;200:108208, doi:[10.1016/j.exer.2020.108208](https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108208).
42. Ding C, Wang P, Tian N. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp Eye Res*. 2011;92(6):512–520, doi:[10.1016/j.exer.2011.03.016](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.03.016).
43. Rodrigo MJ, Cardiel MJ, Fraile JM, et al. Brimonidine-LAPONITE® intravitreal formulation has an ocular hypotensive and neuroprotective effect throughout 6 months of follow-up in a glaucoma animal model. *Biomater Sci*. 2020;8(22):6246–6260, doi:[10.1039/dbm01013h](https://doi.org/10.1039/dbm01013h).
44. Rodrigo MJ, Del Palomar AP, Montolí A, et al. Monitoring new long-lasting intravitreal formulation for glaucoma with vitreous images using optical coherence tomography. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):217, doi:[10.3390/pharmaceutics13020217](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020217).
45. Photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(12):1796, doi:[10.1001/archophht.1985.01050120030015](https://doi.org/10.1001/archophht.1985.01050120030015).
46. Dey A, Manthey AL, Chiu K, Do CW. Methods to induce chronic ocular hypertension: reliable rodent models as a platform for cell transplantation and other therapies. *Cell Transplant*. 2018;27(2):213–229, doi:[10.1177/0963689717724793](https://doi.org/10.1177/0963689717724793).
47. Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC. Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp Eye Res*. 2015;141:23–32, doi:[10.1016/j.exer.2015.05.012](https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.05.012).
48. Johnson EC, Morrison JC, Farrell S, Deppemeier L, Moore CG, McGinty MR. The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix. *Exp Eye Res*. 1996;62(6):663–674, doi:[10.1006/exer.1996.0077](https://doi.org/10.1006/exer.1996.0077).
49. Fortune B, Bui B V, Morrison JC, et al. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(6):1854–1862, doi:[10.1167/iovs.03-1411](https://doi.org/10.1167/iovs.03-1411).
50. Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, et al. Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(5):3171–3183, doi:[10.1167/iovs.12-11481](https://doi.org/10.1167/iovs.12-11481).
51. Almasieh M, Zhou Y, Kelly ME, Casanova C, Di Polo A. Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death Dis*. 2010;1(2):e27, doi:[10.1038/cddis.2009.23](https://doi.org/10.1038/cddis.2009.23).
52. Johnson EC, Cepurna WO, Choi D, Choe TE, Morrison JC. Radiation pretreatment does not protect the rat optic nerve from elevated intraocular pressure-induced injury. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):412–419, doi:[10.1167/iovs.14-15094](https://doi.org/10.1167/iovs.14-15094).
53. Pang IH, Johnson EC, Jia L, et al. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(4):1313–1321, doi:[10.1167/iovs.04-0829](https://doi.org/10.1167/iovs.04-0829).
54. Nissirios N, Chanis R, Johnson E, et al. Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: an ultrasound biomicroscopic study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(6):2478–2482, doi:[10.1167/iovs.07-0965](https://doi.org/10.1167/iovs.07-0965).
55. Walsh MM, Yi H, Friedman J, et al. Gene and protein expression pilot profiling and biomarkers in an experimental mouse model of hypertensive glaucoma. *Exp Biol Med*. 2009;234(8):918–930, doi:[10.3181/0811-RM-344](https://doi.org/10.3181/0811-RM-344).
56. Colafrancesco, V, Coassini, M, Rossi, S, Aloe, L. Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration. *Ann Ist Super Sanita*. 2011;47(3):284–289, doi:[10.4415/ANN\\_11\\_03\\_08](https://doi.org/10.4415/ANN_11_03_08).
57. Huang W, Fileta JB, Filippopoulos T, Ray A, Dobberfuhl A, Grosskreutz CL. Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4129–4135, doi:[10.1167/iovs.06-0606](https://doi.org/10.1167/iovs.06-0606).

## Influence of Sex on the Neuroretina in Chronic Glaucoma

58. Taylor S, Calder CJ, Albon J, Erichsen JT, Boulton ME, Morgan JE. Involvement of the CD200 receptor complex in microglia activation in experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 2011;92(5):338–343, doi:[10.1016/j.exer.2011.01.012](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.01.012).
59. Yang MH, Dibas A, Tyan YC. Changes in retinal aquaporin-9 (AQP9) expression in glaucoma. *Biosci Rep.* 2013;33(2):379–385, doi:[10.1042/BSR20130005](https://doi.org/10.1042/BSR20130005).
60. Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME TF. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(9):2969–2976.
61. Guo Y, Cepurna WO, Dyck JA, Doser TA, Johnson EC, Morrison JC. Retinal cell responses to elevated intraocular pressure: a gene array comparison between the whole retina and retinal ganglion cell layer. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):3003–3018, doi:[10.1167/iovs.09-4663](https://doi.org/10.1167/iovs.09-4663).
62. Johnson EC, Doser TA, Cepurna WO, et al. Cell proliferation and interleukin-6-type cytokine signaling are implicated by gene expression responses in early optic nerve head injury in rat glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):504–518, doi:[10.1167/iovs.10-5317](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5317).
63. Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC. Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(7):3161–3177, doi:[10.1167/iovs.06-1282](https://doi.org/10.1167/iovs.06-1282).
64. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):207–216, doi:[10.1167/iovs.09-3947](https://doi.org/10.1167/iovs.09-3947).
65. Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res.* 2010;91(3):415–424, doi:[10.1016/j.exer.2010.06.018](https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.06.018).
66. Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ, et al. Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(7):3847–3857, doi:[10.1167/iovs.12-9712](https://doi.org/10.1167/iovs.12-9712).
67. Cone FE, Steinhart MR, Oglesby EN, Kalesnykas G, Pease ME, Quigley HA. The effects of anesthesia, mouse strain and age on intraocular pressure and an improved murine model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 2012;99(1):27–35, doi:[10.1016/j.exer.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.04.006).
68. Frankfort BJ, Kareem Khan A, Tse DY, et al. Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):762–770, doi:[10.1167/iovs.12-10581](https://doi.org/10.1167/iovs.12-10581).
69. Smedowski A, Pietrucha-Dutczak M, Kaarniranta K, Lewin-Kowalik J. A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Sci Rep.* 2014;4:5910, doi:[10.1038/srep05910](https://doi.org/10.1038/srep05910).
70. Khan Kareem A, Tse DY, Van Der Heijden ME, et al. Prolonged elevation of intraocular pressure results in retinal ganglion cell loss and abnormal retinal function in mice. *Exp Eye Res.* 2015;130:29–37, doi:[10.1016/j.exer.2014.11.007](https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.11.007).
71. Tehrani S, Johnson EC, Cepurna WO, Morrison JC. Astrocyte processes label for filamentous actin and reorient early within the optic nerve head in a rat glaucoma model. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(10):6945–6952, doi:[10.1167/iovs.14-14969](https://doi.org/10.1167/iovs.14-14969).
72. Samsel PA, Kiswisa L, Erichsen JT, Cross SD, Morgan JE. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(3):1671–1675, doi:[10.1167/iovs.09-3921](https://doi.org/10.1167/iovs.09-3921).
73. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 2006;83(2):429–437, doi:[10.1016/j.exer.2006.01.025](https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.025).
74. Dai C, Khaw PT, Yin ZQ, Li D, Raisman G, Li Y. Structural basis of glaucoma: the fortified astrocytes of the optic nerve head are the target of raised intraocular pressure. *Glia.* 2012;60(1):13–28, doi:[10.1002/glia.21242](https://doi.org/10.1002/glia.21242).
75. Hänninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, Poulin NR, Grosskreutz CL. Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 2002;25(6):389–395, doi:[10.1076/cery.25.6.389.14233](https://doi.org/10.1076/cery.25.6.389.14233).
76. Mukai R, Park DH, Okunuki Y, et al. Mouse model of ocular hypertension with retinal ganglion cell degeneration. *PLoS One.* 2019;14(1):e0208713, doi:[10.1371/journal.pone.0208713](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208713).
77. Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 2001;7:192–201.
78. Iwamoto K, Birkholz P, Schipper A, Mata D, Linn DM, Linn CL. A nicotinic acetylcholine receptor agonist prevents loss of retinal ganglion cells in a glaucoma model. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(2):1078–1087, doi:[10.1167/iovs.13-12688](https://doi.org/10.1167/iovs.13-12688).
79. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC MJ. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(11):3415–3419.
80. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC MJ. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1380–1385.
81. Cordeiro MF, Guo L, Luong V, et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(36):13352–13356, doi:[10.1073/pnas.0405479101](https://doi.org/10.1073/pnas.0405479101).
82. Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(1):175–182, doi:[10.1167/iovs.04-0832](https://doi.org/10.1167/iovs.04-0832).
83. Cesareo M, Martucci A, Ciuffoletti E, et al. Association between Alzheimer's disease and glaucoma: a study based on Heidelberg retinal tomography and frequency doubling technology perimetry. *Front Neurosci.* 2015;9(DEC):1–8, doi:[10.3389/fnins.2015.00479](https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00479).
84. Xu XH, Zou JY, Geng W, Wang AY. Association between glaucoma and the risk of Alzheimer's disease: a systematic review of observational studies. *Acta Ophtalmol.* 2019;97(7):665–671, doi:[10.1111/ao.14114](https://doi.org/10.1111/ao.14114).
85. Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y. Neurosteroids and oxysterols as potential therapeutic agents for glaucoma and Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry (London).* 2018;08(1):344–359, doi:[10.4172/neuropsychiatry.1000356](https://doi.org/10.4172/neuropsychiatry.1000356).
86. Pang I-H, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2020;75:100799, doi:[10.1016/J.PRETEYERES.2019.100799](https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2019.100799).
87. Zhao M, Valamanesh F, Celierer I, et al. The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Müller glial cells. *FASEB J.* 2010;24(9):3405–3415, doi:[10.1096/fj.09-154344](https://doi.org/10.1096/fj.09-154344).
88. Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(3):235–241, doi:[10.1097/01.mnh.0000165889.60254.98](https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000165889.60254.98).
89. Guo L, Normando EM, Nizari S, Lara D, Francesca Cordeiro M. Tracking longitudinal retinal changes in experimental

- ocular hypertension using the cSLO and spectral domain-OCT. *Investig Ophthal Vis Sci.* 2010;51(12):6504–6513, doi:[10.1167/iovs.10-5551](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5551).
90. Cuenca N, Fernández-Sánchez L, Sauvé Y, et al. Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front Neuroanat.* 2014;8(DEC):1–20, doi:[10.3389/fnana.2014.00151](https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00151).
91. Adachi K, Takahashi S, Yamauchi K, Mounai N, Tanabu R, Nakazawa M. Optical coherence tomography of retinal degeneration in royal college of surgeons rats and its correlation with morphology and electroretinography. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162835, doi:[10.1371/journal.pone.0162835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162835).
92. Nadal-Nicolás FM, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. The aging rat retina: from function to anatomy. *Neurobiol Aging.* 2018;61:146–168, doi:[10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.021](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.021).
93. Ramirez AI, de Hoz R, Salobrar-Garcia E, et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(JUL):1–21, doi:[10.3389/fnagi.2017.00214](https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00214).
94. Nitta E, Hirooka K, Tenkomo K, et al. Aldosterone: A mediator of retinal ganglion cell death and the potential role in the pathogenesis in normal-tension glaucoma. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):e711–6, doi:[10.1038/cddis.2013.240](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.240).
95. Takasago Y, Hirooka K, Nakano Y, Kobayashi M, Ono A. Elevated plasma aldosterone levels are associated with a reduction in retinal ganglion cell survival. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2018;19(3):1470320318795001, doi:[10.1177/1470320318795001](https://doi.org/10.1177/1470320318795001).
96. Zhao M, Rodríguez-Villagra E, Kowalcuk L, et al. Tolerance of high and low amounts of PLGA microspheres loaded with mineralocorticoid receptor antagonist in retinal target site. *J Control Release.* 2017;266:187–197, doi:[10.1016/j.jconrel.2017.09.029](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.029).
97. Zhao M, Célérier I, Bousquet E, et al. Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2672–2679, doi:[10.1172/JCI61427](https://doi.org/10.1172/JCI61427).
98. Prunte C, Flammer J. Choroidal capillary and venous congestion in central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1996;121(1):26–34, doi:[10.1016/S0002-9394\(14\)70531-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)70531-8).
99. Forooghian F, Meleth AD, Cukras C, Chew EY, Wong WT, Meyerle CB. Finasteride for chronic central serous chorioretinopathy. *Retina.* 2011;31(4):766–771, doi:[10.1097/IAE.0b013e3181f04a35](https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181f04a35).
100. Moore S, Thanos S. Differential increases in rat retinal ganglion cell size with various methods of optic nerve lesion. *Neurosci Lett.* 1996;207(2):117–120, doi:[10.1016/0304-3940\(96\)12500-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12500-3).
101. Neumann F, Wurm A, Linnertz R, et al. Sex steroids inhibit osmotic swelling of retinal glial cells. *Neurochem Res.* 2010;35(4):522–530, doi:[10.1007/s11064-009-0092-8](https://doi.org/10.1007/s11064-009-0092-8).
102. O'Steen WK, Sweatt AJ, Eldridge JC, Brodish A. Gender and chronic stress effects on the neural retina of young and mid-aged Fischer-344 rats. *Neurobiol Aging.* 1987;8(5):449–455, doi:[10.1016/0197-4580\(87\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(87)90040-6).
103. Roche SL, Wyse-Jackson AC, Gómez-Vicente V, et al. Progesterone attenuates microglial-driven retinal degeneration and stimulates protective fractalkine-CX3CR1 signaling. *PLoS One.* 2016;11(11):1–27, doi:[10.1371/journal.pone.0165197](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165197).
104. O'Steen WK. Ovarian steroid effects on light-induced retinal photoreceptor damage. *Exp Eye Res.* 1977;25(4):361–369, doi:[10.1016/0014-4835\(77\)90103-8](https://doi.org/10.1016/0014-4835(77)90103-8).
105. Porciatti V. Electrophysiological assessment of retinal ganglion cell function. *Exp Eye Res.* 2014;141:164–170, doi:[10.1016/j.exer.2015.05.008](https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.05.008).
106. Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG WJ. The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(2):514–522.

**9.4 ARTÍCULO 4:** Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats.

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Herrero Vanrell R, Pablo L, Bravo Osuna I, Munuera I, Garcia-Martin E.*

*Exp Eye Res. 2023; 28:238:109736.*

DOI: 10.1016/j.exer.2023.109736

ISSN: 0014-4835

PMID: 38036216

Factor de impacto (JCR 2022): 3,4.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2022: 16/62 (Cuartil 2; Tercil 1).



Research article

## Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-Weeks follow-up study in rats

M.J. Rodrigo<sup>a,b,c</sup>, T. Martínez-Rincon<sup>a,b</sup>, M. Subias<sup>a,b</sup>, S. Mendez-Martinez<sup>a,b</sup>, D. García-Herranz<sup>d,e</sup>, J. García-Feijoo<sup>d,f,g</sup>, R. Herrero-Vanrell<sup>c,e,f,h</sup>, L. Pablo<sup>a,b,c,i</sup>, I. Bravo-Osuna<sup>d,e,f,h</sup>, I. Munuera<sup>a,b</sup>, E. García-Martin<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Miguel Servet Ophthalmology Research Group (GIMSO), Aragon Health Research Institute (IIS Aragón), University of Zaragoza, Spain

<sup>c</sup> National Ocular Research Network RD21/0002/0050. RICORS Red de Enfermedades Inflamatorias (RD21/0002). Carlos III Health Institute, Spain

<sup>d</sup> National Ocular Pathology Network (OFTARED), Carlos III Health Institute, Spain

<sup>e</sup> Ophthalmology Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development (InnOftal) Research Group, UCM 920415, Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

<sup>f</sup> Health Research Institute, San Carlos Clinical Hospital (IdSSC), Madrid, Spain

<sup>g</sup> Department of Ophthalmology, San Carlos Clinical Hospital, Complutense University of Madrid, Spain

<sup>h</sup> University Institute for Industrial Pharmacy (IUFI), School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

<sup>i</sup> Biotech Vision, Instituto Oftalmológico Quirón, Zaragoza, Spain

---

ARTICLE INFO

ABSTRACT

**Keywords:**

Sex  
Glaucoma  
Neurodegeneration  
PLGA microspheres  
Dexamethasone  
Corticosteroid  
Fibronectin

The objective was to evaluate ocular changes based on sex in steroid-induced glaucoma models in rats comparing healthy controls, over 24 weeks follow-up. Eighty-nine Long-Evans rats (38 males and 51 females) with steroid-induced glaucoma were analysed. Two steroid-induced glaucoma models were generated by injecting poly-*co*-lactic-glycolic acid microspheres loaded with dexamethasone (MMDEX model) and dexamethasone-fibronectin (MMDEXAFIBRO model) into the ocular anterior chamber. Intraocular pressure was measured by rebound tonometer Tonolab®. Neuroretinal function was analysed using dark- and light-adapted electroretinography (Roland consult® RETIanimal ERG), and structure was analysed using optical coherence tomography (OCT Spectralis, Heidelberg® Engineering) using Retina Posterior Pole, Retinal Nerve Fibre Layer and Ganglion Cell Layer protocols over 24 weeks. Males showed statistically ( $p < 0.05$ ) higher intraocular pressure measurements. In both sexes and models neuroretinal thickness tended to decrease over time. In the MMDEX model, males showed higher IOP values and greatest percentage thickness loss in the Ganglion Cell Layer ( $p = 0.015$ ). Females receiving MMDEXAFIBRO experienced large fluctuations in thickness, a higher percentage loss (on average) in Retina Posterior Pole ( $p = 0.035$ ), Retinal Nerve Fibre Layer and Ganglion Cell Layer than aged-matched males, and the highest thickness loss rate by mmHg. Although no difference was found by sex in dark- and light-adapted electroretinography, increased amplitude in photopic negative response was found in MMDEX males and MMDEXAFIBRO females at 12 weeks. Although both glaucoma models used dexamethasone, different intraocular pressure and neuroretinal changes were observed depending on sex and other influential cofactors (fibronectin). Both sex and the induced glaucoma model influenced neuroretinal degeneration.

### 1. Introduction

Primary open-angle glaucoma (POAG) is a neurodegenerative optic pathology causing blindness. Around 60 million people around the world currently suffer from this pathology. By 2040, glaucoma is forecast to affect 111.8 million people (Tham et al., 2014). The National Eye

Institute (NEI) reported overall higher prevalence of glaucoma in females (2.21% in females vs. 1.67% in males), which was attributed to longer life expectancies in women and disadvantages in socio-economic/health beliefs (Quigley and Broman, 2006; Vajaranant et al., 2010). Women are more affected by all types of glaucoma (around 55% of POAG in 2010) (Vajaranant et al., 2010; Quigley and Broman, 2006).

\* Corresponding author. C/ Padre Arrupe. Servicio de Oftalmología, Edificio de consultas externas, planta 1. 50009 Zaragoza (Spain)  
E-mail address: [egmvivax@unizar.es](mailto:egmvivax@unizar.es) (E. García-Martin).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109736>  
Received 16 July 2023; Received in revised form 16 November 2023; Accepted 21 November 2023  
Available online 28 November 2023  
0014-4835/© 2023 Published by Elsevier Ltd.

Moreover, in ocular research the consistency across laboratories, animal models, and various injury models supports the idea of menopause as a sex-specific risk factor for developing glaucoma (Douglass et al., 2023). However, several studies and meta-analyses of the prevalence of POAG have consistently shown men to be 1.36 to 1.37 times more likely than women to have POAG after adjusting for age, race, and study design (Tham et al., 2014; Rudnicka et al., 2006; Chan et al., 2016, 2017).

The progressive death of retinal ganglion cells (RGCs) can be caused by an increase in intraocular pressure (IOP) (Matlach et al., 2018), ("The Advanced Glaucoma Intervention Study: 7, 2000. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration," 2000) IOP is the biggest modifiable risk factor for developing glaucoma. Male sex and age were associated to higher IOP in a large cohort, after adjusting for confounders (Chan et al., 2016). However, there are other non-modifiable risk factors such as race, or family history of glaucoma (Hollands et al., 2013). Glucocorticoids (GCs), such as dexamethasone, can raise IOP, leading to steroid-induced glaucoma (SIG) (Razeghinejad and Katz, 2012), which shares some characteristics with POAG. (Chan et al., 2019; Fini et al., 2017; Phulke et al., 2017). Chronic exposure to GCs also exerts a negative effect on neurons by exacerbating the damage caused by amyloid deposition or glutamate, leading to dendritic retraction, maladaptive glial cell alterations and neuron damage or loss (Vyas et al., 2016).

Ophthalmic research data on sex differences in glaucoma are still relatively scarce (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d). Moreover, although the eye has been considered a sex-neutral organ, nowadays there is literature evidence suggesting that multiple cell types within retina express different estrogen receptors and different responsiveness to sex hormones (Kobayashi et al., 1998; Wickham et al., 2000). Until now, increased risk of POAG has been posited in conjunction with low estrogenic exposure due to the reduced protective effect of the estrogens in the eye (Nuzzi et al., 2018; Shin et al., 2018). Estrogens reduce vascular resistance, which increases blood flow in the optic nerve and retina (Schmidl et al., 2015). Estrogens also protect the extracellular matrix (Zalewski et al., 2012) of the trabecular meshwork and lamina cribrosa, and in animal studies (Nakazawa et al., 2006; Pietrucha-Dutczak et al., 2018) they act as an endogenous neuroprotector maintaining RGC viability and intraretinal synapsis even under conditions of ocular hypertension (OHT) (Lambert et al., 2017; Prokai-Tatrai et al., 2013). Moreover, estrogens can mitigate the negative effects of GCs on neurons by up-regulating the GC receptors, thereby reducing the exposure time to GCs (Ycaza Herrera and Mather, 2015). It has been suggested that sex could even modulate sensitivity to GCs and the action and potency of GCs in a murine model with hyperreactivity (Corteling and Trifilieff, 2004).

In addition to the ethical issues, sex equality in animal studies is now recommended as part of an increasing interest in the influence of sex on aging and immune-linked pathologies such as Alzheimer's disease or glaucoma, in which females are more frequently affected (Cascio et al., 2015; Klein and Flanagan, 2016). Previous clinical trials produced biased information, as it was recommended that females be excluded (Klein and Flanagan, 2016).

In order to broaden understanding of the influence of sex in glaucoma, in a previous study our group used two ocular hypertensive models (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d) to show that premenopausal female rats experience structural and functional neuroprotection at an early phase of chronic glaucoma. This paper is the first study that also analyses the influence of sex on chronic SIG by measuring IOP and the structure and function of rat neuroretinas in two different SIG models (Aragón-Navas et al., 2022; Rodrigo et al., 2021a,b,c,d).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Based on a preliminary study we calculated the sample size needed to detect differences of at least 5  $\mu\text{m}$  in thickness measured by OCT

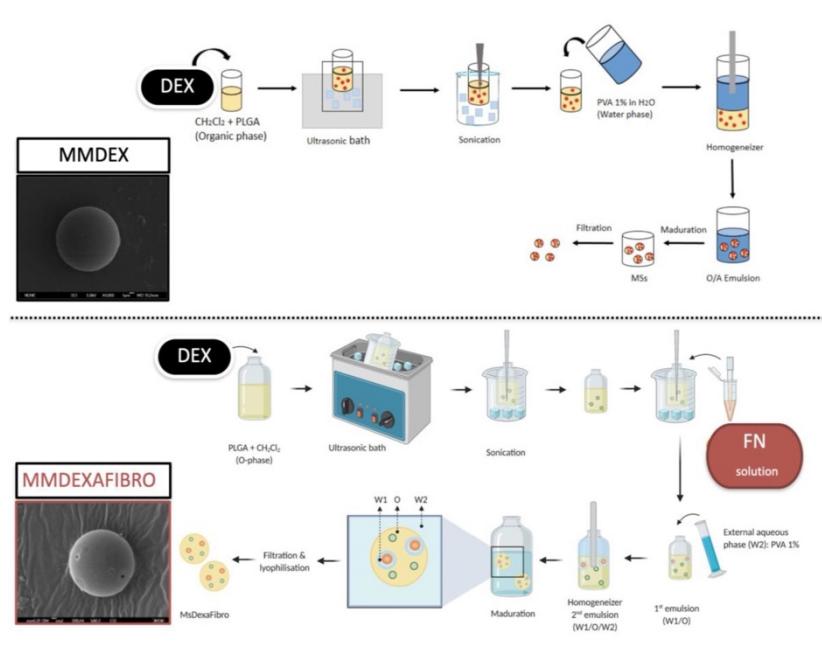
(average thickness of the retinal nerve fiber layer), applying a bilateral test with  $\alpha$  5% risk and  $\beta$  10% risk (i.e., with a power of 90%). The male/female ratio was determined to be 0.5. From these data it was concluded that at least 72 eyes (36 from male rats and 36 from female rats) would be necessary. Finally, we included a total of 89 eyes in each group (38 males and 51 females) to increase the power of the study. In addition, 95 extra animals were used as controls.

The work with animals was approved by the Ethics Committee for Animal Research (PI34/17) and was carried out at the Biomedical Research Centre of Aragon (CIBA) in strict accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology's Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Long-Evans rats aged 4 weeks old and weighing 50–100 g at the beginning of the study were housed in standard cages with environmental enrichment and water and food *ad libitum* and were kept under animal welfare conditions (e.g., 12-h dark-light cycled room at a temperature of 22 °C and at 55% relative humidity). Both sexes were used. The male-to-female ratio (40% males/60% females) was based on the space allowance of our facilities and to preserve the European animal welfare regulations. To keep the animals in groups throughout the study, and to avoid isolated animals, 3 females and 2 males were placed separately in each cage.

A total of 89 animals (38 males [M] and 51 females [F]) were used to generate two different SIG models by injecting into the anterior chamber of the rat eyes a 2- $\mu\text{L}$  suspension of poly (co-lactic-glycolic acid) (PLGA) microspheres (Ms) with size fractions (10–20  $\mu\text{m}$ ) and loaded with steroid, to induce ocular hypertension (OHT). Forty-three animals (20 M and 23 F) received Ms loaded with dexamethasone (10% w/v; MMDEX) (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d), and 46 animals (18 M and 28 F) received Ms co-loaded with dexamethasone and fibronectin (10% w/v; MMDEXAFIBRO) (Aragón-Navas et al., 2022). On the other hand, a total of 95 animals were used as controls. Ten animals (4 M and 6 F) received into the anterior chamber of the eyes a 2- $\mu\text{L}$  suspension of 20/10-sized non-loaded PLGA Ms at baseline with the aim of demonstrating that the IOP increase and neurodegeneration in the SIG models were due to the effect of dexamethasone and not to the volume injected. And another 85 healthy animals (31 M and 54 F) did not receive any kind of injection or surgical intervention.

The Ms were obtained from the Ophthalmology Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development (InnOftal) Research Group (Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain). Non-loaded Ms produce a physical blockage of aqueous humor outflow (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d), but steroid-loaded Ms also exert a pharmacological effect with alteration of the trabecular meshwork (Aragón-Navas et al., 2022; Rodrigo et al., 2021a,b,c,d). Spherical, non-porous surfaced PLGA Ms non-loaded 20–10  $\mu\text{m}$  size fraction were obtained using the oil-in-water (O/W) emulsion solvent extraction-evaporation technique, as described (García-Herranz et al., 2021). The loaded Ms (MMDEX) (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d) were also obtained by applying the solvent extraction-evaporation method to an oil-in-water (O/W) emulsion, obtaining non-porous surfaces. The co-loaded Ms (MMDEXAFIBRO) (Aragón-Navas et al., 2022) were prepared via water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion technique, which showed small surface pores. Dexamethasone loading was approximately 60  $\mu\text{g}$  Dexamethasone/mg Ms for the MMDEX and approximately 72  $\mu\text{g}$  Dexamethasone/mg Ms for the MMDEXAFIBRO with sustained release of glucocorticoids. Fig. 1 summarizes the methodological preparation of microspheres for both SIG models. For a more detailed description of these loaded Ms, see previous studies published by the research group.

All the OHT injections were performed in the right eye (RE) using a 10- $\mu\text{L}$  Hamilton® syringe and glass micropipette under surgical and temperature-controlled conditions and included topical tetracaine (1 mg/ml + oxybuprocaine 4 mg/ml) eye drops (Anestesico doble Colircusi®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain), gas anaesthetic (mixture of 3% sevoflurane gas and 1.5% oxygen), and subcutaneous analgesia (dilution 1/10 of buprenorphine; 0.05 mg/kg). Afterwards the rats were left to recover in an enriched 2.5% oxygen atmosphere and antibiotic



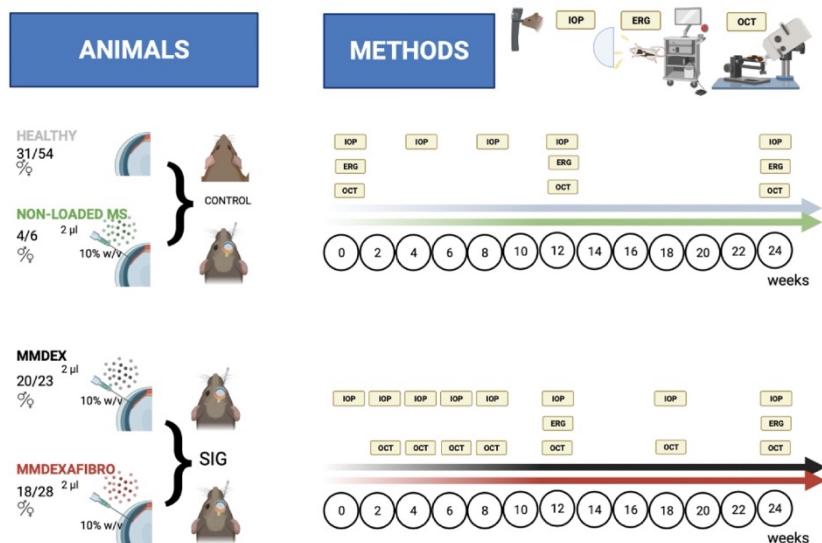
**Fig. 1.** Methodology for the elaboration of microspheres for the steroid induced glaucoma models. Abbreviations: MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; DEX: dexamethasone; FN: fibronectine.

ofloxacin (3 mg/ml) (Exocin Colircusi®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain) eye drops were administered. The MMDEX Ms were injected at baseline and week 4 but the MMDEXAFIBRO Ms were only injected at baseline in order to produce a mild and sustained increase in IOP.

## 2.2. Ophthalmological clinical evaluation

The methodology was deeply described in (Aragón-Nava et al., 2022; Rodrigo et al., 2021a,b,c,d), as summary:

Right eye's intraocular pressure (IOP) measurements were recorded from both control cohorts at baseline, 4 (puberty onset), 8 (youth), 12 (early adulthood) and 24 (adult middle age) weeks, and from both SIG models at baseline, 2, 4, 6, 8, 12, 18, and 24 weeks by Tonolab® tonometer under a sedative mixture of 3% sevoflurane gas and 1.5% oxygen for less than 3 min as recommended (Ding et al., 2011). No eye drops were used for measuring as recommended by the manufacturer (Tonolab, Tirolat Oy, Helsinki, Finland). IOP measurements were recorded each day at the same time (in the morning, around 9 a.m.) to avoid



**Fig. 2.** Work with animals. Abbreviations: SIG: steroid induced glaucoma; HEALTHY: control cohort; NON-LOADED PLGA MS: model for microspheres unloaded; MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; IOP: intraocular pressure; OCT: optical coherence tomography; ERG: electroretinography.

the fluctuation pattern due to the circadian cycle (Lozano et al., 2015). The IOP value was the average of three consecutive measurements, taken from the average of 6 rebounds. Fig. 2 summarized the work with animals.

To quantify the neuroretinal structure *in vivo*, an optical coherence tomography (OCT) device (OCT Spectralis, Heidelberg® Engineering, Germany) was used in combination with a contact lens adapted to the right eye's rat cornea in order to obtain higher quality readings. OCT measurements took around 3–4 min for each eye. The protocols used were the Retina Posterior Pole (R), Retinal Nerve Fibre Layer (RNFL) and Ganglion Cell Layer (GCL). All of them measured a 3 mm diameter area centred on the optic disc (since rodents do not have a macula) via 61 b-scans. The Retina (thickness from the inner limiting membrane to the retinal pigment epithelium) and the GCL (from the RNFL to the inner nuclear layer boundaries) were measured. Both were divided into the 9 ETDRS areas ("Photocoagulation for Diabetic Macular Edema, 1985"), which included a central (C) 1 mm circle centred on the optic disc (as rats do not have a clear fovea) and the inner (inferior -II-, superior -IS-, nasal -IN-, temporal -IT-) and outer (inferior -OI-, superior -OS-, nasal -ON-, temporal -OT-) rings measuring 2 and 3 mm in diameter, respectively. Total volume (TV) was also measured. The RNFL protocol analysed the thickness from the inner limiting membrane to the GCL boundaries, dividing it into 6 sectors (inferotemporal -IT-, inferonasal -IN-, superotemporal -ST-, superonasal -SN-, nasal -N- and temporal -T-) (Fig. 3).

To quantify neuroretinal functionality, electroretinography (ERG) (Roland consult® RETIanimal ERG, Germany) was used in conjunction

with the scotopic full-field ERG and light-adapted Photopic Negative Response (PhNR) protocols. The scotopic ERG test was performed after 12 h of dark adaptation and the eyes were fully dilated with topical eye drops containing tetracaine (1 mg/ml + oxybuprocaine 4 mg/ml) (Anestesico doble Colircusi®, Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain), mydriatics (Tropicamide 10 mg/ml, Phenylephrine 100 mg/ml) (Alcon Cusí® SA, Barcelona, Spain) and lubricated with hyromellose 2% (Methocel® OmniVision, Germany). Active electrodes were placed on the cornea, references were placed at both sides under the skin, and the ground electrode was placed near the tail. Electrode impedance was accepted with a difference <2 kΩ between electrodes. Both eyes were simultaneously tested using a Ganzfeld Q450 SC sphere with white LED flashes for stimuli and seven steps of increasing luminance intensity and intervals. The scotopic test examined rod response: phase 1: −40 dB, 0.0003 cd/m<sup>2</sup>, 0.2 Hz [20 recordings averaged]; phase 2: −30 dB, 0.003 cd/m<sup>2</sup>, 0.125 Hz [18 recordings averaged]; phase 3: −20 dB, 0.03 cd/m<sup>2</sup>, 8.929 Hz [14 recordings averaged]; phase 4: −20 dB, 0.03 cd/m<sup>2</sup>, 0.111 Hz [15 recordings averaged]; phase 5: −10 dB, 0.3 cd/m<sup>2</sup>, 0.077 Hz [15 recordings averaged]; mixed rod-cone response: phase 6: 0 dB, 3.0 cd/m<sup>2</sup>, 0.067 Hz [12 recordings averaged]; and oscillatory potentials: step 7: 0 dB, 3.0 cd/m<sup>2</sup>, 29.412 Hz [10 recordings averaged]. The PhNR protocol was performed after light adaptation to a blue background (470 nm, 25 cd/m<sup>2</sup>), and a red LED flash (625 nm, −10 dB, 0.30 cd/m<sup>2</sup>, 1.199 Hz [20 recordings averaged]) was used as stimulus. Latency (in milliseconds) and amplitude (in microvolts) were studied in a, b and PhNR waves.

OCT tests were performed at baseline, 2, 4 (puberty onset), 6, 8

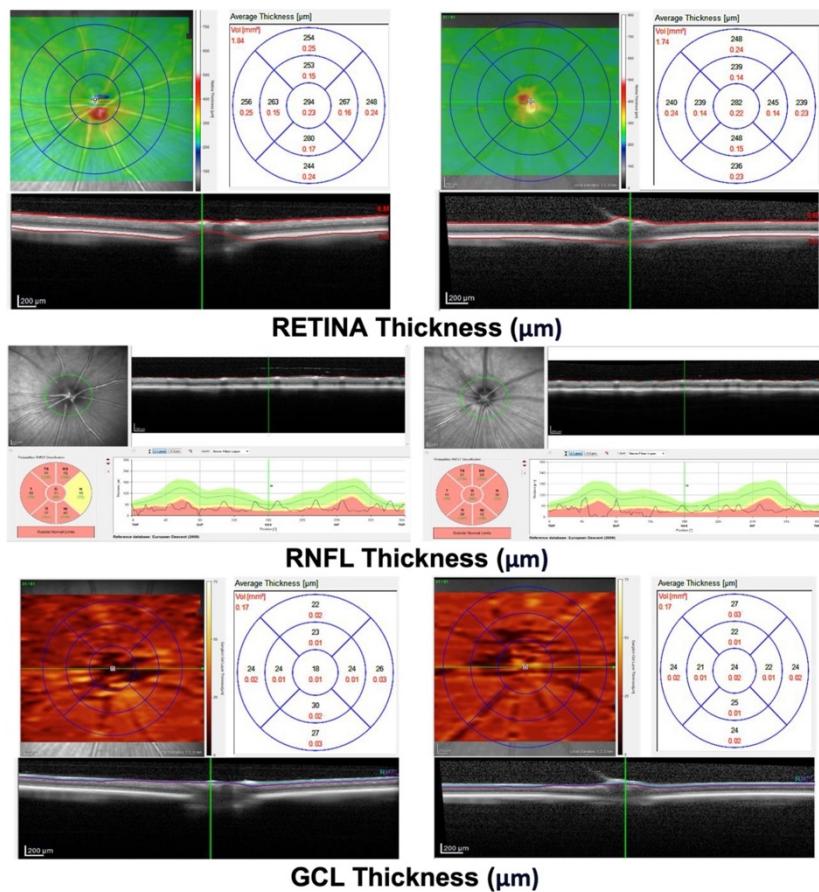


Fig. 3. Representative images of the OCT protocols. Male rat (left) and female rat (right).

(youth), 12 (early adulthood) 18 and 24 (adult middle age) weeks in both SIG models (MMDEX and MMDEXAFIBRO), but at 12 and 24 weeks in both control cohorts (non-loaded Ms and healthy). ERG tests were performed in the four cohorts at baseline, 12 and 24 weeks. Both OCT and ERG test conducted with intraperitoneal anaesthesia (a mixture of 60 mg/kg Ketamine + 0.25 mg/kg Dexmedetomidine). At least 5 animals, 2 males and 3 females explored at each study time. A trained masked researcher rejected or manually corrected the readings if the algorithm had clearly failed. No animal restraint was need for ERG and OCT tests as the animals were intraperitoneally anesthetized.

### 2.3. Statistical analysis

Data from this longitudinal study were recorded in an Excel database and statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). To assess sample distribution, the Kolmogorov-Smirnov test was used; given the parametric distribution, Student's T test was performed to evaluate the differences between the two cohorts' male/female subjects followed by a Bonferroni correction. ANOVA was used to analyse the IOP-Time curves and PhNR comparisons among cohorts followed by Post hoc analysis. All values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Values of  $p < 0.05$  (expressed as \*) were considered to indicate statistical significance and the Bonferroni correction for multiple comparisons was calculated to avoid a high false-positive rate. The level of significance for each variable was established based on Bonferroni calculations (expressed as #). The images were created using Power Point® and Biorender® softwares.

## 3. Results

The following results are always extracted from the right eye since the steroid glaucoma models were induced on it. The contralateral left eye was not used as control anytime.

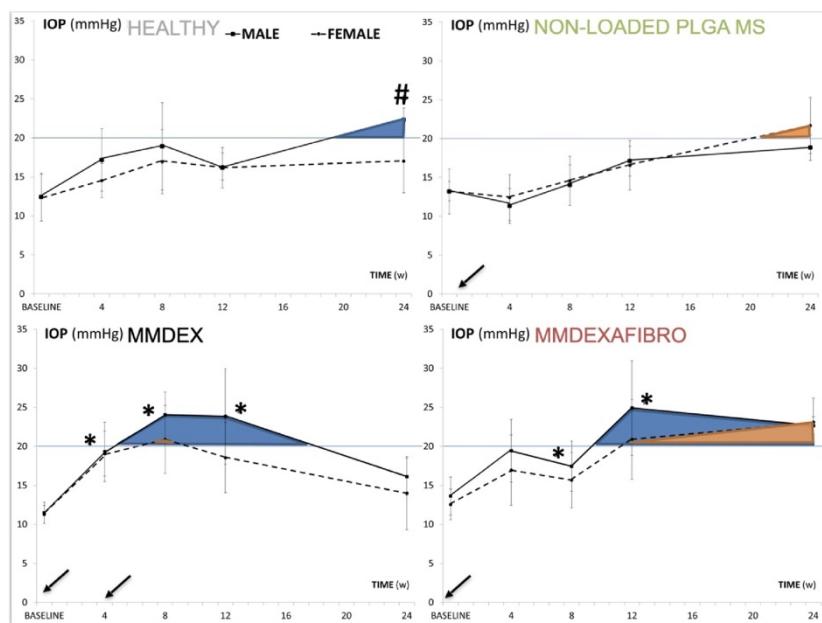
### 3.1. Intraocular pressure

In the four cohorts, both sexes experienced progressive increases in IOP over time, even reaching ocular hypertension (OHT:  $>20$  mmHg) in the two SIG models (MMDEX at 8 weeks and MMDEXAFIBRO at 12 weeks). In contrast, in healthy animals only males, and in the cohort injected with non-loaded Ms only females reached OHT at 24 weeks (28 weeks-of-age). More fluctuations in IOP were observed in SIG models, based on microspheres (Fu et al., 2018). Male rats in both SIG models and healthy controls reached higher OHT levels earlier than females. Female rats presented lower measurements, especially in the dexamethasone-loaded microsphere model. (Fig. 4).

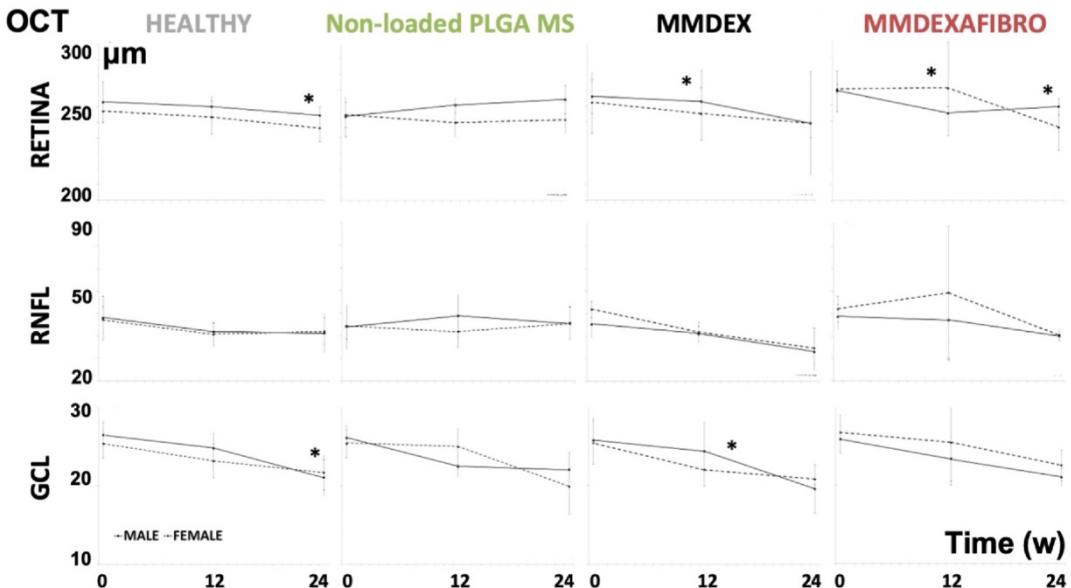
### 3.2. Structural neuroretinal analysis using in vivo optical coherence tomography (OCT)

Neuroretinal thickness was quantified in both sexes and in both chronic SIG models (see Supplementary Tables S1 and S2). A decrease in thickness was observed over the study in all cohorts. Fig. 5 shows the longitudinal change in neuroretinal thickness in order to detect the study times when the greatest sex differences occur. In control animals statistically significant differences by sex were not found, but healthy cohort which showed differences at the end of the study (week 24) (Rodrigo et al., 2020). However, in both SIG models these differences were found at earlier times. A fluctuation (measured as an increase in thickness) was detected around week 12 in the cohorts with ocular injections, especially in R and RNFL parameters and in MMDEXAFIBRO cohort. While both sexes showed similar thickness pattern in the healthy and MMDEX cohorts, females exhibited a larger peak in the MMDEXAFIBRO cohort (Fig. 5). Males tended to show greater R thickness over time but lower RNFL and GCL thickness at the end of the study.

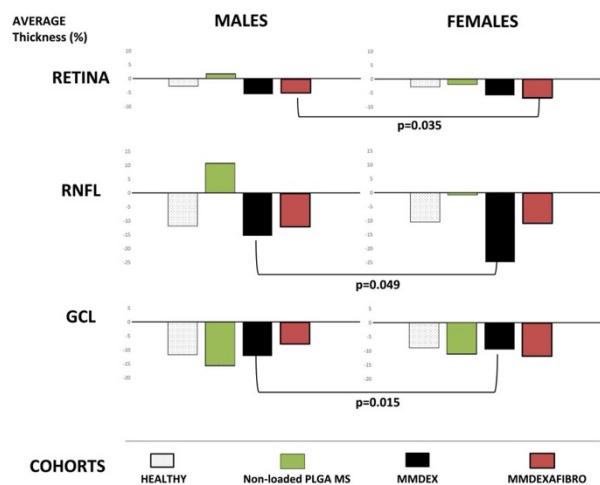
The percentage loss in thickness in both sexes and both control cohorts and chronic SIG models over the study were analysed (Fig. 6). In



**Fig. 4.** Intraocular pressure (IOP) curve in both sexes and chronic steroid-induced glaucoma (SIG) models over 24 weeks of follow-up. Abbreviations: HEALTHY: control cohort; NON-LOADED PLGA MS: model for microspheres unloaded; MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; IOP: intraocular pressure; m: male; f: female; w: weeks; arrows indicate the glaucoma-inducing ocular injection; the blue horizontal line marks ocular hypertension; colored in blue for males and orange for females when reached  $>20$  mmHg; Mean  $\pm$  standard deviation; \*: statistical significance  $p < 0.05$ ; #: statistical significance  $p < 0.020$ , for Bonferroni correction for multiple comparisons. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 5.** Structural analysis of the neuroretina using optical coherence tomography (OCT) in both sexes and chronic steroid-induced glaucoma (SIG) models. Abbreviations: non-loaded PLGA MS: model for the microspheres unloaded; MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; HEALTHY: control cohort; OCT: optical coherence tomography; RNFL: Retinal Nerve Fibre Layer; GCL: Ganglion Cell Layer complex; average thickness in microns ( $\mu\text{m}$ ); w: week; \*: statistical significance  $p < 0.05$ .



**Fig. 6.** Percentage neuroretinal structure loss measured using optical coherence tomography (OCT) in both sexes and chronic steroid-induced glaucoma (SIG) models over 24 weeks of follow-up. Abbreviations: non-loaded PLGA MS: model for the microspheres unloaded; MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; HEALTHY: control cohort; RNFL: Retinal Nerve Fibre Layer; GCL: Ganglion cell layer complex; (%): percentage; OCT: optical coherence tomography; M: male; F: female.

this way it is possible to identify the parameter, which as a whole presents more or less damage in SIG condition, and to be able to detect differences between sexes. The RNFL was the parameter to suffer the greatest loss in both SIG models, followed by GCL and finally R. The MMDEX cohort showed greatest percentage loss in RNFL (females  $p = 0.049$ ) and GCL (males  $p = 0.015$ ), while the MMDEXAFIBRO cohort exhibited greatest loss in R (females  $p = 0.035$ ) with statistical differences existing between sexes. As can be seen in Fig. 5, females in the

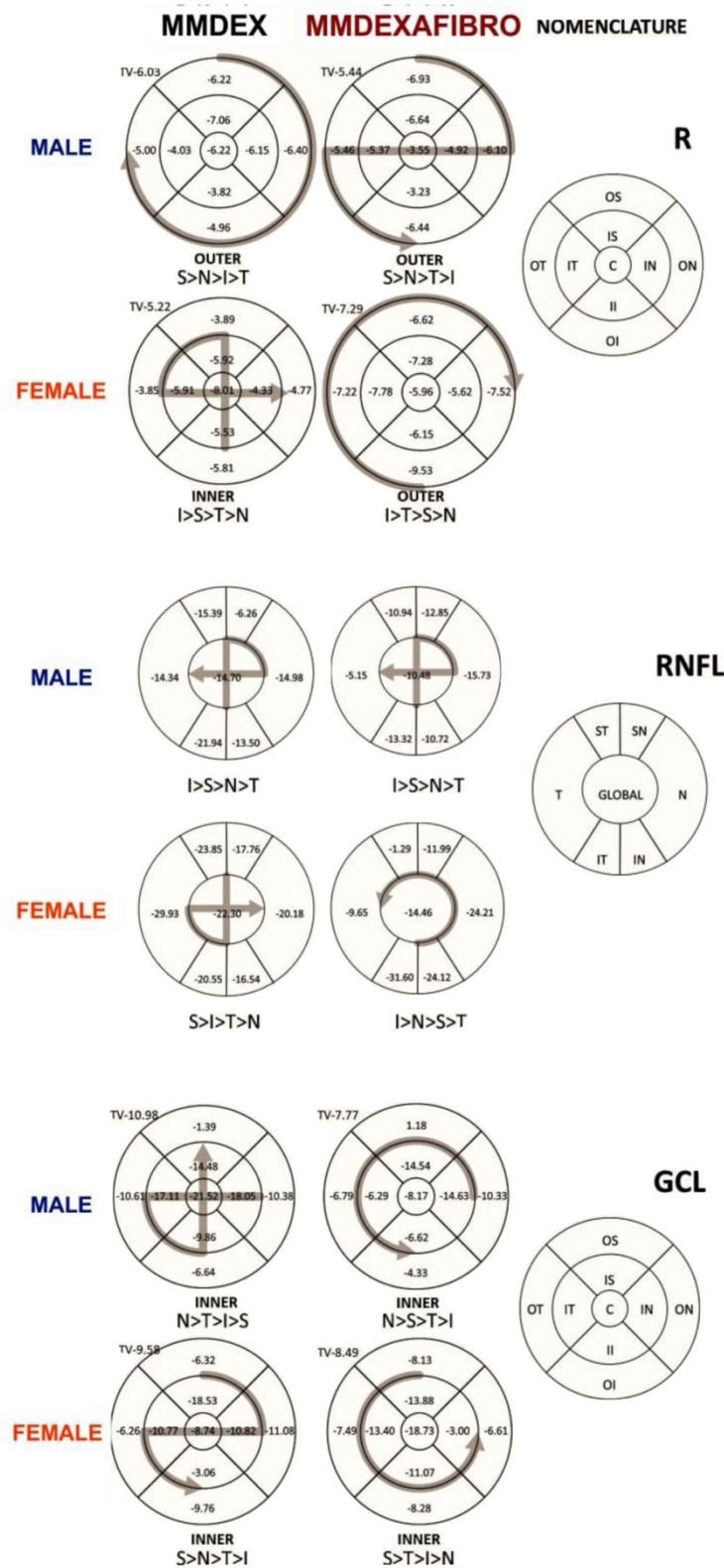
MMDEXAFIBRO cohort experienced greater percentage losses in all the explored parameters (R, RNFL and GCL) in averaged 24-week follow-up.

Perceptual loss of OCT thickness in each sector was also analysed to identify a sex-dependent neuroretinal degeneration pattern. Males in both SIG models exhibited the glaucoma ISNT (inferior > superior > nasal > temporal) decrease trend in the RNFL, but this was not observed in females. However, losses in contiguous sectors were found in females in the MMDEXAFIBRO cohort. Both sexes showed higher percentage losses in the outer sectors in the R, in the superior-inferior axis sectors in the RNFL and in the inner sectors in the GCL (Fig. 7).

To standardize the neuroretinal loss in both sexes and SIG models, the right eye loss rate per day and the IOP increase in mmHg per week were calculated from all OCT sector averages and expressed in  $\mu\text{m}/\text{mmHg/day}$ . This analysis allows evaluation of IOP-independent degeneration, since for each mmHg increase in IOP, the parameter showing greater damage will be due to non-IOP-dependent factors. The most affected parameter by average mmHg increase was R > RNFL > GCL. In the MMDEXAFIBRO cohort, females showed higher loss rates by mmHg increase in every parameter and point in time explored (see Fig. 8).

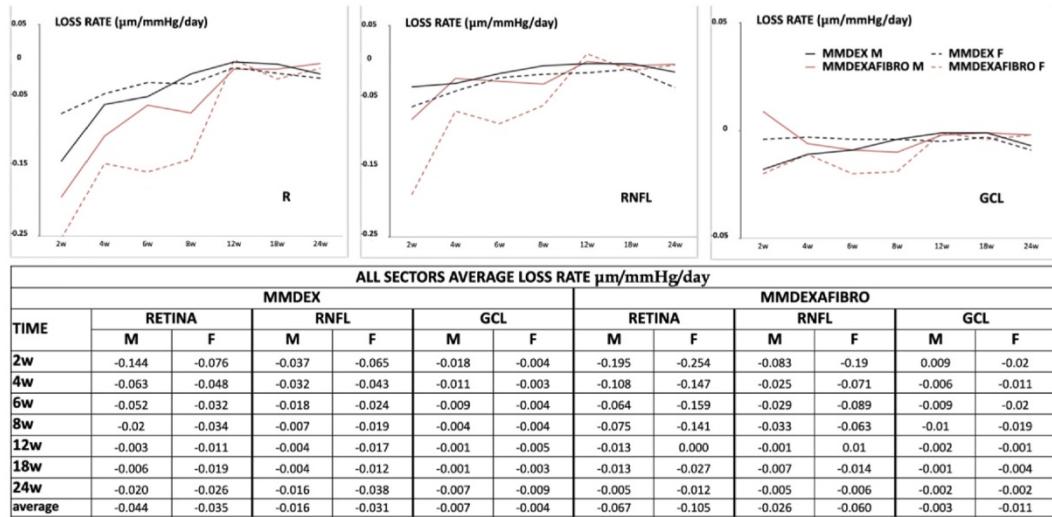
### 3.3. Functional neuroretinal analysis using *in vivo* electroretinography (ERG)

No clear difference between sexes was found in the SIG models in the scotopic ERG test at baseline throughout the follow-up (see Supplementary Material 1). In contrast, among healthy animals females exhibited higher signals at 12 weeks (Rodrigo et al., 2020). In the light-adapted PhNR test, which explores retina ganglion cell functionality, no latency differences were found between sexes in either the healthy cohort or any chronic SIG model. Healthy and control females tended to maintain functionality (in amplitude), in contrast to males who suffered greater loss at the end of the study ( $p > 0.05$ ). However, in both chronic SIG models functionality increased, especially at 12 weeks, occurring in males in the MMDEX model and in females in the MMDEXAFIBRO model (Fig. 9).

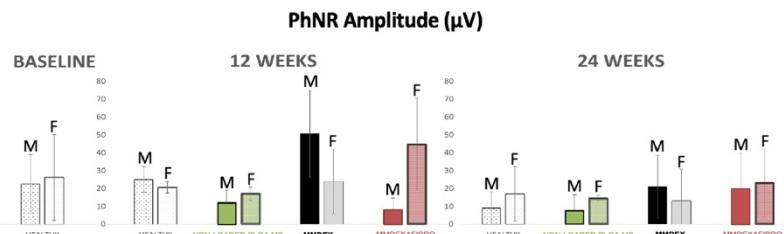


(caption on next page)

**Fig. 7.** Neuroretinal percentage loss in OCT sectors from baseline and loss trend averaged over 24 weeks of follow-up in steroid-induced glaucoma (SIG). Abbreviations: MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; M: male; F: female; R: retina; C: central; II: inner inferior; OI: outer inferior; IS: inner superior; OS: outer superior; IN: inner nasal; ON: outer nasal; IT: inner temporal; OT: outer temporal; RNFL: Retinal Nerve Fibre Layer; IT: inferior temporal; IN: inferior nasal; ST: superior temporal; SN: superior nasal; N: nasal; T: temporal; GCL: Ganglion Cell Layer complex; TV: total volume; I: inferior; S: superior; N: nasal; T: temporal; >: higher loss than.



**Fig. 8.** Neuroretinal loss rate measured using optical coherence tomography (OCT) in both sexes and chronic glaucoma models. Abbreviations: MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; M: male; F: female; w: week; RNFL: Retinal Nerve Fibre Layer; GCL: Ganglion Cell Layer complex.



**Fig. 9.** Neuroretinal function measured using light-adapted photopic negative response (PhNR) in steroid-induced glaucoma (SIG) models and sexes over 24 weeks of follow-up. Abbreviations: PhNR: photopic negative response;  $\mu$ V: microvolts; ms: milliseconds; blue background (470 nm, 25 cd s/m<sup>2</sup>), red LED flash (625 nm, -10 dB, 0.30 cd s/m<sup>2</sup>, 1.199 Hz [20 recordings averaged]) used as stimulus; non-loaded PLGA MS: model for the microspheres unloaded; HEALTHY: control cohort; MMDEX: model for microspheres loaded with dexamethasone; MMDEXAFIBRO: model for microspheres co-loaded with dexamethasone and fibronectin; M: male; F: female; Mean  $\pm$  standard deviation. Notice that at baseline only the healthy cohort was recorded, as all animals in all cohorts can be considered similar because no animals had been injected for model induction. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

#### 4. Discussion

Based on the scarce studies on the influence of sex on ophthalmological pathology, and specifically in glaucoma, our objective was to evaluate if sex influences glaucomatous neurodegeneration. A recent meta-analysis of patients with POAG found that susceptibility to glaucoma is higher in males (Zhang et al., 2021), although the overall prevalence is higher in females because glaucoma is an aging-linked disease and there is a higher prevalence of females in senescence (Vajaranant et al., 2010). A previous study by this group found a protective role in females from a functional and structural perspective after analysing two different induced ocular hypertensive animal models simulating POAG (episcleral sclerosis model vs biodegradable microspheres) and also found that the type of model used to induce the disease influenced neurodegeneration (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d). The aim of

this study was to analyse whether sex differences also appear in SIG by means of two models: a model induced with dexamethasone and another model induced with a lower amount of dexamethasone but adding fibronectin, an immunogenic protein involved in glaucoma (Roberts et al., 2020). To our knowledge, no previous clinical or animal study has addressed this issue.

An increase in IOP was observed in both control cohorts at 24 weeks (adult middle age) coinciding with previous ageing studies involving rodents (Rodrigo et al., 2020) and which have suggested this to be secondary to an increase in rigidity in the connective tissue of the eye (Zhao et al., 2018) and to ageing of the trabecular meshwork (Nettekoven et al., 2020). However, in both SIG models the OHT levels were reached at 8 and 12 weeks (youth and early adulthood). It demonstrates that the steroid suspensions caused the increase in IOP. It is worth mentioning that, in the MMDEX cohort, females became non-OHT at

week 12 (males did likewise at around week 16) while in the other groups IOP tended to increase. This paradoxical decrease in IOP was also found in rats after topical dexamethasone administration at 3 weeks, which has been suggested to be related to the reduction in orbital fat and orbital pressure (Sato K et al., 2016) in mice after systemic exposure to DEX, resulting in 40% dropout (Patel et al., 2023). It was also found in humans after intravitreal dexamethasone implantation but at 1 day (Alagöz, N. et al., 2020). Although unusual, our results are not the first to demonstrate a drop in IOP after chronic corticosteroid exposure. In our case, this unexpected fluctuation was detected at a later stage as the long follow-up of this study enabled us to detect this drop after intraocular administration when retinal damage had already occurred.

In our previous study, female rats exhibited lower IOP levels than males (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d). This finding was replicated in this study in both chronic SIG models (Aragón-Nava et al., 2022; Rodrigo et al., 2021a,b,c,d; Shan et al., 2017), suggesting that the presence of estrogenic receptors in the outflow pathway (Wickham et al., 2000) decreased outflow resistance even under steroid conditions. On the other hand, it is well known that gender differences are due to the effect of sex steroid hormones, which come from the metabolism of cholesterol transformed (Hanukoglu, 1992) by the action of different limiting enzymes in the mitochondria and/or endoplasmic reticulum (Payne and Hales, 2004). Neurosteroids (NS) are produced in the central nervous system, of which the retina is part. NS can modulate neurotransmitter receptors that are important for synapsis communication, to increase neurogenesis and to decrease inflammation and apoptosis, so NS could prevent neurodegenerative damage. A previous study (Ishikawa et al., 2018) explains the role of NS in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and glaucoma, although it highlights the need for further research, principally on glaucoma, due to the current lack of knowledge. In glaucoma there is mitochondrial alteration and an increase in oxidative agents that could alter NS synthesis. Moreover, sex-related differences have also been found in oxidative stress and neurodegeneration, exhibiting more extensive damage in males than in females (Tenkorang et al., 2018). In fact, Neumann et al. (2010) demonstrated that sex steroids inhibit osmotic swelling in retinal glial cells. The foregoing could explain the greater prevalence of glaucoma in males (as shown by our previous results (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d) and in the MMDEX cohort) and the subsequent equalization in post-menopausal females due to a lack of this protective effect (Dewundara et al., 2016).

To evaluate the neuroretinal differences due to sex in SIG, we designed an OCT-based study. The absence of histology is a limiting aspect in this research. However, OCT technology allows us to analyse the neuroretinal structure *in vivo*. Furthermore, several animal studies have demonstrated that OCT has a good correlation with immunocytochemistry and longitudinal tracking of neuroretinal changes (Cuenca et al., 2014). The study by sectors shows that the outer sectors of the retina are more affected, but in GCL it occurs in the inner sectors (in both SIG models and in both sexes). This suggests that sex does not seem to influence the topographic pathophysiology of retinal damage. In contrast, in the case of the optic nerve (RNFL), males in both SIG models presented the characteristic ISNT glaucoma rule, but this was not the case in females. These findings reinforce the idea of considering sex in glaucoma and open a window of study leading to re-evaluation of sectors by OCT in females and under SIG conditions.

In both SIG models, RNFL was the most affected parameter in percentage terms, demonstrating the reproducibility of a reliable glaucoma model, where onset starts at the optic nerve (Howell et al., 2007). However, in SIG models the R parameter, which analysed the full retinal thickness, was most affected by each mmHg increase. This suggests that the retina seems to be influenced by factors other than IOP, and conversely GCL damage or thinning is mainly influenced by IOP. The rate of loss in Retina and RNFL by independent IOP factors seems to be more pronounced at the beginning of the study, when damage is initiated (suspension injected) and IOP increases compared to control

cohorts. In contrast with the non-steroidal hypertensive models where GCL and RNFL were the parameters most affected by the IOP increase (Rodrigo et al., 2021a,b,c,d). Our results suggest that in the case of steroid-induced glaucoma, other factors (and in our case possibly also fibronectin) influence neuroretinal loss.

Fibronectin is a constitutive protein of the trabecular meshwork with immune involvement in the genesis of glaucoma (Faralli et al., 2019; Roberts et al., 2020). In this regard, the role of immunity has been demonstrated in several animal studies on glaucoma (Bosco et al., 2011; Rodrigo et al., 2021; Sapienza et al., 2016) and other neurodegenerative diseases (Ramirez et al., 2017), with differences occurring by sex. There is also known to be a higher prevalence of autoimmune diseases among females (Desai and Brinton, 2019). Accordingly, females in an animal model (Da Silva et al., 1993) with systemic chronic inflammation exhibited a greater tendency to generate activation signals and a greater sensitivity to inflammation factors.

In the healthy cohort, an increase in retinal thickness was detected in 16-week-old rats (week 12 of our study) of both sexes (Rodrigo et al., 2020). However, the cohorts with ocular injection an increase in thickness was observed, this being very significant in the parameters R and RNFL in the fibronectin-induced model in females. In this regard, in response to negative stimulus immune cells produce neurotoxic substances involved in neurological diseases and disorders. When a chronic inflammatory process occurs in patients with neurodegenerative ocular disease there is an exacerbation of the inflammatory process that accelerates the progression of the disease (Noailles et al., 2018). In glaucoma, the activated cells spread, as waves, from the outer plexiform layer to the inner limiting membrane, affecting the entire retinal thickness (Ramirez et al., 2017). Furthermore, an increase in glia in the optic nerve head has been described after induction of ocular hypertension (Mathew et al., 2021) which would be reflected in our study as an increase in thickness measured by OCT. In our study remarkable fluctuations were observed making difficult to describe a solid trend for either sex. These fluctuations could resemble those infiltrating waves of activated cells. However, this hypothesis could not be demonstrated by means of histological studies.

Females in the MMDEXAFIBRO cohort showed the highest percentage loss in all three OCT parameters. When they reached OHT levels ( $20.89 \pm 5.13$  mmHg) at week 12, they showed a peak in the retinal and RNFL thickness that coincided with bigger PhNR amplitude. In this regard, an increase in ERG signal has been described as a reflection of synaptic imbalance at the onset of IOP increase. This hyperactivity may be one of the earliest dysfunctions of the pathophysiological process of neurodegeneration (De Santiago et al., 2019) before decline (Maestú et al., 2019). This electrical hyperactivity was also observed in males in the MMDEX cohort at 12 weeks, again coinciding with OHT levels ( $23.83 \pm 6.11$  mmHg).

This immune activation leading to retinal neurodegeneration can be counteracted with sex hormones such as progesterone (Roche et al., 2016) that, together with the anti-inflammatory effect of dexamethasone, would have caused narrower variations in the retinal thickness detected by OCT in females vs males in the MMDEX cohort. This would also be the case in MMDEX (60 µg Dexamethasone/mg Ms, injected twice) vs MMDEXAFIBRO (72 Dexamethasone/mg Ms injection once) due to the larger amount of dexamethasone in the former. However, in the MMDEXAFIBRO cohort females could have responded more due to the proimmunogenicity of fibronectin. Females in the MMDEXAFIBRO cohort exhibited a higher neuroretinal loss rate (loss of thickness per each mmHg increase) vs the MMDEX cohort, supporting the idea of the involvement of non-dependent IOP damage. In any case, in our study the highest neuroretinal loss overall occurred in the MMDEX model, which exhibited higher IOP levels, thereby strengthening the case for IOP as the main risk factor in glaucoma.

Our results support the hypothesis that premenopausal rats seem to be more protected in POAG and SIG models. However, other cofactors producing neurodegeneration could be also influenced by sex.

#### 4.1. Limitations and future studies

A limitation of our study is that the experimental groups are not entirely comparable, as they received one or two injections of microspheres into the anterior chamber. These two corticosteroid-induced glaucoma models were used because it is known that they produce slowly progressive IOP curves (Aragón-Nava et al., 2022). However, in the MMDEXAFIBRO model, due to the dual damage components of trabecular meshwork (dexamethasone and fibronectin), the authors unknown if a double injection could result in a more acute glaucoma rather than a chronic one, and thus diverging from the objective of our study. Furthermore, IOP values were always measured at the same time, in the morning. However, rodents are nocturnal animals, so it is possible that they had even experienced higher values at night. Moreover, the left eyes were not evaluated. In recent years alteration of the contralateral eye has been suggested, so the authors encourage further investigations of this question in future work.

On the other hand, although OCT is a reliable means of retinal analysis, the main handicap in our paper is the absence of a histological study. Corroboration of our results with cellular, protein or genetic analysis and hormonal blood tests would be beneficial. Furthermore, our animals did not reach senescence, which is when the prevalence of glaucoma rises, especially in females.

In conclusion, the influence of sex seems to be significant when an ocular hypertensive noxa appears, even in steroid-induced conditions. When only a steroid noxa appears, females seem to remain protected, unlike males. However, females showed an exacerbated response to alteration induced by a chronic co-damaging agent. It would be beneficial to corroborate these findings with further research and histological studies.

#### CRediT authorship contribution statement

**M.J. Rodrigo:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **T. Martínez-Rincón:** Data curation, Methodology, Writing – review & editing. **M. Subias:** Data curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **S. Méndez-Martínez:** Investigation, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **D. García-Herranz:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **J. García-Feijoo:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Writing – review & editing. **R. Herrero-Vanrell:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **L. Pablo:** Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **I. Bravo-Osuna:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **I. Munuera:** Data curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **E. García-Martin:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review & editing.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgements

**GRANT INFORMATION:** Financial Support: This study was supported by Rio Hortega and Juan Rodés Research Grants [M17/00213, PI17/01726, and PI17/01946] (Carlos III Health Institute), and by [MAT2017-83858-C2-2 and MAT2017-83858-C2-1] MINECO/AEI/ERDF, EU, Research Group UCM 920415, ISCIII-FEDER “Una Manera de Hacer Europa” RETICS Oftared, [RD16/0008/0004, RD16/0008/0009, and RD16/0008/029]. D.G.H. acknowledges a UCM-Santander fellowship [CT17/17-CT17-18]. The authors would like to acknowledge the use of the General Research Support Service (SAI) at the University of Zaragoza and to thank Zoco Estudio ([zocoestudio.com](http://zocoestudio.com)) for the

infographics created for this paper.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109736>.

#### References

- Alagöz, N., Tatar, I.T., Altan, C., Alagöz, C., Demir, G., Taşkapılı, M., 2020. Rate of hypotony and intraocular pressure fluctuation immediately after intravitreal dexamethasone implantation in vitrectomized eyes. *J. Fr. Ophtalmol.* 43 (2), 103–110.
- Aragón-Nava, A., Rodrigo, M.J., García-Herranz, D., Martínez, T., Subias, M., Méndez, S., Ruberte, J., Pampalona, J., Bravo-Osuna, I., García-Feijoo, J., Pablo, L., García-Martin, E., Herrero-Vanrell, R., 2022. Mimicking chronic glaucoma over 6 months with a single intracameral injection of dexamethasone/fibronectin-loaded PLGA microspheres. *Drug Deliv.* 29 (1), 2357–2374.
- Bosco, A., Steele, M.R., Vetter, M.L., 2011. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J. Comp. Neurol.* 519 (4), 599–620.
- Cascio, C., Deidda, I., Russo, D., Guarneri, P., 2015. The estrogenic retina: the potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. *Steroids* 103, 31–41.
- Chan, M.P.Y., Broadway, D.C., Khawaja, A.P., Yip, J.L.Y., Garway-Heath, D.F., Burr, J. M., Luben, R., Hayat, S., Dalzell, N., Khaw, K.T., Foster, P.J., 2017. Glaucoma and intraocular pressure in EPIC-Norfolk Eye Study: cross sectional study. *Br. Med. J.* 358, j3889.
- Chan, M.P., Grossi, C.M., Khawaja, A.P., Yip, J.L., Khaw, K.T., Patel, P.J., Khaw, P.T., Morgan, J.E., Vernon, S.A., Foster, P.J., UK Biobank Eye and Vision Consortium, 2016. Associations with intraocular pressure in a large cohort: results from the UK biobank. *Ophthalmology* 123 (4), 771–782.
- Chan, W., Wiggs, J.L., Sobrin, L., 2019. The genetic influence on corticosteroid-induced ocular hypertension: a field positioned for discovery. *Am. J. Ophthalmol.* 202, 1–5.
- Cortellón, R., Trifilieff, A., 2004. Gender comparison in a murine model of allergen-driven airway inflammation and the response to budesonide treatment. *BMC Pharmacol.* 4, 4.
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Sauvé, Y., Segura, F.J., Martínez-Navarrete, G., Tamarij, J.M., Fuentes-Broto, L., Sanchez-Cano, A., Pinilla, I., 2014. Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front. Neuroanat.* 8, 151.
- Da Silva, J.A., Peers, S.H., Perretti, M., Willoughby, D.A., 1993. Sex steroids affect glucocorticoid response to chronic inflammation and to interleukin-1. *J. Endocrinol.* 136 (3), 389–397.
- De Santiago, L., Ortiz Del Castillo, M., García-Martin, E., Rodrigo, M.J., Sánchez Morla, E.M., Cavaliere, C., Cerdán, B., Miguel, J.M., López, A., Boquete, L., 2019. Empirical mode decomposition-based filter applied to multifocal electroretinograms in multiple sclerosis diagnosis. *Sensors* 20 (1), 7.
- Desai, M.K., Brinton, R.D., 2019. Autoimmune disease in women: endocrine transition and risk across the lifespan. *Front. Endocrinol.* 10, 265.
- Dewundara, S.S., Wiggs, J.L., Sullivan, D.A., Pasquale, L.R., 2016. Is estrogen a therapeutic target for glaucoma? *Semin. Ophthalmol.* 31 (1–2), 140–146.
- Ding, C., Wang, P., Tian, N., 2011. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp. Eye Res.* 92 (6), 512–520.
- Douglass, A., Dattilo, M., Feola, A.J., 2023. Evidence for menopause as a sex-specific risk factor for glaucoma. *Cell. Mol. Neurobiol.* 43 (1), 79–97.
- Faralli, J.A., Filla, M.S., Peters, D.M., 2019. Role of fibronectin in primary open angle glaucoma. *Cells* 8 (12), 1518.
- Fini, M.E., Schwartz, S.G., Gao, X., Jeong, S., Patel, N., Itakura, T., Price, M.O., Price Jr., F.W., Varma, R., Stamer, W.D., 2017. Steroid-induced ocular hypertension/glaucoma: focus on pharmacogenomics and implications for precision medicine. *Prog. Retin. Eye Res.* 56, 58–83.
- García-Herranz, D., Rodrigo, M.J., Subias, M., Martínez-Rincón, T., Méndez-Martínez, S., Bravo-Osuna, I., Bonet, A., Ruberte, J., García-Feijoo, J., Pablo, L., García-Martin, E., Herrero-Vanrell, R., 2021. Novel use of PLGA microspheres to create an animal model of glaucoma with progressive neuroretinal degeneration. *Pharmaceutics* 13 (2), 237.
- Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (8), 779–804.
- Hollands, H., Johnson, D., Hollands, S., Simel, D.L., Jinapriya, D., Sharma, S., 2013. Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? The rational clinical examination systematic review. *JAMA* 309 (19), 2035–2042.
- Howell, G.R., Libby, R.T., Jakobs, T.C., Smith, R.S., Phalan, F.C., Barter, J.W., Barbay, J. M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Porciatti, V., Whitmore, A.V., Masland, R.H., John, S.W., 2007. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell Biol.* 179 (7), 1523–1537.
- Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Covey, D.F., Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2018. Neurosteroids and oxysterols as potential therapeutic agents for glaucoma and Alzheimer’s disease. *Neuropsychiatry* 8 (1), 344–359.
- Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16 (10), 626–638.
- Kobayashi, K., Kobayashi, H., Ueda, M., Honda, Y., 1998. Estrogen receptor expression in bovine and rat retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39 (11), 2105–2110.

- Lozano, D.C., Hartwick, A.T., Twa, M.D., 2015. Circadian rhythm of intraocular pressure in the adult rat. *Chronobiol. Int.* 32 (4), 513–523.
- Lambert, W.S., Carlson, B.J., Formichella, C.R., Sappington, R.M., Ahlem, C., Calkins, D.J., 2017. Oral delivery of a synthetic sterol reduces axonopathy and inflammation in a rodent model of glaucoma. *Front. Neurosci.* 11, 45.
- Maestú, F., Cuesta, P., Hasan, O., Fernandez, A., Funke, M., Schulz, P.E., 2019. The importance of the relationship of M/EEG with current biomarkers in Alzheimer's disease. *Front. Hum. Neurosci.* 13, 17.
- Mathew, D.J., Livne-Bar, I., Sivak, J.M., 2021. An inducible rodent glaucoma model that exhibits gradual sustained increase in intraocular pressure with distinct inner retina and optic nerve inflammation. *Sci. Rep.* 11 (1), 22880.
- Matlach, J., Bender, S., König, J., Binder, H., Pfeiffer, N., Hoffmann, E.M., 2018. Investigation of intraocular pressure fluctuation as a risk factor of glaucoma progression. *Clin. Ophthalmol.* 13, 9–16.
- Nakazawa, T., Takahashi, H., Shimura, M., 2006. Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain Res.* 1093 (1), 141–149.
- Neumann, F., Wurm, A., Linnertz, R., Pannicke, T., Landiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2010. Sex steroids inhibit osmotic swelling of retinal glial cells. *Neurochem. Res.* 35 (4), 522–530.
- Noailles, A., Maneu, V., Campello, L., Lax, P., Cuenza, N., 2018. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death Dis.* 9 (3), 350.
- Nuzzi, R., Scalabrin, S., Becco, A., Panzica, G., 2018. Gonadal hormones and retinal disorders: a review. *Front. Endocrinol.* 9, 66.
- Payne, A.H., Hales, D.B., 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25 (6), 947–970.
- Photocoagulation for diabetic macular edema, 1985. Early treatment diabetic retinopathy study report number 1. Early treatment diabetic retinopathy study research group. *Arch. Ophthalmol.* 103 (12), 1796–1806.
- Phulke, S., Kaushik, S., Kaur, S., Pandav, S.S., 2017. Steroid-induced glaucoma: an avoidable irreversible blindness. *J. Curr. Glaucoma Pract.* 11 (2), 67–72.
- Pietrucha-Dutczak, M., Amadio, M., Govoni, S., Lewin-Kowalik, J., Smedowski, A., 2018. The role of endogenous neuroprotective mechanisms in the prevention of retinal ganglion cells degeneration. *Front. Neurosci.* 12, 834.
- Prokai-Tatrai, K., Xin, H., Nguyen, V., Szarka, S., Blazics, B., Prokai, L., Koulen, P., 2013. 17 $\beta$ -estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an *in vivo* model of glaucoma. *Mol. Pharm.* 10 (8), 3253–3261.
- Quigley, H.A., Broman, A.T., 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90 (3), 262–267.
- Ramirez, A.I., de Hoz, R., Salobrar-Garcia, E., Salazar, J.J., Rojas, B., Ajoy, D., López-Cuena, I., Rojas, P., Trivino, A., Ramírez, J.M., 2017. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. *Front. Aging Neurosci.* 9, 214.
- Razeghinnejad, M.R., Katz, L.J., 2012. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. *Ophthalmic Res.* 47 (2), 66–80.
- Roberts, A.L., Mavlyutov, T.A., Perlmuter, T.E., Curry, S.M., Harris, S.L., Chauhan, A.K., McDowell, C.M., 2020. Fibronectin extra domain A (FN-EDA) elevates intraocular pressure through Toll-like receptor 4 signaling. *Sci. Rep.* 10 (1), 9815.
- Roche, S.L., Wyse-Jackson, A.C., Gómez-Vicente, V., Lax, P., Ruiz-Lopez, A.M., Byrne, A.M., Cuenda, N., Cotter, T.G., 2016. Progesterone attenuates microglial-driven retinal degeneration and stimulates protective fractalkine-CX3CR1 signaling. *PLoS One* 11 (11), e0165197.
- Rodrigo, M.J., García-Herranz, D., Aragón-Nava, A., Subías, M., Martínez-Rincón, T., Méndez-Martínez, S., Cardiel, M.J., García-Feijoo, J., Ruberte, J., Herrero-Varell, R., Pablo, L., García-Martín, E., Bravo-Osuna, I., 2021a. Long-term corticosteroid-induced chronic glaucoma model produced by intracameral injection of dexamethasone-loaded PLGA microspheres. *Drug Deliv.* 28 (1), 2427–2446.
- Rodrigo, M.J., García-Herranz, D., Subías, M., Martínez-Rincón, T., Méndez-Martínez, S., Bravo-Osuna, I., Carretero, A., Ruberte, J., García-Feijoo, J., Pablo, L.E., Herrero-Varell, R., García-Martín, E., 2021b. Chronic glaucoma using biodegradable microspheres to induce intraocular pressure elevation. Six-month follow-up. *Biomedicines* 9 (6), 682.
- Rodrigo, M.J., Martínez-Rincón, T., Subías, M., Méndez-Martínez, S., Luna, C., Pablo, L.E., Polo, V., García-Martín, E., 2020. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. *Exp. Eye Res.* 200, 108208.
- Rodrigo, M.J., Martínez-Rincón, T., Subías, M., Méndez-Martínez, S., Pablo, L.E., Polo, V., Aragón-Nava, A., García-Herranz, D., Feijoo, J.G., Osuna, I.B., Herrero-Varell, R., García-Martín, E., 2021c. Influence of sex on neuroretinal degeneration: six-month follow-up in rats with chronic glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 62 (13), 9.
- Rodrigo, M.J., Subías, M., Montolí, A., Méndez-Martínez, S., Martínez-Rincón, T., Arias, L., García-Herranz, D., Bravo-Osuna, I., García-Feijoo, J., Pablo, L., Cegonino, J., Herrero-Varell, R., Carretero, A., Ruberte, J., García-Martín, E., Pérez Del Palomar, A., 2021d. Analysis of para-inflammation in chronic glaucoma using vitreous-OCT imaging. *Biomedicines* 9 (12), 1792.
- Rudnicka, A.R., Mt-Isa, S., Owen, C.G., Cook, D.G., Ashby, D., 2006. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (10), 4254–4261.
- Sapienza, A., Raveu, A.L., Reboussin, E., Roubeix, C., Boucher, C., Dégardin, J., Godefroy, D., Rostene, W., Reaux-Le Goazigo, A., Baudouin, C., Melik-Parsadanian, S., 2016. Bilateral neuroinflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat. *J. Neuroinflammation* 13, 44.
- Sato, K., Nishiguchi, K.M., Maruyama, K., Moritoh, S., Fujita, K., Ikuta, Y., Kasai, H., Nakazawa, T., 2016. Topical ocular dexamethasone decreases intraocular pressure and body weight in rats. *J. Negat. Results Biomed.* 15, 5.
- Schmidl, D., Schmetterer, L., Garhöfer, G., Popa-Cherecheanu, A., 2015. Gender differences in ocular blood flow. *Curr. Eye Res.* 40 (2), 201–212.
- Shan, S.W., Do, C.W., Lam, T.C., Kong, R.P.W., Li, K.K., Chun, K.M., Stamer, W.D., To, C.H., 2017. New insight of common regulatory pathways in human trabecular meshwork cells in response to dexamethasone and prednisolone using an integrated quantitative proteomics: SWATH and MRM-HR mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 16 (10), 3753–3765.
- Shin, Y.U., Hong, E.H., Kang, M.H., Cho, H., Seong, M., 2018. The association between female reproductive factors and open-angle glaucoma in Korean women: the Korean national health and nutrition examination survey V. *J. Ophthalmol.* 2750786, 2018.
- Tenkorang, M.A., Snyder, B., Cunningham, R.L., 2018. Sex-related differences in oxidative stress and neurodegeneration. *Steroids* 133, 21–27.
- Tham, Y.C., Li, X., Wong, T.Y., Quigley, H.A., Aung, T., Cheng, C.Y., 2014. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121 (11), 2081–2090.
- The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7, 2000. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am. J. Ophthalmol.* 130 (4), 429–440.
- Vajaranant, T.S., Nayak, S., Wilensky, J.T., Joslin, C.E., 2010. Gender and glaucoma: what we know and what we need to know. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 21 (2), 91–99.
- Vyas, S., Rodrigues, A.J., Silva, J.M., Tronche, F., Almeida, O.F., Sousa, N., Sotiropoulos, I., 2016. Chronic stress and glucocorticoids: from neuronal plasticity to neurodegeneration. *Neural Plast.* 6391686, 2016.
- Wickham, L.A., Gao, J., Toda, I., Rocha, E.M., Ono, M., Sullivan, D.A., 2000. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol. Scand.* 78 (2), 146–153.
- Ycaza Herrera, A., Mather, M., 2015. Actions and interactions of estradiol and glucocorticoids in cognition and the brain: implications for aging women. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 36–52.
- Zalewski, A., Cecchini, E.L., Deroo, B.J., 2012. Expression of extracellular matrix components is disrupted in the immature and adult estrogen receptor  $\beta$ -null mouse ovary. *PLoS One* 7 (1), e29937.
- Zhang, N., Wang, J., Chen, B., Li, Y., Jiang, B., 2021. Prevalence of primary angle closure glaucoma in the last 20 Years: a meta-analysis and systematic review. *Front. Med.* 7, 624179.
- Zhao, Y., Chen, J., Yu, X., Xu, J., Sun, X., Hong, J., 2018. Age-related changes in human schlemm's canal: an *in vivo* optical coherence tomography-based study. *Front. Physiol.* 9, 630.

## 9.5 Difusión de resultados

Por otra parte, a lo largo de estos años de trabajo también se ha realizado una tarea de difusión de los resultados obtenidos en diferentes congresos y jornadas científicas, tanto autonómicos, como nacionales e internacionales, mediante pósteres y comunicaciones orales:

- Congreso EVER (European Association for Vision and Eye Research) 2018, Niza, Francia: "**Laponite clay for long term delivery dexamethasone intravitreal injections**" (Rodrigo MJ, Prieto E, García-Martin E, Idoipe M, Vispe E, Fraile JM, Mayoral JA, **Martínez T**, Subías M, López A, Polo V).
- 3rd Biennial International Symposium on Ocular Regeneration: Tissue Engineering and the Eye, 2018, departamento de oftalmología de la Universidad de Harvard, Boston, EE. UU: "**Retinal loss analysis by OCT in a hypertensive animal model according to several sizes of microspheres**" (Rodrigo MJ, García-Herranz D, **Martínez T**, Bravo-Osuna I, García Feijoo J, Pablo LE, García-Martin E, Herrero-Vanrell R) (Premio: Travel Award).
- 96 Congreso SEO (Sociedad Española de Oftalmología), Madrid, España: "**Influencia del sexo en el desarrollo de glaucoma crónico**" (**Martínez Rincón T**; Subías M; Luna C; Arias L; Méndez Martínez S).
- 96 Congreso SEO (Sociedad Española de Oftalmología), Madrid, España: "**Desarrollo de formulación intravítreo para el glaucoma “de principio a fin”**" (Subías M, **Martínez Rincón T**, Rodrigo MJ).
- III Jornada de Investigación para Residentes de Aragón, 2020, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España: "**Nueva formulación intravítreo de liberación prolongada para el glaucoma**" (Subías M, Rodrigo M.J., Méndez Martínez S, García Martín E, **Martínez Rincón T**, Pablo Júlvez, L.E.). (Primer premio a la mejor comunicación oral en la categoría de Servicios Quirúrgicos)

- V Jornada de Investigación para residentes de Aragón, 2023, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España: "**Análisis de la inmunidad mediante tomografía de coherencia óptica en el glaucoma**" (Munuera Rufas I, Mallén Gracia V, Tello Fernández A, Subías Perié M, **Martínez Rincón T**, Rodrigo Sanjuán M.J.).
- Congreso SOE (European Society of Ophthalmology Congress), 2023, Praga, República Checa: "**New models of chronic glaucoma in experimental animals**" (Munuera I, Subías M, Arias L, **Martínez T**, Vicente MJ, Tello A, Mallén V, Fernández D, Pueyo A, Aragón A, Pablo L, Rodrigo MJ).
- Congreso SOE (European Society of Ophthalmology Congress), 2023, Praga, República Checa: "**Influence of sex on chronic glaucoma neurodegeneration in rats over 6-month follow-up**" (Munuera I, **Martínez T**, Subías M, Arias L, Vicente MJ, Tello A, Mallén V, Fernández D, Pueyo A, Aragón A, Rodrigo MJ).
- Congreso SOE (European Society of Ophthalmology Congress), 2023, Praga, República Checa: "**Ocular hypo-pressure treatment effect on refraction and neuroretina of rat eyes with glaucoma**" (Munuera I, Arias L, **Martínez Rincón T**, Subías M, Mallén V, Tello A, Fernández D, Vicente MJ, Pueyo A, Rodrigo MJ).
- Congreso SOE (European Society of Ophthalmology Congress), 2023, Praga, República Checa: "**Superpixel segmentation algorithm for OCT image processing in neurodegenerative disease**" (Pueyo-Bestué A, Mallén V, Otín S, Vicente MJ, Fernández D, Tello A, Arias L, Subías M, **Martínez T**, Munuera I, García-Martín E) (Premio a la mejor comunicación oral).
- Congreso SOE (European Society of Ophthalmology Congress), 2023, Praga, República Checa: "**Immune analysis of vitreous humor in rats using optical coherence tomography**" (Munuera I, Subías M, **Martínez T**, Arias L, Fernández D, Mallen V, Vicente MJ, Tello A, Aragón A, Pablo L, Rodrigo MJ, Pueyo A).

Además, a lo largo de estos años de trabajo, se han publicado varios artículos relacionados con el tema de la presente Tesis Doctoral en revistas científicas de alto impacto, pero que **no deben contribuir a la valoración de la presente Tesis Doctoral**:

- ***"Brimonidine-Laponite intravitreal formulation has an ocular hypotensive and neuroprotective effect throughout 6 months of follow-up in a glaucoma animal model"***. Rodrigo MJ, Cardiel MJ, Fraile JM, Mendez-Martinez S, **Martinez-Rincon T**, Subias M, Polo V, Ruberte J, Ramirez T, Vispe E, Luna C, Mayoral JA, Garcia-Martin E. Biomaterials Science 2020. JCR - Q1. Factor de impacto (JCR 2019): 6,183.
- ***"Monitoring new long-lasting intravitreal formulation for glaucoma with vitreous images using optical coherence tomography"***. Rodrigo MJ, Palomar AP, Montolío A, Mendez-Martínez S, Subias M, Cardiel MJ, **Martínez-Rincón T**, Cegoñino J, Fraile JM, Vispe E, Mayoral JA, Polo V, Garcia-Martin E. Revista: Pharmaceutics 2021. JCR -Q1. Factor de impacto (JCR 2019): 4,421.
- ***"Novel use of PLGA microspheres to create an animal model of glaucoma with progressive neuroretinal degeneration"***. Garcia-Herranz D, Rodrigo MJ, Subias M, **Martinez-Rincon T**, Mendez-Martinez S, Bravo-Osuna I, Bonet A, Ruberte J, Garcia-Feijoo J, Pablo L, Garcia-Martin E, Herrero-Vanrell R. Revista: Pharmaceutics 2021. JCR -Q1. Factor de impacto (JCR 2019): 4,421.
- ***"Chronic Glaucoma Using Biodegradable Microspheres to Induce Intraocular Pressure Elevation. Six-Month Follow-Up"***. Rodrigo MJ, Garcia-Herranz D, Subias M, **Martinez-Rincon T**, Mendez-Martinez S, Bravo-Osuna I, Carretero A, Ruberte J, Garcia-Feijoo J, Pablo L, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E. Revista: Biomedicines 2021. JCR- Q1. Factor de impacto (JCR 2020): 5,612.
- ***"Analysis of Parainflammation in Chronic Glaucoma Using Vitreous-OCT Imaging"***. Rodrigo MJ, Subías M, Montolío A, Méndez-Martínez S, **Martínez-Rincón T**, Arias L, García-Herranz D, Bravo-Osuna I, Garcia-Feijoo J, Pablo L, Cegoñino, J, Herrero-Vanrell R, Carretero A, Ruberte J, Garcia-Martin E, Pérez Del

Palomar A. Revista: Biomedicines 2021. JCR- Q1. Factor de impacto (JCR 2021): 5,612.

- *"Long-term corticosteroid-induced chronic glaucoma model produced by intracamerale injection of dexamethasone-loaded PLGA microspheres"* Rodrigo, MJ, Garcia-Herranz D, Aragón-Navas A, Subias M, **Martinez-Rincón T**, Mendez-Martínez S, Cardiel MJ, García-Feijoo J, Ruberte J, Herrero-Vanrell R, Pablo L, Garcia-Martin E, Bravo-Osuna I. Revista: Drug delivery, 2021. JCR-D1. Factor de impacto (JCR 2020):6,419 (Premio a la mejor publicación de Glaucoma de la Sociedad Española de Glaucoma 2022).
- *"Mimicking chronic glaucoma over 6 months with a single intracamerale injection of dexamethasone/fibronectin-loaded PLGA microspheres"*. Aragón-Navas A, Rodrigo MJ, Garcia-Herranz D, **Martinez-Rincón T**, Subias M, Mendez-Martínez S, Ruberte J, Pamplona J, Bravo-Osuna I, García-Feijoo J, Pablo L, Garcia-Martin E, Herrero-Vanrell R. Revista: Drug delivery 2022. JCR- Q1. Factor de Impacto (JCR 2021): 6,819 (Premio a la mejor publicación de Glaucoma de la Sociedad Española de Glaucoma 2023).
- *"Tunable degrees of neurodegeneration in rats based on microsphere-induced models of chronic glaucoma"*. Rodrigo MJ, Bravo-Osuna I, Subias M, Montolío A, Cegoñino J, **Martinez-Rincón T**, Mendez-Martinez S, Aragón-Navas A, Garcia-Herranz D, Pablo LE, Herrero-Vanrell R, Pérez del Palomar A, Garcia-Martin E. Revista: Scientific reports 2022. Factor de Impacto JCR 2021: 4,997.

## **10. DISCUSIÓN**

El hilo conductor de los cuatro artículos que componen esta Tesis Doctoral es el análisis de las diferencias en los patrones de neurodegeneración retiniana que se produce en ratas Long-Evans, según el sexo a lo largo de su vida en condiciones fisiológicas y tras la inducción de daño por hipertensión ocular, mediante nuevos modelos de glaucoma crónico. Para ello, se ha analizado la presión intraocular, la refracción y la estructura y la función de la neurorretina mediante pruebas *in vivo* mínimamente invasivas.

En primer lugar, se evaluaron los cambios ocurridos en la neurorretina con el paso del tiempo en ratas Long-Evans en cuatro edades diferentes: a las 4 semanas de vida (pubertad), 12 semanas de vida (juventud), 16 semanas de vida (edad adulta temprana) y 28 semanas de vida (edad adulta tardía/ pre-senescencia) ([119](#)), ([120](#)), ([121](#)). Para estudiar estos cambios se evaluó la evolución de la PIO y se utilizó el OCT para medir la estructura de la neurorretina y el ERG para medir la función visual. Además, se analizaron las diferencias en los patrones de neurodegeneración según el sexo. Existe evidencia en la literatura de que los estrógenos pueden actuar como factor neuroprotector, ya que disminuyen la resistencia a la salida del humor acuoso ([122](#)), y este trabajo apoya esta teoría. Se encontraron valores de PIO más elevados en machos y, además, presentaron mayor pérdida de espesor neurorretiniano y peor función de la neurorretina a lo largo de todo el seguimiento. Los cambios en los patrones de neurodegeneración retiniana fueron similares en ambos sexos en el mismo período de tiempo, es decir, cuando se produjeron aumentos del espesor en machos también se observó en hembras, y viceversa; pero siendo siempre la pérdida más intensa en machos. Por otro lado, en cuanto a la función de la neurorretina, observamos una disminución en machos y un aumento en hembras con el paso del tiempo. En las primeras semanas de vida de la rata (correspondientes a edad infantil en humanos) no se encontraron diferencias significativas en la función neurorretiniana, posiblemente por la baja influencia de las hormonas sexuales en estas edades tan tempranas. Sin embargo, se comenzó a detectar diferente función neurorretiniana en machos y en hembras (con peor función en machos) a partir de los 4 meses de vida de la rata (correspondientes a los 16 años humanos), es decir, desde la pubertad e inicio de la influencia de las hormonas sexuales en adelante. Este estudio nos permitió durante un

largo período de seguimiento, no realizado antes en la literatura, conocer cómo es el desarrollo normal de la neurorretina en ratas Long-Evans sanas, y servir como base normalizada para poder comparar la neuroplasticidad en función del sexo ante estímulos dañinos precoces; es decir, en situaciones premórbidas y patológicas correspondientes con los siguientes estudios de esta Tesis Doctoral.

A continuación, se evaluaron los cambios producidos por la HTO crónica mantenida durante 24 semanas de seguimiento en la refracción, desde un punto de vista neurorretiniano (estructura y función). Este trabajo nos permite conocer mejor cómo es el proceso neurodegenerativo en condiciones de HTO crónica en la miopía. Para ello se estudió la refracción, la PIO, la estructura y la función de la neurorretina en dos modelos animales de glaucoma crónico inducidos mediante esclerosis de las venas epiesclerales y mediante la inyección de microesferas en cámara anterior. La miopía es un defecto refractivo en el que el ojo va sufriendo una elongación progresiva a lo largo de la vida, debido a diversos factores (123). Los mecanismos causantes de esta elongación progresiva todavía no se conocen, pero hay evidencia de que la PIO influye en la elongación del polo posterior (124). Este segundo estudio demostró la influencia de la HTO crónica moderadamente elevada en el proceso natural de la emetropización. La PIO elevada fue el principal factor de riesgo involucrado en la miopización progresiva de los ojos con HTO. Sin embargo, no se encontró correlación entre la refracción y los cambios funcionales y estructurales de la neurorretina. La miopía es un defecto refractivo cada vez más prevalente (125), y este estudio refuerza que el descenso de la PIO pudiera ser un posible tratamiento para la misma (126), (127), (128).

En el tercer estudio se analizaron las diferencias en la neurodegeneración retiniana según el sexo en dos modelos de glaucoma crónico (esclerosis de las venas epiesclerales e inyección de microesferas en cámara anterior) a lo largo de 24 semanas de seguimiento. Hasta la fecha, no existían (que sepamos) estudios que analicen estas diferencias según el sexo (algo cada vez más demandado en la literatura debido a la falta de conocimiento de la influencia del sexo en el glaucoma) (94). Este artículo apoya la evidencia de que la PIO es el principal factor de riesgo para desarrollar glaucoma. El modelo epiescleral produjo elevaciones de PIO más rápidas y abruptas y mayores pérdidas de espesor y de funcionalidad de la neurorretina que el modelo de microesferas. El modelo de microesferas causó esta subida de PIO y pérdida de función

visual de una forma más similar al GPAA de los humanos. Los valores de PIO obtenidos en ambos modelos fueron de nuevo más elevados en machos. En cuanto al papel neuroprotector de los estrógenos, en este trabajo también se observó que las hembras premenopáusicas presentaron menor neurodegeneración en la retina medida mediante OCT y ERG. Por tanto, para futuros estudios, parece fundamental tener en cuenta el modelo de creación de HTO y el sexo para analizar correctamente los resultados obtenidos. En caso contrario, pueden no encontrarse diferencias que sí se hacen evidentes con este subanálisis.

Por último, en el cuarto artículo de esta Tesis Doctoral se analiza la diferente neurodegeneración producida según el sexo en dos modelos de glaucoma inducido por corticoides: el primero de ellos mediante la inyección de microesferas cargadas con dexametasona y el segundo cargadas con dexametasona y fibronectina. Hasta la fecha, no hay ningún estudio previo similar, que sepamos. Al igual que en los artículos anteriores, en este cuarto artículo se replicaron los valores de PIO más elevados en los machos, apoyando de nuevo la teoría de que la presencia de receptores estrogénicos disminuye la resistencia a la salida del humor acuoso, y ahora incluso en presencia de corticoides (17). En cuanto a la estructura de la neurorretina medida por OCT, los machos presentaron el patrón de pérdida clásico de glaucoma ISNT de la CFNR, pero no ocurrió lo mismo en el caso de las hembras. Estos datos refuerzan la idea de que existen diferencias en el patrón de neurodegeneración según el sexo. Las cohortes de ratas con glaucoma inducido por corticoides sufrieron un engrosamiento retiniano inicial muy marcado al alcanzar la HTO, que pudiera estar relacionado con la presencia de células inmunitarias (129), afectando al espesor retiniano completo (130). En las cohortes de este estudio se encontraron diferencias según el sexo y según el modelo inductor de glaucoma corticoideo, como ocurrió en el trabajo anterior. Se pudo detectar el aumento del espesor neurorretiniano y de la función neurorretiniana al alcanzar valores de HTO y previos a la disminución de estructura y función, una vez instaurado el daño neurodegenerativo. Este aumento inicial parece corresponderse con la hiperactividad inicial descrita en enfermedades neurodegenerativas, previa a detectarse el daño e hipofunción. Las hembras en el modelo de glaucoma inducido por dexametasona presentaron menos variaciones en la estructura de la neurorretina. Esto puede ser debido a que las hormonas sexuales, como la progesterona (131), contrarrestan la

hiperactivación inmune inicial, sumándose al efecto antiinflamatorio de la dexametasona. Sin embargo, en la cohorte con glaucoma corticoideo inducido con microesferas con dexametasona y fibronectina, las hembras presentaron una mayor pérdida de espesor neorretiniano. Esto sugiere que la presencia de otros cofactores, en este caso la fibronectina, pudiera actuar de manera proinflamatoria (132), (133), (134) y hacer que el patrón de neurodegeneración cambie. Finalmente, en este estudio, la cohorte con mayor pérdida general de espesor neorretiniano fue la de ratas con glaucoma inducido por dexametasona solamente, que son las que alcanzaron valores de HTO más elevada. Esto refuerza la teoría de que el incremento de PIO sea el principal factor de riesgo para la progresión del glaucoma.

Los cuatro artículos publicados en esta Tesis Doctoral demuestran que **existen diferencias oculares significativas en la estructura y función de la neorretina según el sexo; en condiciones fisiológicas, en las diferentes etapas de vida de las ratas Long-Evans sanas, y en cuatro modelos diferentes de glaucoma crónico inducido**. Además, el modelo de inducción de hipertensión ocular también parece influir en estas diferencias, lo cual corrobora la teoría de la multifactorialidad del glaucoma. **Las ratas Long-Evans hembra premenopáusicas de todas las cohortes presentaron menores valores de PIO, así como menor neurodegeneración de la estructura y función de su neorretina.** Estos hallazgos sugieren indicar un papel neuroprotector femenino. Nuestros resultados **sirven como base hacia la medicina de precisión, que pretende tratar al paciente de forma individualizada, sea hombre o mujer, y no solo tratar la patología.** Conocer los patrones de neurodegeneración específicos según la edad y el sexo puede permitir, en el futuro, individualizar el seguimiento y tratamiento en función de la estimación del riesgo de progresión de forma individualizada. Parece fundamental tener en cuenta las diferencias por sexo también en estudios de otras patologías neurodegenerativas y en futuros estudios desarrollados en modelos de glaucoma crónicos con tratamientos neuroprotectores o hipotensores, para no sobreestimar ni infraestimar su efecto.

## **11. APORTACIONES DE LA DOCTORANDO**

El trabajo de investigación de los cuatro artículos publicados que componen esta Tesis Doctoral permite, en primer lugar, conocer en mayor profundidad la neurodegeneración que se produce en la neurorretina de las ratas secundaria a su envejecimiento fisiológico, desde la adolescencia hasta la adultez media. Además, se detectan diferencias en la neurodegeneración según el sexo de las ratas. Aunque este no es el primer trabajo que evalúa el efecto de la edad en la neurodegeneración de la retina de ratas sanas, sí es **el primero en proporcionar una base que permite comprender mejor la implicación del sexo en la neurodegeneración fisiológica**, analizando las diferencias obtenidas mediante PIO, OCT y ERG para evaluar la estructura y la función neurorretiniana **que permita la comparación con cohortes de animales con neurodegeneración patológica** ([108](#)).

La aportación por parte de la doctoranda (**apéndice II**) en este trabajo fue: Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de los gráficos.

En segundo lugar, se han evaluado otros factores de riesgo que produzcan neurodegeneración retiniana asociados al glaucoma crónico, como es la miopía, teniendo en cuenta la influencia del sexo. La pérdida visual que presentan los pacientes con **glaucoma podría estar también asociada a la progresión de un error refractivo negativo**, además del propio proceso neurodegenerativo que se produce en el glaucoma. Por ello, parece necesario evaluar periódicamente la refracción de los pacientes con glaucoma. En este trabajo, evaluamos la relación entre la hipertensión ocular y los cambios refractivos producidos en dos modelos diferentes de glaucoma. Este estudio permitió conocer que **el único parámetro relacionado estadísticamente con la refracción es la hipertensión ocular**, así como que **el estado refractivo es independiente** de la evaluación **de la estructura** (realizada con OCT) y de la función (medida con ERG) en ratas con GPAA ([111](#)).

La aportación por parte de la doctoranda (**apéndice II**) en este trabajo fue: Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de gráficos.

El tercer artículo de esta tesis Doctoral es innovador (al igual que el primero), ya es el primero que ha analizado las diferencias según el sexo en la neurodegeneración retiniana de dos modelos de GPAA con un seguimiento tan largo de 24 semanas. En este trabajo se encuentran **diferencias en el patrón de neurodegeneración y diferentes tasas de pérdida entre machos y hembras dentro del mismo modelo de HTO, y también entre los modelos**. Conocer estos hallazgos es importante, porque las discrepancias de nuestro trabajo con otros estudios previos podrían deberse a que hasta ahora no se habían tenido en cuenta estas diferencias según el sexo, ni tenido en cuenta el modelo de hipertensión ocular utilizado, pudiendo haber un sesgo por estos motivos. Gracias a este trabajo **se sientan las bases para futuros estudios comparativos de neurodegeneración/neuroprotección que pretendan evaluar terapias hipotensoras y neuroprotectoras a largo plazo**. Resulta fundamental tener en cuenta tanto el sexo como el modelo animal utilizado, ya que nuestros resultados sugieren que las hembras premenopáusicas mantuvieron un efecto protector frente a la HTO crónica. No tener en cuenta estos dos factores podrían hacer que el efecto terapéutico se sobreestime o se infraestime (112).

La aportación por parte de la doctoranda (**apéndice II**) en este trabajo fue: Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de gráficos.

En cuarto y último lugar, se evalúan en ratas los cambios neurodegenerativos teniendo en cuenta el sexo, esta vez en condición de glaucoma crónico inducido por esteroides con evaluación de la PIO y la estructura y función de la neurorretina. La influencia del sexo parece ser significativa también incluso en el glaucoma inducido por esteroides (135).

La aportación por parte de la doctoranda (**apéndice II**) en este trabajo fue: Realización de la investigación básica con animales, recogida y tratamiento de los datos, metodología, redacción, revisión y edición del artículo.

## **12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

- 1) Se realizó la medición de la PIO de todas las cohortes por las mañanas, todas las semanas a la misma hora, para evitar las fluctuaciones del ritmo circadiano. Sin embargo, los roedores son animales nocturnos, y es posible que por las noches presentasen valores de PIO incluso más elevados.
- 2) Una limitación importante del segundo trabajo es que no se pudo analizar la longitud axial de los ojos de las ratas, sino que fue una medida indirecta mediante el poder dióptrico analizado mediante enfoque de la OCT.
- 3) Aunque nuestro periodo de seguimiento fue bastante largo (6 meses) no se llegó a la senescencia ni postmenopausia de las ratas, por lo que nuestros resultados no serían completamente extrapolables a la población anciana, más susceptible de desarrollar glaucoma.
- 4) Los animales del estudio fueron alimentados *ad libitum* con posible aumento del componente graso y hay estudios que demuestran una influencia negativa sobre aspectos vasculares, que podrían influir tanto en la teoría vascular del glaucoma, como en la síntesis esteroidea.
- 5) Una limitación importante de este trabajo es la ausencia de análisis sanguíneos hormonales y de estudios histológicos segregados por sexo. Sin embargo, existe evidencia de la buena correlación entre los hallazgos obtenidos mediante OCT y la histología e inmunohistoquímica. En futuros estudios sería también interesante analizar la segmentación completa y todas las métricas oculares usando un análisis de escala multidimensional o técnicas computacionales de grandes datos correlacionado con la histología.
- 6) Los grupos experimentales de las cuatro cohortes inducidas con glaucoma no son completamente comparables, ya que las ratas recibieron distinto número de

inyecciones oculares. Sin embargo, en las distintas condiciones glaucomatosas, las diferencias por sexo fueron constantes.

- 7) En estos estudios no se evaluaron los ojos izquierdos de las ratas, lo que podría ser interesante para futuros estudios, ya que recientes estudios han demostrada afectación del ojo contralateral en la neurodegeneración.

### **13. CONCLUSIONES**

- I. Durante el proceso fisiológico de envejecimiento (desde la pubertad precoz a la adultez tardía) en ratas sanas Long-Evans, la presión intraocular se mantiene en normotensión (por debajo de los 20 mmHg), el espesor de la retina, de la capa de fibras nerviosas de la retina y de la capa de células ganglionares medido con tomografía de coherencia óptica (OCT) va disminuyendo a lo largo del tiempo, y se produce un cambio lentamente progresivo de la amplitud y de la latencia en el electrorretinograma (ERG).
- II. Las ratas Long-Evans sanas, desde un punto de vista estructural y funcional, presentan diferente patrón de neurodesarrollo y neurodegeneración según el sexo. Las ratas Long-Evans sanas machos presentan valores de presión intraocular significativamente más elevados que las hembras en todas sus etapas de desarrollo, y, desde un punto de vista estructural y funcional, los machos parecen más susceptibles a la neurodegeneración que las hembras en etapas preseniles. Además, el daño neurodegenerativo es más precoz e intenso en los machos que en las hembras, estratificando por grupos de edad.
- III. En ratas Long-Evans con glaucoma crónico, el único parámetro relacionado estadísticamente con la refracción es la presión intraocular, y no existe correlación entre la refracción y la evaluación de la estructura mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) y de la función mediante electrorretinografía (ERG). La hipertensión ocular crónica acelera la emetropía en ojos de ratas Long-Evans, conduciendo hacia una miopía lentamente progresiva.
- IV. Las ratas Long-Evans machos con hipertensión ocular crónica presentaron mayor tendencia a la miopía, con un aumento inicial de la estructura seguida de una pérdida también funcional con el tiempo.
- V. En los modelos de glaucoma crónico inducido mediante esclerosis de venas episclerales e inyección de microesferas en cámara anterior se produce un incremento de presión intraocular progresivo y mantenido en el tiempo, que es más

precoz y abrupto en el modelo epiescleral. El daño producido en la estructura y función de la neurorretina fue mayor en el modelo epiescleral que en los modelos generados mediante microesferas inyectadas en cámara anterior.

- VI. Las ratas Long-Evans hembras premenopáusicas con glaucoma crónico inducido por hipertensión ocular, presentan neuroprotección estructural y funcional en estadios precoces. Los machos presentan valores de presión intraocular significativamente más elevados que las hembras, tanto en el modelo epiescleral como en el modelo de microesferas.
- VII. Las ratas Long-Evans con ambos modelos de glaucoma crónico inducido por corticoides presentaron valores de presión intraocular que aumentaron progresivamente, con pérdida progresiva del espesor neorretiniano a lo largo del seguimiento, pero con claras fluctuaciones en el modelo inducido con dexametasona y fibronectina.
- VIII. Las ratas Long-Evans hembras con glaucoma crónico inducido por corticoides presentaron protección en la neurorretina cuando recibieron exclusivamente esteroides. Sin embargo, cuando se le sometió al cofactor de la fibronectina sufrieron una respuesta exacerbada al daño.
- IX. Parece fundamental tener en cuenta la edad y el sexo de los animales a estudio para comprender los cambios fisiológicos que acontecen a lo largo de la vida y en situaciones patológicas de neurodegeneración retiniana como en el glaucoma crónico, y así poder evaluar correctamente potenciales terapias hipotensoras y neuroprotectoras.

## **14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Yap T, Donna P, Almonte M, Cordeiro M. Real-Time Imaging of Retinal Ganglion Cell Apoptosis. *Cells.* 2018;7(6):60.
2. Mikkola T, Viinikka L, Ylikorkala O. Estrogen and postmenopausal estrogen/progestin therapy: Effect on endothelium-dependent prostacyclin, nitric oxide and endothelin-1 production. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998;79(1):75-82.
3. Du M, Mangold CA, Bixler G V., Brucklacher RM, Masser DR, Stout MB, et al. Retinal gene expression responses to aging are sexually divergent. *Mol Vis.* 2017;
4. Shim SH, Sung KR, Kim JM, Kim HT, Jeong J, Kim CY, et al. The Prevalence of Open-Angle Glaucoma by Age in Myopia: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Curr Eye Res [Internet].* 2017 [citado 13 de enero de 2022];42(1):65-71.
5. Read SA, Collins MJ, Annis-Brown T, Hayward NM, Lillyman K, Sherwin D, et al. The short-term influence of elevated intraocular pressure on axial length. *Ophthalmic Physiol Opt [Internet].* julio de 2011 [citado 14 de enero de 2022];31(4):398-403.
6. McMonnies CW. Intraocular pressure spikes in keratectasia, axial myopia, and glaucoma. *Optom Vis Sci [Internet].* octubre de 2008 [citado 14 de enero de 2022];85(10):1018-26.
7. Parisi V. Correlation between morphological and functional retinal impairment in patients affected by ocular hypertension, glaucoma, demyelinating optic neuritis and Alzheimer's disease. *Semin Ophthalmol [Internet].* junio de 2003 [citado 14 de enero de 2022];18(2):50-7.
8. Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma. *Prog Retin Eye Res [Internet].* 2020 [citado 14 de enero de 2022];75:100799.
9. Choh V, Gurdita A, Tan B, Prasad RC, Bizheva K, Joos KM. Short-Term Moderately Elevated Intraocular Pressure Is Associated With Elevated Scotopic Electroretinogram Responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet].* 1 de abril de 2016 [citado 14 de enero de 2022];57(4):2140-51.
10. Tan B, Gurdita A, Choh V, Joos KM, Prasad R, Bizheva K. Morphological and functional changes in the rat retina associated with 2 months of intermittent moderate intraocular pressure elevation. *Sci Rep [Internet].* 2018 [citado 14 de enero de 2022];8(1):7727.
11. Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand [Internet].* abril de 2000 [citado 15 de enero de 2022];78(2):146-53.
12. Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G, Ubuka T, Schlinger BA, et al. Gonadal hormones and retinal disorders: A review. *Front Endocrinol (Lausanne) [Internet].* 2018 [citado 15 de enero de 2022];9:66.
13. Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Sex Hormones and Optic Nerve Disorders: A Review. *Front Neurosci.* 2019;
14. Razeghinejad MR, Katz LJ. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. *Ophthalmic Res.* 2012;47(2):66-80.
15. Vyas S, Rodrigues AJ, Silva JM, Tronche F, Almeida OFX, Sousa N, et al. Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. *Neural Plast.* 2016;2016:1-15.

16. Kobayashi K, Kobayashi H, Ueda M, Honda Y. Estrogen receptor expression in bovine and rat retinas. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;
17. Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand* [Internet]. abril de 2000 [citado 15 de enero de 2022];78(2):146-53.
18. Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Gender differences in ocular blood flow. *Current Eye Research*. 2015.
19. Zalewski A, Cecchini EL, Deroo BJ. Expression of extracellular matrix components is disrupted in the immature and adult estrogen receptor  $\beta$ -null mouse ovary. *PLoS One*. enero de 2012;7(1).
20. Lambert WS, Carlson BJ, Formichella CR, Sappington RM, Ahlem C, Calkins DJ. Oral delivery of a synthetic sterol reduces axonopathy and inflammation in a rodent model of glaucoma. *Front Neurosci*. 2017;11:1-21.
21. Prokai-Tatrai K, Xin H, Nguyen V, Szarka S, Blazics B, Prokai L, et al. 17 $\beta$ -estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an in vivo model of glaucoma. *Mol Pharm*. agosto de 2013;10(8):3253-61.
22. Ycaza Herrera A, Mather M. Actions and interactions of estradiol and glucocorticoids in cognition and the brain: Implications for aging women. Vol. 55, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd; 2015. p. 36-52.
23. Corteling R, Trifilieff A. Gender comparison in a murine model of allergen-driven airway inflammation and the response to budesonide treatment. *BMC Pharmacol*. 2004;4:1-9.
24. Kanski J, Bowling B, Nischal A PA. *Oftalmología clínica*. Séptima ed. Elsevier España, S.L; 2012. 313 p.
25. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. Vol. 311, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2014. p. 1901-11.
26. Quiñónez Quiñónez W, Chávez Gutiérrez RD, Chávez Gutiérrez KG. Espesor de la capa de fibras nerviosas y células ganglionares de la retina mediante tomografía de coherencia óptica en una población mexicana sana menor de 18 años. *Rev Mex Oftalmol*. 2017;91(3):127-33.
27. Gordon MO, Torri V, Miglior S, Beiser JA, Floriani I, Miller JP, et al. Validated prediction model for the development of primary open-angle glaucoma in individuals with ocular hypertension. *Ophthalmology*. 2007;
28. McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom*. 2016;10(2):71-8.
29. Hollands H, Johnson D, Hollands S, Simel DL, Jinapriya D, Sharma S. Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? The rational clinical examination systematic review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2013.
30. Salyer DL, Lund TD, Fleming DE, Lephart ED, Horvath TL. Sexual dimorphism and aromatase in the rat retina. *Dev Brain Res*. 2001;
31. Akar ME, Taskin O, Yucel I, Akar Y. The effect of the menstrual cycle on optic nerve head analysis in healthy women. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004;

32. Dewundara SS, Wiggs JL, Sullivan DA, Pasquale LR. Is estrogen a therapeutic target for glaucoma? *Semin Ophthalmol.* 2016;31(1-2):140-6.
33. Akara Y, Yucela I, Akarb ME, Taskinb O, Özera HO, Akar Y. Menstrual cycle-dependent changes in visual field analysis of healthy women. *Ophthalmologica.* 2005;
34. Chaychi S, Polosa A, Lachapelle P. Differences in retinal structure and function between aging male and female Sprague-Dawley rats are strongly influenced by the estrus cycle. *PLoS One.* 2015;
35. Phillips CI, Gore SM. Ocular hypotensive effect of late pregnancy with and without high blood pressure. *Br J Ophthalmol.* 1985;
36. Weinreb RN, Lu A, Beeson C. Maternal corneal thickness during pregnancy. *Am J Ophthalmol.* 1988;
37. Wilke K. Episcleral venous pressure and pregnancy. *Acta Ophthalmol.* 2009;
38. Hanamsagar R, Bilbo SD. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2016.
39. Mangold CA, Wronowski B, Du M, Masser DR, Hadad N, Bixler G V., et al. Sexually divergent induction of microglial-associated neuroinflammation with hippocampal aging. *J Neuroinflammation.* 2017;
40. Tower J. Sex-Specific Gene Expression and Life Span Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2017.
41. Vajaranant TS, Pasquale LR. Estrogen deficiency accelerates aging of the optic nerve. *Menopause.* 2012;19(8):942-7.
42. Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. *Lancet.* 2017;390(10108):2183-93.
43. Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, Jong M, Naidoo KS, Sankaridurg P, et al. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology [Internet].* mayo de 2016 [citado 14 de enero de 2022];123(5):1036-42.
44. Roberti G, Oddone F, Agnifili L, Katsanos A, Michelessi M, Mastropasqua L, et al. Steroid-induced glaucoma: Epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Surv Ophthalmol [Internet].* 2020;65(4):458-72.
45. Clark AF, Wilson K, de Kater AW, Allingham RR, McCartney MD. Dexamethasone-induced ocular hypertension in perfusion-cultured human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet].* febrero de 1995 [citado 7 de febrero de 2023];36(2):478-89.
46. Tekin K, Inanc M, Elgin U. Monitoring and management of the patient with pseudoexfoliation syndrome: Current perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2019;13:453-64.
47. J F. Glaucoma. 1st ed. Cambridge, editor. 2006.
48. Goel M. Aqueous Humor Dynamics: A Review~!2010-03-03~!2010-06-17~!2010-09-02~! Open Ophthalmol J. 2010;4(1):52-9.
49. American Academy of Ophtalmology. Glaucoma. Vol. 10.
50. Gupta D, Chen PP. Glaucoma. *Am Acad Fam Physician.* 2016;15:93 (8)6.

51. Margot Brechtel-Bindel, Osvaldo González-Urquidí MAD la FT et al. Glaucoma primario de ángulo abierto Glaucoma primario de ángulo abierto. Rev Hosp Gral Dr M Gea González Julio-Septiembre. 2001;4(3):61-8.
52. Geyer O, Levo Y. Glaucoma is an autoimmune disease. Autoimmun Rev [Internet]. junio de 2020 [citado 20 de diciembre de 2023];19(6):102535.
53. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Futur Sci OA*. 2015;1(4):4-6.
54. Huang AS, Li M, Yang D, Wang H, Wang N, Weinreb RN. Aqueous Angiography in Living Nonhuman Primates Shows Segmental, Pulsatile, and Dynamic Angiographic Aqueous Humor Outflow. *Ophthalmology*. 2017;
55. Vecino E, C. S. Glaucoma Animal Models. En: *Glaucoma - Basic and Clinical Concepts*. 2011. p. 319-34.
56. Kalvin NH, Hamasaki DI, Gass JDM. Experimental Glaucoma in Monkeys: I. Relationship Between Intraocular Pressure and Cupping of the Optic Disc and Cavernous Atrophy of the Optic Nerve. *Arch Ophthalmol*. 1966;
57. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Experimental Eye Research*. 1995.
58. Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbácharo E, Araiz J, et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res*. 2005;
59. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LMH, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*. 1997;
60. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of india ink. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;
61. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*. 2006;
62. Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, Cross SD, Morgan JE. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;
63. Overby DR, Bertrand J, Tektas OY, Boussommier-Calleja A, Schicht M, Ross Ethier C, et al. Ultrastructural changes associated with dexamethasone-induced ocular hypertension in mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(8):4922-33.
64. Faralli JA, Dimeo KD, Trane RM, Peters D. Absence of a secondary glucocorticoid response in C57BL/6J mice treated with topical dexamethasone. *PLoS One*. 2018;13(3):1-18.
65. Danias J, Gerometta R, Ge Y, Ren L, Panagis L, Mittag TW, et al. Gene expression changes in steroid-induced IOP elevation in bovine trabecular meshwork. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8636-45.
66. McDowell CM, Kizhatil K, Elliott MH, Overby DR, van Batenburg-Sherwood J, Millar JC, et al. Consensus Recommendation for Mouse Models of Ocular Hypertension to Study Aqueous Humor

- Outflow and Its Mechanisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 20 de diciembre de 2023];63(2):12.
67. Ayuso Garcia D. Estudio del efecto de la degeneración de los fotorreceptores en la población de células ganglionares de la Retina. 2011;5-6.
68. American Academy of Ophtalmology. :Retina and Vitreous. Vol. 12.
69. Mayordomo A. Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata. Tesis Dr. 2013;17.
70. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 1 de octubre de 2004 [citado 19 de febrero de 2023];36(10):1861-7.
71. Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salobrar-García E, et al. Macro- and microglial responses in the fellow eyes contralateral to glaucomatous eyes. *Prog Brain Res* [Internet]. 2015 [citado 19 de febrero de 2023];220:155-72.
72. Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina. *Glia* [Internet]. abril de 2020 [citado 19 de febrero de 2023];68(4):768-96.
73. 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. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(1):1-27.
74. M.E. Leonart, R. Sánchez PMD y SR y C. Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico. *Revista Española de Patología*; 1997. p. Vol 30, nº 3.
75. Nadal-Nicolás FM, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice. *Exp Eye Res*. 2015;
76. Davis BM, Crawley L, Pahlitzsch M, Javaid F, Cordeiro MF. Glaucoma: the retina and beyond. *Acta Neuropathol*. 2016;132(6):807-26.
77. Cordeiro MF, Hill D, Patel R, Corazza P, Maddison J, Younis S. Detecting retinal cell stress and apoptosis with DARC: Progression from lab to clinic. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. enero de 2022 [citado 19 de febrero de 2023];86:100976.
78. Bizrah M, Dakin SC, Guo L, Rahman F, Parnell M, Normando E, et al. A semi-automated technique for labeling and counting of apoptosing retinal cells. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 5 de junio de 2014 [citado 19 de febrero de 2023];15:169.
79. Ahmad SS. An introduction to DARC technology. *Saudi J Ophthalmol* [Internet]. 2017;31(1):38-41.
80. Alamouti B, Funk J. Retinal thickness decreases with age: An OCT study. *Br J Ophthalmol*. 2003;
81. Harwerth RS, Wheat JL, Rangaswamy N V. Age-related losses of retinal ganglion cells and axons. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4437-43.
82. García C. Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares. 2017.
83. Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, de Vincentiis M. Emerging Concepts in

- Glaucoma and Review of the Literature. *Am J Med.* 2016;129(9):1000.e7-1000.e13.
84. Sapienza A, Raveu AL, Reboussin E, Roubeix C, Boucher C, Dégardin J, et al. Bilateral neuroinflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2016;13(1):1-16.
85. de Hoz R, Ramírez AI, González-Martín R, Ajoy D, Rojas B, Salobrar-García E, et al. Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 2018;
86. Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, et al. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation* [Internet]. 26 de julio de 2014 [citado 19 de febrero de 2023];11:133.
87. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* [Internet]. 26 de noviembre de 2020 [citado 19 de febrero de 2023];9(1):42.
88. de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, et al. Rod-like microglia are restricted to eyes with laser-induced ocular hypertension but absent from the microglial changes in the contralateral untreated eye. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citado 19 de febrero de 2023];8(12):e83733.
89. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation* [Internet]. 14 de mayo de 2012 [citado 19 de febrero de 2023];9:92.
90. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, et al. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis* [Internet]. 5 de diciembre de 2009 [citado 19 de febrero de 2023];15:2578-98.
91. Cascio C, Deidda I, Russo D, Guarneri P. The estrogenic retina: The potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. *Steroids.* 2015;103:31-41.
92. Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res* [Internet]. 4 de julio de 1997 [citado 22 de diciembre de 2023];761(2):338-41.
93. Pietrucha-Dutczak M, Amadio M, Govoni S, Lewin-Kowalik J, Smedowski A. The role of endogenous neuroprotective mechanisms in the prevention of retinal ganglion cells degeneration. Vol. 12, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
94. Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y. Neurosteroids and Oxysterols as Potential Therapeutic Agents for Glaucoma and Alzheimer's Disease. *Neuropsychiatry (London)*. 2018;8(1).
95. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol.* 1996;389-93.
96. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J*

- Ophthalmol [Internet]. marzo de 2006 [citado 27 de agosto de 2023];90(3):262-7.
97. Vajaranant TS, Nayak S, Wilensky JT, Joslin CE. Gender and glaucoma: What we know and what we need to know. Vol. 21, Current Opinion in Ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol; 2010. p. 91-9.
  98. Chan MPY, Broadway DC, Khawaja AP, Yip JLY, Garway-Heath DF, Burr JM, et al. Glaucoma and intraocular pressure in EPIC-Norfolk Eye Study: cross sectional study. BMJ [Internet]. 13 de septiembre de 2017 [citado 27 de agosto de 2023];358.
  99. Chan MPY, Grossi CM, Khawaja AP, Yip JLY, Khaw KT, Patel PJ, et al. Associations with Intraocular Pressure in a Large Cohort: Results from the UK Biobank. Ophthalmology [Internet]. abril de 2016 [citado 27 de agosto de 2023];123(4):771-82.
  100. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet]. octubre de 2006 [citado 27 de agosto de 2023];47(10):4254-61.
  101. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. Ophthalmology. noviembre de 2014;121(11):2081-90.
  102. Dewundara S, Wiggs J, Sullivan DA. Is Estrogen a Therapeutic Target for Glaucoma? 2017;31:140-6.
  103. Aragón H de. Denuncian la falta de investigación para el glaucoma, con 29.000 afectados. Salud. 2019;
  104. Andreollo NA, Freitas E, Araújo MR, Lopes LR. Review Article RAT 'S AGE VERSUS HUMAN 'S AGE : WHAT IS THE RELATIONSHIP ? ABCD Arq Bras Cir Dig [Internet]. 2012;25(1):49-51.
  105. Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K. THE LABORATORY RAT: AGE AND BODY WEIGHT MATTER. EXCLI J [Internet]. 2021 [citado 8 de marzo de 2023];20:1431-45.
  106. Koebele S V, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research HHS Public Access. Maturitas [Internet]. 2016 [citado 8 de marzo de 2023];87:5-17.
  107. Frick KM. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? Horm Behav [Internet]. enero de 2009 [citado 20 de diciembre de 2023];55(1):2-23.
  108. Rodrigo MJMJM, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Luna C, Pablo LE, et al. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. Exp Eye Res [Internet]. 16 de junio de 2020 [citado 7 de junio de 2022];200(August):108208.
  109. Rodrigo MJ, Garcia-Herranz D, Subias M, Martinez-Rincón T, Mendez-Martínez S, Bravo-Osuna I, et al. Chronic Glaucoma Using Biodegradable Microspheres to Induce Intraocular Pressure Elevation. Six-Month Follow-Up. Biomedicines [Internet]. 2021 [citado 7 de junio de 2022];9(6).
  110. Garcia-Herranz D, Rodrigo MJ, Subias M, Martinez-Rincon T, Mendez-Martinez S, Bravo-Osuna I, et al. Novel Use of PLGA Microspheres to Create an Animal Model of Glaucoma with Progressive

- Neuroretinal Degeneration. *Pharmaceutics* [Internet]. 8 de febrero de 2021 [citado 17 de enero de 2022];13(2).
111. Rodrigo MJM, Garcia-Herranz D, Subias M, Martinez-Rincón T, Mendez-Martínez S, Bravo-Osuna I, et al. Influence of chronic ocular hypertension on emmetropia: Refractive, structural and functional study in two rat models. *J Clin Med* [Internet]. 16 de junio de 2021 [citado 7 de junio de 2022];10(16):1-3.
  112. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Pablo LE, Polo V, et al. Influence of sex on neuroretinal degeneration: Six-month follow-up in rats with chronic glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. octubre de 2021;62(13):1-3.
  113. Ding C, Wang P, Tian N. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp Eye Res*. 2011;
  114. Lozano DC, Hartwick ATE, Twa MD. Circadian rhythm of intraocular pressure in the adult rat. *Chronobiol Int*. 2015;
  115. Sanjuán MJR. Evaluación de la función visual en enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Múltiple. Tesis Dr. 2017;
  116. Pinilla I, García-Martín E, Cuenca N. » Tomografia de coherencia óptica de dominio espectral. Utilidad en el control del espesor macular en enfermos afectos de retinosis pigmentaria retinosis.org. 2009;(June).
  117. Ross M, Honig H, Ezra-Elia R, Banin E, Obolensky A, Averbukh E, et al. Consecutive unilateral recording of the two eyes affects dark-adapted ERG responses, when compared to simultaneous bilateral recording. *Doc Ophthalmol* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 8 de marzo de 2023];137(3):183-92.
  118. Umeya N, Yoshizawa Y, Fukuda K, Ikeda K, Kamada M, Miyawaki I. Availability of multistep light stimulus method for evaluation of visual dysfunctions. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. 2019 [citado 8 de marzo de 2023];96:27-33.
  119. Wang VC, Neese SL, Korol DL, Schantz SL. Estradiol impairs response inhibition in young and middle-aged, but not old rats. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2011 [citado 21 de diciembre de 2023];33(3):405-14.
  120. Mohr MA, Wong AM, Tomm RJ, Soma KK, Micevych PE. Pubertal development of estradiol-induced hypothalamic progesterone synthesis. *Horm Behav* [Internet]. mayo de 2019 [citado 21 de diciembre de 2023];111:110-3.
  121. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* [Internet]. junio de 2013 [citado 21 de diciembre de 2023];4(6):624-30.
  122. Huang AS, Mohindroo C, Weinreb RN. Aqueous Humor Outflow Structure and Function Imaging At the Bench and Bedside: A Review. *J Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. agosto de 2016 [citado 21 de diciembre de 2023];7(4).
  123. Rada JAS, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia. *Exp Eye Res* [Internet]. febrero de 2006 [citado 21 de diciembre de 2023];82(2):185-200.
  124. Frankfort BJ, Khan AK, Tse DY, Chung I, Pang JJ, Yang Z, et al. Elevated intraocular pressure causes

- inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 28 de enero de 2013 [citado 21 de diciembre de 2023];54(1):762-70.
125. Leo SW, Scientific Bureau of World Society of Paediatric Ophthalmology and Strabismus (WSPOS). Current approaches to myopia control. *Curr Opin Ophthalmol* [Internet]. mayo de 2017 [citado 21 de diciembre de 2023];28(3):267-75.
126. El-Nimri NW, Wildsoet CF. Effects of Topical Latanoprost on Intraocular Pressure and Myopia Progression in Young Guinea Pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1 de mayo de 2018 [citado 22 de diciembre de 2023];59(6):2644-51.
127. Schmid KL, Abbott M, Humphries M, Pyne K, Wildsoet CF. Timolol lowers intraocular pressure but does not inhibit the development of experimental myopia in chick. *Exp Eye Res* [Internet]. mayo de 2000 [citado 22 de diciembre de 2023];70(5):659-66.
128. Huang J, Wen D, Wang Q, McAlinden C, Flitcroft I, Chen H, et al. Efficacy Comparison of 16 Interventions for Myopia Control in Children: A Network Meta-analysis. *Ophthalmology* [Internet]. abril de 2016 [citado 22 de diciembre de 2023];123(4):697-708.
129. Noailles A, Maneu V, Campello L, Lax P, Cuenca N. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death Dis*. 2018;9(3).
130. Ramirez AI, de Hoz R, Salobrar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. Vol. 9, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017. p. 1-21.
131. Roche SL, Wyse-Jackson AC, Gómez-Vicente V, Lax P, Ruiz-Lopez AM, Byrne AM, et al. Progesterone attenuates microglial-driven retinal degeneration and stimulates protective fractalkine-CX3CR1 signaling. *PLoS One*. noviembre de 2016;11(11):1-27.
132. Roberts AL, Mavlyutov TA, Perlmutter TE, Curry SM, Harris SL, Chauhan AK, et al. Fibronectin extra domain A (FN-EDA) elevates intraocular pressure through Toll-like receptor 4 signaling. *Sci Rep* [Internet]. 17 de junio de 2020 [citado 20 de septiembre de 2023];10(1):9815.
133. Maddali P, Ambesi A, McKeown-Longo PJ. Induction of pro-inflammatory genes by fibronectin DAMPs in three fibroblast cell lines: Role of TAK1 and MAP kinases. *PLoS One* [Internet]. 2023 [citado 22 de diciembre de 2023];18(5).
134. Zheng M, Ambesi A, McKeown-Longo PJ. Role of TLR4 Receptor Complex in the Regulation of the Innate Immune Response by Fibronectin. *Cells* [Internet]. 15 de enero de 2020 [citado 22 de diciembre de 2023];9(1).
135. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, et al. Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-Weeks follow-up study in rats. *Exp Eye Res* [Internet]. 28 de noviembre de 2023 [citado 16 de diciembre de 2023];109736.

## **15. APÉNDICES**

### Apéndice I. Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas

#### **Artículo 1: Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat.**

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Luna C, Pablo LE, Polo V, Garcia-Martin E.*

*Experimental Eye Research.* 2020;200:108208.

DOI: 10.1016/j.exer.2020.108208

ISSN: 0014-4835

PMID: 32882213

Factor de impacto (JCR 2019):3,011.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2019: 12/60  
(Cuartil 1)

#### **Artículo 2: Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models.**

*Mendez-Martinez S, Martinez-Rincon T, Subias M, Pablo LE, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo D, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E, Rodrigo MJ.*

*Journal of Clinical Medicine.* 2021;10(16):3697

DOI: 10.3390/jcm10163697

ISSN: 2077-0383

PMID: 3441992

Factor de impacto (JCR 2020): 4,242

Posición entre las revistas de Medicina, General e Interna (Medicine, General & Internal) en el JCR 2020: 39/167 (Cuartil 1)

**Artículo 3: Influence of sex on neuroretinal degeneration: 6-month follow-up in rats with chronic glaucoma.**

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Pablo LE, Polo V, Aragon-Navas A, Garcia-Herranz D, Garcia Feijoo J, Bravo Osuna I, Herrero-Vanrell R, Garcia-Martin E.*

*Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2021;62(13):9.

DOI: 10.1167/iovs.62.13.9 ISSN: 2077-0383

ISSN: 0146-0404

PMID: 34643665

Factor de impacto (JCR 2020):4,799.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2020. 8/62 (Cuartil 1)

**Artículo 4: Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats.**

*Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, Mendez-Martinez S, Garcia-Herranz D, Garcia-Feijoo J, Herrero Vanrell R, Pablo L, Bravo Osuna I, Munuera I, Garcia-Martin E.*

*Experimental Eye Research.* 2023; 28:238:109736.

DOI: 10.1016/j.exer.2023.109736

ISSN: 0014-4835

PMID: 38036216

Factor de impacto (JCR 2022): 3,4.

Posición entre las revistas de Oftalmología (Ophthalmology) en el JCR 2022: 16/62 (Cuartil 2; Tercil 1).

Apéndice II. Justificación de la contribución del doctorando en cada publicación

**Artículo 1: Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat.**

Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de gráficos.

**Artículo 2: Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models.**

Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de gráficos.

**Artículo 3: Influence of sex on neuroretinal degeneration: 6-month follow-up in rats with chronic glaucoma.**

Realización de investigación básica con los animales, recogida de datos, participación en la redacción del artículo y realización de gráficos.

**Artículo 4: Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats.**

Realización de la investigación básica con animales, recogida y curación de datos, metodología, redacción, revisión y edición del artículo.

Apéndice III. Renuncia de los coautores no doctores a usar los artículos en su propia Tesis Doctoral



**RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS  
COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE  
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

<b>1.- Datos personales del coautor</b>		
Apellidos: SUBÍAS PERIÉ	Nombre: MANUEL	
DNI/Pasaporte/NIE: 18055956J	Teléfono 615048562	Correo electrónico manusubias@gmail.com
<b>2.- Tesis Doctoral</b>		
Título: Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma		
Autor: Teresa Martínez Rincón		
Programa de doctorado: Medicina		
<b>3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor</b>		
<p>1. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. <i>Exp Eye Res.</i> 2020;200:108208. doi:10.1016/j.exer.2020.108208</p> <p>2. Mendez-Martinez S, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of Chronic Ocular Hypertension on Emmetropia: Refractive, Structural and Functional Study in Two Rat Models. <i>J Clin Med.</i> 2021;10(16):3697. Published 2021 Aug 20. doi:10.3390/jcm10163697</p> <p>3. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of Sex on Neuroretinal Degeneration: Six-Month Follow-Up in Rats With Chronic Glaucoma. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2021;62(13):9. doi:10.1167/iovs.62.13.9</p> <p>4. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-Weeks follow-up study in rats. <i>Exp Eye Res.</i> Published online November 28, 2023. doi:10.1016/j.exer.2023.109736</p>		

**RENUNCIA:**

Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

<lugar>,<fecha>

Zaragoza

a 19 de Diciembre de 2023

Firma: Manuel Subías Perié



**RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS  
COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE  
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Luna Jordán		Nombre: Coral
DNI/Pasaporte/NIE: 18060098S	Teléfono 653281269	Correo electrónico clunajordan@gmail.com

2.- Tesis Doctoral		
Título: Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma		
Autor: Teresa Martínez Rincón		
Programa de doctorado: Medicina		

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor		
1. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long-Evans rat. Exp Eye Res. 2020;200:108208. doi:10.1016/j.exer.2020.108208		

<b>RENUNCIA:</b>
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>,<fecha>
Zaragoza 20 de Diciembre 2023
Firma: 

Conforme a lo dispuesto en la legislación vigente (Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril), de protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasarán a ser tratados por la Universidad de Zaragoza con la finalidad de tramitar la gestión académica y administrativa de sus estudiantes, así como su participación en actividades y servicios universitarios. Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, limitación, oposición o portabilidad ante el Gerente de la UZ



Escuela de Doctorado  
Universidad Zaragoza

**RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS  
COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE  
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: MUNUERA RUFAS	Nombre: <b>INÉS</b>	
DNI/Pasaporte/NIE: 18061347E	Teléfono 699383660	Correo electrónico inesmunueraof@gmail.com



2.- Tesis Doctoral	
Título:	Influencia del sexo en la función y estructura de la neurorretina en nuevos modelos de experimentación animal de glaucoma
Autor:	Teresa Martínez Rincón
Programa de doctorado:	Medicina

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor	
1. Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-Weeks follow-up study in rats. Exp Eye Res. Published online November 28, 2023. doi:10.1016/j.exer.2023.109736	

<b>RENUNCIA:</b>
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>,<fecha>
Zaragoza                    20/12/2023
Firma:

Conforme a lo dispuesto en la legislación vigente (Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril), de protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasarán a ser tratados por la Universidad de Zaragoza con la finalidad de tramitar la gestión académica y administrativa de sus estudiantes, así como su participación en actividades y servicios universitarios. Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, limitación, oposición o portabilidad ante el Gerente de la UZ

## Apéndice IV. Documentación de la Comisión Ética Asesora de la Experimentación Animal (CEA)

 <p><b>Comisión ética asesora para la experimentación animal</b> <b>Universidad Zaragoza</b></p>	<p>Ref. PI34/17</p> <p><b>COMISIÓN ÉTICA ASESORA PARA LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> <b>REGISTRO DE SALIDA</b> Nº 470 Fecha 05/09/17 UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA</p>
<p><b>CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b></p>	
<p><b>Título del procedimiento de experimentación:</b> Desarrollo de modelos animales de glaucoma primario de ángulo abierto y evaluación de nuevos tratamientos neuroprotectores (Subproyecto 2)</p>	
<p><b>Título del proyecto en el que se incluye:</b> Microtecnologías de aplicación biomédica en el tratamiento de la neurodegeneración en el glaucoma (Proyecto coordinado)</p>	
<p><b>Tipo de proyecto:</b> II      <b>Centro de realización:</b> ES 50 297 0012 011 (CIBA)</p>	
<p><b>Investigador responsable:</b> Luis E. Pablo Júlvez</p>	
<p><b>Duración:</b> 3 años      <b>Fecha estimada de inicio del procedimiento:</b> Enero, 2018</p>	
<p><b>Animales que implica:</b></p>	
<p><b>especie (s):</b> Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)</p>	
<p><b>peculiaridades:</b> Long-Evans, machos y hembras, 3 semanas</p>	
<p><b>número:</b> 385</p>	
<p><b>Severidad:</b> Moderado</p>	<p><b>Evaluación retrospectiva:</b> NO</p>
<p><b>Fecha de presentación:</b> 27 de junio de 2017</p>	
<p>Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal* el día 5 de julio de 2017, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:</p>	
<p>QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 53/2013). Por todo ello, se emite <b>informe FAVORABLE**</b>.</p>	
<p>Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de cinco años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.</p>	
<p>*Órgano habilitado para realizar la evaluación y evaluación retrospectiva (Resolución de 6 de agosto de 2013 de la Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón).</p>	
<p>**Observaciones: Las personas que realicen el procedimiento deben poseer la capacitación previa adecuada (Art. 15).</p>	
<p>En Zaragoza, a 20 de julio de 2017</p>	
<p>EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN</p>	
 <p>Jorge Palacio Liesa</p>	
<p>EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN</p>	
 <p>Luis Miguel García Vinuesa</p>	
<p>Domingo Miral, s/n 50009 Zaragoza Tel. +34 976 76 28 47 cea@unizar.es / http://cea.unizar.es</p>	
<p>La Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón, a la vista de la evaluación emitida por el órgano habilitado, autoriza la realización del proyecto en los términos descritos en la solicitud. Fecha: 04/SET/2017</p>	
 <p>Enrique Novales Allué Director General de Alimentación y Fomento Agroalimentario</p>	
<p><b>unizar.es</b></p>	

## Apéndice V. Certificado para capacitación de manejo de animales de experimentación



### Diploma del Curso

Función de Eutanasia de los Animales: Función B

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

Teresa Martínez Rincón  
78752266J

Ha superado el curso de 24 horas de duración para la obtención de la Función B de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 15 de Enero al 12 de Marzo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/069861.9/16 de Fecha 08/04/2016).

Y para que conste se expide en Madrid a 12 de Marzo de 2018.

Los Directores del Curso

Dr. José Mª Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015

CIF B884624535  
C/ Los Fresnos 14  
28720 Bustarviejo (Madrid)

Tel. 699921930  
animalaria@animalaria.org

CIF B884624535  
C/ Los Fresnos 14  
28720 Bustarviejo (Madrid)

Tel. 699921930  
animalaria@animalaria.org

Programa del curso para la Función B	
Nº	Módulos Troncales
1	Legislación nacional
2	Ética, Bienestar Animal y las Tres Erres. Nivel 1
3	Biología básica. Nivel 1
4	Cuidado, Salud y Manejo de los Animales. Nivel 1
5	Reconocimiento del Dolor, el Sufriimiento y la Angustia
6	Métodos incruentos de sacrificio (Eutanasia). Nivel 1
Módulos de Función	
2	Biología básica. Nivel 2
5	Métodos incruentos de sacrificio (Eutanasia). Nivel 2

## Diploma del Curso

### Función de Realización de los Procedimientos: Función C

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

**Teresa Martínez Rincón**  
78752266j

Ha superado el curso de 57 horas de duración para la obtención de la Función C de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 15 de Enero al 12 de Marzo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/069861.9/16 de Fecha 08/04/2016).

Programa del curso para la Función C	
Nº	Módulos
<b>Módulos Troncales</b>	
1	Legislación nacional
2	Ética, bienestar animal y las Tres Erres. Nivel 1
3	Biología básica. Nivel 1
4	Cuidado, salud y manejo de los animales. Nivel 1
5	Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia
6	Métodos inhumanos de sacrificio (eutanasia). Nivel 1
<b>Módulos de Función</b>	
2	Biología básica. Nivel 2
6	Procedimientos mínimamente invasivos realizados sin anestesia. Nivel 1
7	Procedimientos mínimamente invasivos realizados sin anestesia. Nivel 2
8	Anestesia para procedimientos menores
9	Anestesia para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados
10	Principios de cirugía

Y para que conste se expide en Madrid a 12 de Marzo de 2018.

#### Los Directores del Curso

Dr. José Mª Orellana Muriana Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015

CIF B84624535  
C/ Los Fresnos 14

Tel. 699921930  
animalaria@animalaria.org

CIF B84624535  
C/ Los Fresnos 14  
28720 Bustarviejo (Madrid)

Tel. 699921930  
animalaria@animalaria.org



