

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, OFTALMOLOGÍA Y**  
**OTORRINOLARINGOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Detección precoz de demencia tipo Alzheimer mediante  
pruebas oftalmológicas psicofísicas y tomografía de  
coherencia óptica como pruebas diagnósticas  
complementarias**

Early detection of Alzheimer's dementia with ophthalmological  
psychophysical tests and optical coherence tomography as  
complementary diagnostic tests

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Elena Salobrar García Martín**

DIRECTORES

**José Manuel Ramírez Sebastián**  
**Rosa de Hoz Montañana**  
**Pedro Gil Gregorio**

Madrid  
Ed. electrónica 2019



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo

Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL



**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL**

**Detección precoz de demencia tipo Alzheimer mediante pruebas oftalmológicas psicofísicas y tomografía de coherencia óptica como pruebas diagnósticas complementarias**

*Early detection of Alzheimer's dementia with ophthalmological psychophysical tests and optical coherence tomography as complementary diagnostic tests*

PRESENTADA POR

**Elena Salobar García Martín**

Directores

Prof. D. José Manuel Ramírez Sebastián

Prof. Dña. Rosa de Hoz Montañana

Prof. D. Pedro Gil Gregorio

Madrid, 2018



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo

Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL



**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL**

**Detección precoz de demencia tipo Alzheimer mediante pruebas oftalmológicas psicofísicas y tomografía de coherencia óptica como pruebas diagnósticas complementarias**

*Early detection of Alzheimer's dementia with ophthalmological psychophysical tests and optical coherence tomography as complementary diagnostic tests*

PRESENTADA POR

**Elena Salobrar García Martín**

**Dirigida por:**

**Prof. D. José Manuel Ramírez Sebastián**

Catedrático de Oftalmología. Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL. Facultad de Medicina. Director del Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Universidad Complutense de Madrid

**Prof. Dña. Rosa de Hoz Montañana**

Profesora Titular del Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL. Facultad de Óptica y Optometría. Universidad Complutense de Madrid

**Prof. D. Pedro Gil Gregorio**

Profesor Titular del Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Jefe del Servicio de Geriátrica. Hospital Clínico San Carlos

**Madrid, 2018**





D. **José Manuel Ramírez Sebastián**, Catedrático de Oftalmología del Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Universidad Complutense de Madrid

Dña. **Rosa de Hoz Montañana**, Profesora Titular del Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL. Facultad de Óptica y Optometría. Universidad Complutense de Madrid

D. **Pedro Gil Gregorio**, Profesor Titular del Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Jefe del Servicio de Geriátrica. Hospital Clínico San Carlos

**A U T O R I Z A N:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada ***“Detección precoz de demencia tipo Alzheimer mediante pruebas oftalmológicas psicofísicas y tomografía de coherencia óptica como pruebas diagnósticas complementarias”***, realizada por Dña. **Elena Salobrar García Martín**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, para su evaluación y la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste donde fuera necesario, expiden y firman el presente certificado en Madrid en Diciembre de 2018.

Fdo: Prof. José M.  
Ramírez Sebastián

Fdo: Prof. Rosa de Hoz  
Montañana

Fdo: Prof. Pedro Gil  
Gregorio





Esta tesis ha sido financiada por  
el contrato predoctoral para la  
**Formación de Profesorado Universitario (FPU)**  
con código **FPU 13/01910**





**Tesis Doctoral acreditada por OFTARED. RETICS Patología Ocular**

**“Enfermedades oculares: Prevención, detección precoz, tratamiento y rehabilitación de las patologías oculares”**



“Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes.”

*Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)*



**A mi familia**



## ***Agradecimientos***

Esta tesis comenzó llamando a diversas puertas que se cerraban por sentir que este proyecto se *les iba de las manos* hasta que al final encontré a mi familia científica y a mi casa, el Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Gracias a todos aquellos que habéis hecho que mi camino se allanase.

**José Manuel Ramírez Sebastián**, Catedrático de Oftalmología y Maestro. Gracias por acompañarme en todo este trayecto sin soltar nunca mi mano, por guiarme y enseñarme, por hacer que me ilusione tanto con la investigación como por la docencia dejarme aprender contigo en la clínica. Por llamarme “compañera” y darme la oportunidad de aprender de tu conocimiento y generosidad. Nunca podré agradecerte el poder haber aprendido de ti.

**Rosa de Hoz Montañana**, Profesora Titular y madre científica. Gracias por las horas invertidas descifrando artículos o viendo preparaciones, por tus enseñanzas y tu paciencia infinita. Por tu inmediatez y predisposición cada vez que me surgía una duda o había que ver un paciente. Por tu calidez y humanidad. Gracias por hacerme sentir parte de la familia desde un principio.

**Pedro Gil Gregorio**, Profesor Titular. Gracias por creer en este proyecto y abrir las puertas del Servicio de Geriátrica sin trabas. Por facilitarme el aprendizaje en geriatría y por estar pendiente de si se necesitaba algo. Gracias por tus aportaciones para mejorar este trabajo desde el enfoque de la geriatría.

**Ana I. Ramírez Sebastián**, Profesora Titular. Mi segunda madre científica. Bien sabes que esta tesis también está co-dirigida por ti. Gracias por tu constancia, tu implicación y las horas invertidas, ya sea en la escritura de artículos como en el microscopio. Gracias por ser mi familia y el apoyo incondicional desde el comienzo.

**Juan José Salazar Corral**, Profesor Titular. Gracias por tus enseñanzas, por estar siempre pendiente de todo y que no falte de nada. Por hacernos la vida más fácil, a pesar de que eso implique condenarte delante de un ordenador o ser tú quien se pelee con la burocracia. Gracias por formar familia. Por creer en un proyecto loco que una estudiante de Master te propuso en un pasillo y ver que de ahí podría salir esta tesis. Gracias por ver siempre más allá y por esas noches sin dormir cuando surge un problema y siempre intentas solucionar.

**Raquel Yubero Pancorbo**, Neuropsicóloga del Hospital Clínico San Carlos. Gracias por enseñarme el manejo de los pacientes con demencia. Por tu exquisito tacto e intuición, y enseñarme que detrás de un paciente con demencia se encuentra una familia desolada. Por

estar siempre dispuesta a ayudar y tener las puertas de la Unidad de Memoria abiertas para este estudio.

**Carmen Dori Méndez Hernández**, Oftalmóloga en el Hospital Clínico San Carlos. Gracias por tu ayuda y apoyo en el estudio de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico. Por estar siempre pendiente en el hospital de estos *pacientes tan especiales*. Por habernos sentado, una y otra vez a discutir resultados y por estar siempre dispuesta a colaborar.

Thanks to Professor **Francisco Ambrosio**, for giving me the opportunity to be a part in the IBILI lab in Coimbra.

Gracias a la **familia del Castroviejo** por toda la ayuda prestada tanto a nivel administrativo como en la clínica y en el laboratorio.

Gracias al **Servicio de Geriatría del Hospital Clínico San Carlos**, siempre pendiente de nuestras historias clínicas y de ayudarnos.

Reservo mi último agradecimiento a mi **FAMILIA**.

**Antonio**, gracias por tu amor, generosidad y empuje cuando las fuerzas flaqueaban. Gracias por creer en mí, aunque este proyecto nos haya robado horas de estar juntos. Gracias por escucharme, cuando intentaba explicarte los diferentes problemas que iban surgiendo. Gracias por entenderme, cuando hay veces que ni yo me entiendo. Gracias por estar, cuando yo no puedo estar. Gracias por darme lo que más quiero.

A **Paula**, mi motor de vida. Apareciste en la mitad de este camino para dar luz a mis pasos y un objetivo que alcanzar. Gracias por ser mi alegría cada mañana y por recibirme con los brazos abiertos a pesar de no haberme visto en todo el día.

A mis padres, **Ángel y Carmen**. Gracias por siempre empujarme y enseñarme que se puede alcanzar todo aquello que uno se proponga con esfuerzo y tesón. Gracias por ser tan buenas personas, por creer en mí, por darme la oportunidad de formarme y educarme. Gracias por todo el apoyo incondicional y por hacerme saber que estáis orgullosos de mí. Yo no podría estar más orgullosa de vosotros.

A **Antonio y Felisa**. A **Fernando y Paco**. Gracias por velar por mi familia, por estar siempre disponibles sin poner objeción alguna. Por el cariño que nos dais y por lo buenas personas que sois. Gracias por hacernos sentir tan queridos.

Gracias a todos los **pacientes** y a sus **familiares** que participaron en este estudio de forma desinteresada con gran implicación y compromiso. Sin ellos, esta tesis no habría sido posible.

# ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>0.</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>RESUMEN / SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
1.1	Resumen en español .....	11
1.2	Resumen en inglés .....	17
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Envejecimiento .....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Teorías del envejecimiento.....	25
2.1.2	Envejecimiento cerebral.....	30
2.1.2.1	<i>Cambios fisiológicos cerebrales .....</i>	<i>31</i>
2.1.2.2	<i>Cambios funcionales cognitivos.....</i>	<i>32</i>
2.1.3	Envejecimiento ocular.....	33
2.1.3.1	<i>Cambios fisiológicos oculares.....</i>	<i>33</i>
2.1.3.2	<i>Cambios funcionales en la visión.....</i>	<i>38</i>
<b>2.2</b>	<b>Demencia.....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Historia de la demencia.....	41
2.2.2	Definición de demencia .....	44
2.2.3	Epidemiología de la demencia.....	45
2.2.4	Factores de riesgo de la demencia .....	47
2.2.5	Clasificación de la demencia.....	48
<b>2.3</b>	<b>Demencia tipo Alzheimer .....</b>	<b>52</b>
2.3.1	Definición del Alzheimer .....	52
2.3.2	Fisiopatología del Alzheimer .....	54
2.3.3	Epidemiología del Alzheimer .....	56
<b>2.4</b>	<b>Demencia vascular .....</b>	<b>59</b>
<b>2.5</b>	<b>Detección y diagnóstico actual de la demencia .....</b>	<b>60</b>
2.5.1	Historia del paciente.....	61
2.5.2	Mini Mental State Examination.....	61
2.5.3	Test neuropsicológicos .....	62
2.5.4	Pruebas de neuroimagen estructural.....	62
2.5.5	Pruebas de neuroimagen funcional.....	63
<b>2.6</b>	<b>El ojo: extensión del SNC .....</b>	<b>64</b>
2.6.1	La retina .....	68
2.6.2	La glía retiniana.....	70

2.6.2.1	<i>Macroglía</i> .....	71
2.6.2.2	<i>Microglía</i> .....	72
2.6.3	La vía visual.....	73
2.6.4	Manifestaciones oculares en desórdenes del SNC .....	76
2.6.4.1	<i>Ictus</i> .....	76
2.6.4.2	<i>Esclerosis múltiple</i> .....	77
2.6.4.3	<i>Enfermedad de Parkinson</i> .....	78
2.6.4.4	<i>Enfermedad de Alzheimer</i> .....	80
<b>2.7</b>	<b>Fisiopatología de la EA en la vía visual en humanos y modelos experimentales de EA.</b> .....	<b>80</b>
2.7.1	Cristalino y humor vítreo y acuoso en la EA.....	81
2.7.2	Retina en la EA .....	81
2.7.2.1	<i>Células ganglionares de la retina en la EA</i> .....	81
2.7.2.2	<i>La glía retiniana en la EA</i> .....	84
2.7.2.3	<i>Placas de amiloide y ovillos neurofibrilares.</i> .....	87
2.7.2.4	<i>Angiopatía amiloidea en la retina de la EA</i> .....	90
2.7.2.5	<i>Vascularización y flujo sanguíneo retiniano en la EA</i> .....	91
2.7.3	Coroides en la EA.....	92
2.7.4	Nervio óptico en la EA .....	94
2.7.5	Núcleo geniculado lateral en la EA .....	95
2.7.6	Afectación de otros núcleos cerebrales en la EA .....	96
2.7.6.1	<i>Colículo superior</i> .....	96
2.7.6.2	<i>Núcleo supraquiasmático</i> .....	96
2.7.6.3	<i>Núcleos pulvinares</i> .....	96
2.7.7	Cortex visual en la EA.....	97
2.7.8	Tomografía de Coherencia Óptica en la EA.....	98
2.7.9	OCTA en la EA.....	100
2.7.10	Glaucoma y EA.....	101
<b>2.8</b>	<b>Modelo experimental de ratón 3xTgAD</b> .....	<b>102</b>
2.8.1	Alteraciones de la glía retiniana en el modelo 3xTgAD .....	103
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b> .....	<b>107</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>111</b>
4.1	Objetivo primario: .....	111
4.2	Objetivos secundarios: .....	111
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>115</b>

<b>5.1</b>	<b>Selección de pacientes y controles .....</b>	<b>115</b>
<b>5.2</b>	<b>Criterios de inclusión y exclusión.....</b>	<b>119</b>
5.2.1	Criterios de inclusión.....	119
5.2.2	Criterios de exclusión.....	119
<b>5.3</b>	<b>Protocolo clínico de obtención de datos .....</b>	<b>119</b>
<b>5.4</b>	<b>Descripción de las pruebas realizadas .....</b>	<b>121</b>
5.4.1	Agudeza Visual .....	121
5.4.2	Sensibilidad al contraste.....	121
5.4.3	Test de percepción del color .....	122
5.4.4	Tomografía de coherencia óptica .....	124
5.4.5	OCT Spectralis® para medida del espesor de la mácula segmentada en capas, del espesor de la coroides y de la zona avascular foveal.....	127
5.4.6	Retinografía.....	131
5.4.6.1	<i>Análisis colorimétrico de la hemoglobina mediante la retinografía papilar</i>	132
5.4.7	Test Digital de Percepción.....	135
5.4.8	Mini Mental State Examination.....	136
<b>5.5</b>	<b>Análisis de las retinas de ratones 3xTgAD y controles no transgénicos.....</b>	<b>137</b>
5.5.1	Animales de experimentación y anestesia .....	137
5.5.1.1	<i>Grupos experimentales.....</i>	<i>138</i>
5.5.2	Perfusión y fijación .....	139
5.5.3	Disección de las retinas para microscopía óptica. Montajes planos de retina	140
5.5.4	Procesamiento histológico de las retinas. Técnicas inmunohistoquímicas	141
5.5.5	Estudio de la microglía Iba-1+ de la retina.....	145
5.5.6	Estudio cuantitativo de las células Iba-1+ de la retina.....	148
5.5.6.1	<i>Estudio del número de células Iba-1+ de la retina. ....</i>	<i>149</i>
5.5.6.2	<i>Estudio del tamaño del soma de las células Iba-1+ de la retina. ....</i>	<i>150</i>
<b>5.6</b>	<b>Método estadístico aplicado.....</b>	<b>151</b>
5.6.1	Estadística descriptiva .....	151
5.6.2	Estadística analítica .....	151
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>155</b>
<b>6.1</b>	<b>Análisis descriptivo demográfico.....</b>	<b>155</b>
6.1.1	Análisis de la edad de la muestra. ....	155
6.1.2	Análisis de sexo y etnia de la muestra. ....	156

6.1.3	Análisis de MMSE de la muestra. ....	157
6.1.4	Análisis de los factores de riesgo cardiovascular de la muestra. ....	158
6.1.5	Análisis de la presión intraocular de la muestra. ....	162
<b>6.2</b>	<b>Análisis estadístico test psicofísicos.....</b>	<b>164</b>
6.2.1	Agudeza Visual. ....	164
6.2.2	Sensibilidad al contraste.....	165
6.2.3	Percepción del color.....	169
6.2.4	Test Digital de Percepción.....	174
<b>6.3</b>	<b>Análisis estadístico de las pruebas estructurales de retina.....</b>	<b>178</b>
6.3.1	Estudio del espesor total de la mácula mediante OCT.....	178
6.3.2	Estudio del espesor por capas de la mácula mediante OCT Spectralis. ....	193
6.3.3	Estudio de la papila mediante OCT.....	204
6.3.4	Estudio de la coroides mediante OCT Spectralis .....	216
6.3.5	Estudio de la zona avascular foveal mediante OCTA. ....	218
6.3.6	Estudio de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico.....	219
<b>6.4</b>	<b>Curvas ROC.....</b>	<b>221</b>
6.4.1	Test psicofísicos. Curvas ROC.....	221
6.4.2	Pruebas morfológicas. Curvas ROC.....	223
<b>6.5</b>	<b>Análisis de correlaciones con el MMSE. ....</b>	<b>230</b>
6.5.1	Correlaciones MMSE y test psicofísicos.....	230
6.5.2	Correlaciones MMSE y OCT .....	231
<b>6.6</b>	<b>Análisis de correlaciones entre la sensibilidad al contraste y el espesor de la retina medido con OCT.....</b>	<b>232</b>
6.6.1	Correlaciones sensibilidad al contraste y espesores maculares.....	232
6.6.2	Correlaciones sensibilidad al contraste y espesores peripapilares.....	237
<b>6.7</b>	<b>Análisis de las células Iba-1+ en las retinas de ratones 3xTgAD.</b>	<b>242</b>
6.7.1	Descripción morfológica de las células Iba-1+ en las muestras de retina..	242
6.7.1.1	<i>Grupo de animales no transgénicos de 16 meses de edad (controles).....</i>	<i>242</i>
6.7.1.2	<i>Grupo de animales transgénicos de Alzheimer (3xTgAD) de 16 meses de edad.</i>	<i>243</i>
6.7.2	Expresión de OX-6 en las retinas de animales transgénicos 3xTgAD y controles.....	245
6.7.3	Análisis cuantitativo de las retinas de ratones 3xTgAD y los controles de edad.	254
6.7.3.1	<i>Número de células Iba-1+ en los ratones 3xTgAD y controles. ....</i>	<i>254</i>
6.7.3.2	<i>Área del soma Iba-1+ en los ratones 3xTgAD y controles. ....</i>	<i>256</i>

---

<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>261</b>
7.1	Selección de la muestra de pacientes a estudio.....	261
7.2	Cambios en los test psicofísicos en los pacientes con EA. ....	263
7.2.1	Disminución de la agudeza visual.....	263
7.2.2	Bajada de todas las frecuencias en la sensibilidad al contraste. ....	265
7.2.3	Empeoramiento de la visión cromática.....	268
7.2.4	Empeoramiento de la integración visual. ....	271
7.3	Pruebas estructurales de la retina. ....	272
7.3.1	Tomografía de coherencia óptica. ....	272
7.3.2	Estudio de la zona avascular foveal .....	281
7.3.3	Disminución del espesor coroideo .....	282
7.3.4	Valores de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico.....	283
7.4	Estudio de la población microglial en el modelo experimental 3xTgAD. ....	286
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>297</b>
8.1	Conclusiones en español .....	297
8.2	Conclusiones en inglés.....	299
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>303</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>335</b>
10.1	Carta de aceptación del proyecto de investigación por el comité de ética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.....	335
10.2	Hoja de recogida de datos. ....	336
10.3	Consentimiento informado.....	340
10.4	Contrato predoctoral Formación al Profesorado Universitario (FPU). .	341
10.5	Estancia internacional en la Universidad de Coimbra, Portugal.....	342
10.6	Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral.....	344
10.7	Comunicaciones en congresos con resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral. ....	346
10.8	Premios obtenidos de los resultados de esta tesis doctoral.....	353
<b>11.</b>	<b>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>355</b>



## 0. ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
APP	Proteína precursora del amiloide
AV	Agudeza Visual
A $\beta$	Beta amiloide
CCG	Capa de células ganglionares
CCI	Complejo de capas internas
CDR	Clinical Dementia Rating
CFH	Gen del factor H del complemento
CFNR	Capa de fibras nerviosas de la retina
CGR	Células ganglionares de la retina
CGRm	Células ganglionares de la retina melanopsínicas
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CS	Colículo superior
DCL	Deterioro cognitivo leve
DE	Desviación estándar
DV	Demencia vascular
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Esclerosis múltiple
EP	Enfermedad de Parkinson
EPR	Epitelio pigmentario de retina
ERG	Electroretinograma
GDS	Global Deterioration Scale
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
GPAA	Glaucoma primario de ángulo abierto

---

<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>M</b>	Media
<b>MHC-II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MLI</b>	Membrana limitante interna
<b>MMSE</b>	Mini Mental State Examination
<b>N</b>	Número de pacientes
<b>NGL</b>	Núcleo geniculado lateral
<b>OCT</b>	Tomografía de Coherencia Óptica
<b>OCTA</b>	Angiografía con Tomografía de Coherencia Óptica
<b>pTau</b>	Proteína Tau fosforilada
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>SC</b>	Sensibilidad al contraste
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TDP</b>	Test digital de percepción
<b>ZAF</b>	Zona avascular foveal

---

# **1. RESUMEN / SUMMARY**



## 1. RESUMEN / SUMMARY

### 1.1 Resumen en español

#### **Detección precoz de demencia tipo Alzheimer mediante pruebas oftalmológicas psicofísicas y tomografía de coherencia óptica como pruebas complementarias de diagnóstico**

##### **Introducción**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una degeneración primaria, caracterizada por la afectación de las funciones cognitivas corticales, con un alto impacto a nivel funcional, un establecimiento lento y progresivo y por la aparición de depósitos de beta amiloide y los ovillos neurofibrilares.

La retina es una proyección embrionaria del diencefalo, y se consideran parte del sistema nervioso central. La degeneración producida en la retina y en el nervio óptico en la EA puede originarse por vía retrógrada desde la corteza visual o por vía directa desde la propia retina causada por los depósitos. Estos cambios anatómicos pueden ser detectados con técnicas de diagnóstico oftalmológicas que posibiliten el seguimiento de los cambios según progresa la neurodegeneración.

##### **Objetivos**

Detectar los cambios que se producen en la retina, así como los cambios funcionales que se originan secundariamente, mediante pruebas psicofísicas oftalmológicas no invasivas y tomografía de coherencia óptica, en dos poblaciones de pacientes con EA, diferenciadas por el grado de evolución de la patología; comparando los resultados con una población control.

##### **Material y métodos**

Se realizó un estudio con pacientes con EA comparándolos con sujetos sanos pareados por edad. Se incluyeron 39 pacientes con EA leve, 21 pacientes con EA moderada y 40 controles. Tanto los pacientes como los controles estaban sanos oftalmológicamente.

Se analizaron los valores de agudeza visual, sensibilidad al contraste, test de percepción del color, test digital de percepción, medida de la oxihemoglobina de nervio óptico, OCT, OCTA y medición del espesor de la coroides.

Se realizó el análisis de la retina de ratones transgénicos de Alzheimer (3xTgAD) de 16 meses, mediante técnicas de inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-Iba-1 y anti-OX-6. En el análisis de la retina se realizó el estudio morfológico de la microglía y se analizó el número de células de microglía y el tamaño de su soma.

## **Resultados**

Se observó una disminución significativa de la agudeza visual, la sensibilidad al contraste, la percepción del color y la integración visual en los pacientes con EA leve. Sin embargo, esta alteración, cuando la enfermedad está en estadios de EA moderada, no empeoró respecto a la EA leve, manteniéndose estable la pérdida respecto a los controles.

El espesor macular en los pacientes con EA leve mostró un adelgazamiento significativo en la región central, sin embargo, en los pacientes con EA moderada en el área macular se encontró un engrosamiento en el área central macular.

El análisis macular por capas muestra adelgazamientos significativos en la capa de fibras nerviosas de la retina, la capa de células ganglionares y la capa plexiforme externa; por el contrario, la capa nuclear externa mostró engrosamientos significativos.

El espesor peripapilar en la EA leve no mostró cambios significativos, sin embargo, en la EA moderada había un adelgazamiento superonasal e inferotemporal significativo respecto a los controles. La coroides de los pacientes con EA leve mostró un adelgazamiento significativo subfoveal y en los sectores nasal e inferior. No se encontraron diferencias en la zona avascular foveal entre los pacientes con EA leve y controles. Los valores de la oxihemoglobina en la papila no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EA leve y los controles.

En las retinas de ratón transgénico 3xTgAD se encontraron signos de activación microglial comparado con los animales controles. Los animales transgénicos presentaron un aumento del número de células, engrosamiento del soma, retracción de sus prolongaciones y migración de las células dentro de la misma capa y entre capas. Esta reactividad glial dio como consecuencia una alteración del plexo microglial en la capa plexiforme externa y en el complejo de capas internas. En las retinas de ratón 3xTgAD

había agrupaciones circulares de microglía, con reorientación y polarización de sus prolongaciones.

## Conclusiones

En esta tesis doctoral, se ha estudiado la implicación de la vía visual en la demencia tipo Alzheimer. Se ha trabajado en pacientes con EA leve y EA moderada analizando tanto métodos psicofísicos oftalmológicos como pruebas estructurales. También se ha empleado para el análisis de la población microglial de la retina un modelo experimental de ratón transgénico con EA. A la vista de los resultados, concluimos que:

- 1.** La agudeza visual de los pacientes con EA está disminuida respecto a los controles. La bajada de agudeza visual se da en estadios tempranos de la enfermedad y se mantiene estable en la EA en el estadio moderado.
- 2.** La sensibilidad al contraste en los pacientes con EA sufre una bajada en todas las frecuencias espaciales cuando debuta la enfermedad. Esta bajada es mayor cuanto mayor es la frecuencia espacial examinada. Cuando la EA evoluciona al estadio moderado, la sensibilidad al contraste se mantiene estable.
- 3.** Los pacientes con EA presentan una peor percepción cromática. Se ha encontrado una alteración inespecífica tanto en el eje tritán, como en el eje deután. Cuando la EA evoluciona al estadio moderado los pacientes cometen un mayor número de errores.
- 4.** El test digital de percepción muestra una peor integración visual en los pacientes con EA cuando debuta la neurodegeneración. Esta alteración se mantiene estable cuando avanza la patología al estadio moderado.
- 5.** El espesor total de la mácula sufre un adelgazamiento cuando la EA está en estadio leve. Cuando la enfermedad progresa al estadio moderado se encuentran engrosamientos en la región central.
- 6.** En los pacientes con EA leve existe un adelgazamiento en la mácula en las capas retinianas capa de fibras nerviosa de la retina, capa de células ganglionares, capas

plexiformes y epitelio pigmentario de la retina, mientras que en las capas nucleares, por el contrario, existe un engrosamiento.

**7.** En los pacientes con EA leve, en el espesor peripapilar de la capa de fibras nerviosas de la retina no hay cambios significativos, mientras que, en la EA moderada existe un adelgazamiento significativo en los sectores superonasal e inferotemporal.

**8.** Los pacientes con EA leve presentan una disminución de la coroides circunscrita a la coroides subfoveal, nasal e inferior.

**9.** La zona avascular foveal en los pacientes con EA leve no existen cambios significativos.

**10.** Los valores de la oxihemoglobina de la papila en pacientes con EA leve no tienen cambios significativos.

**11.** El mejor valor predictivo lo muestran la medida del espesor coroideo, en nasal e inferior, y todas las frecuencias de la sensibilidad al contraste, siendo mejor cuanto más alta es la frecuencia examinada.

**12.** Todas las pruebas psicofísicas se correlacionan con la puntuación de MMSE.

**13.** Los cambios en el grosor de la capa de fibras peripapilar se correlacionan mejor con el avance de la enfermedad, dado por la puntuación del MMSE.

**14.** La mejor correlación entre la sensibilidad al contraste y la OCT se encuentra en el área macular.

**15.** En las retinas de ratón transgénico de EA existen signos de activación microglial. Los animales transgénicos presentan un aumento del número de células, engrosamiento del soma, retracción de sus prolongaciones y movimientos en la misma capa y entre capas. Esta reactividad glial da como consecuencia una alteración del plexo microglial en los ratones transgénicos de EA.

---

**16.** En las retinas de ratón transgénico de EA hay agrupaciones circulares de microglía, con reorientación y polarización de sus prolongaciones hacia el interior del círculo, posiblemente como consecuencia a los acúmulos proteicos típicos de esta neurodegeneración.

**17.** Las alteraciones morfológicas observadas en las retinas de pacientes con EA podrían estar causadas por una gliosis reactiva debida a la patología asociada a los depósitos característicos de esta neurodegeneración.



## 1.2 Resumen en inglés

### **Early detection of Alzheimer's dementia with ophthalmological psychophysical tests and optical coherence tomography as complementary tests**

#### **Introduction**

Alzheimer's disease (AD) is a primary degenerative disease that establishes itself slowly and progressively, involves the appearance of amyloid beta deposits and neurofibrillary tangles and affects cortical cognitive functions in ways that strongly reduce level of functioning.

AD can cause degeneration in the retina and optic nerve either directly as a result of amyloid beta deposits or secondarily as a result of degradation of the visual cortex. This raises the possibility that tracking ophthalmologic changes in the retina can be used to assess neurodegeneration in AD.

#### **Aim**

To detect retinal changes and associated functional changes in two groups of AD patients with mild and moderate disease and in a group of healthy controls using non-invasive psychophysical ophthalmological tests and optical coherence tomography.

#### **Material and methods**

The study included 39 patients with mild AD, 21 patients with moderate AD and 40 age-matched healthy controls. Both patients and controls were healthy ophthalmologically. In all individuals, visual acuity, contrast sensitivity, color perception, digital perception, optic nerve oxyhemoglobin, and choroidal thickness were measured. In addition, optical coherence tomography (OCT) and OCT angiography were applied.

To gain additional insights to complement the human studies, we analyzed the retinas of 16-month-old *3xTgAD* transgenic mice, which are used as an animal model of AD. Whole mount retinas were stained with antibodies against Iba-1 and OX-6. The morphology, number and soma size of microglia in the retina were analyzed.

#### **Results**

Visual acuity, contrast sensitivity, color perception and visual integration were significantly lower in AD patients than in healthy controls. These parameters did not differ significantly between patients with mild and moderate AD. Compared to healthy controls, patients with mild AD showed significant macular thinning in the central region, while those with moderate AD showed macular thickening in the central region. Analysis of macular layers revealed significant thinning of the retinal nerve fiber layer, ganglion cell layer and outer plexiform layer in AD patients relative to controls. Conversely, patients showed significant thickening of the outer nuclear layer.

Mild AD was associated with similar peripapillary thickness, foveal avascular zone characteristics and papillary oxyhemoglobin levels as in controls. However, mild AD was associated with significant thinning of the subfovea and of the nasal and inferior sectors of the choroid. Patients with moderate disease showed significant superonasal and inferotemporal peripapillary thinning.

Retinas from *3xTgAD* transgenic mice showed signs of microglial activation relative to retinas from wild-type animals: greater number of microglia, thickening of microglial soma, retraction of microglial processes and migration of microglia within and between layers. This activation was associated with alterations in the microglial plexus in the external plexiform layer and in the complex of internal layers. Retinas from *3xTgAD* mice showed circular groups of microglia that reoriented and polarized their processes differently than in control retinas.

## Conclusions

In this doctoral thesis, involvement of visual pathway in AD was studied. Patients with mild or moderate AD were analyzed using psychophysical ophthalmological methods and structural tests. To begin to examine cells and processes involved in AD-associated retinal degradation, we analyzed retina microglia in a mouse model of AD. Our data lead us to the following conclusions:

1. Patients with AD show lower visual acuity than healthy controls. Loss of visual acuity occurs in early stages of AD and remains stable as the disease progresses to moderate severity.
2. Patients with AD show lower contrast sensitivity at all spatial frequencies in early stages of the disease, with greater loss of contrast sensitivity at higher spatial

frequencies. Loss of contrast sensitivity remains stable as the disease progresses to moderate severity.

- 3.** Patients with AD have lower chromatic perception than controls, which is associated with nonspecific alteration of the tritan and deutan axes. Loss of perception increases as the disease progresses to moderate severity.
- 4.** Patients with mild AD perform worse on the digital perception test than controls, indicating worse visual integration. This loss of integration remains stable as disease progresses to moderate severity.
- 5.** Mild AD is associated with macular thinning, while moderate AD is associated with thickening of the central region of the macula.
- 6.** Mild AD is associated with thinning of the macula in several retinal layers (RNFL, GCL, IPL, OPL and RPE), but with thickening of the macula in some other retinal layers (INL and ONL).
- 7.** Mild AD is associated with significant changes in the peripapillary thickness of the RNFL, while moderate AD is associated with significant thinning in the superonasal and inferotemporal sectors.
- 8.** Mild AD is associated with a thinning of the subfoveal, nasal and inferior choroids.
- 9.** The foveal avascular zone in patients with mild AD does not show significant differences from the corresponding zone in healthy controls.
- 10.** Papillary oxyhemoglobin levels are similar between patients with mild AD and healthy controls.
- 11.** The presence of mild or moderate AD is best predicted based on nasal and inferior choroidal thickness, or based on contrast sensitivity at any frequencies (though higher frequencies are better).
- 12.** Results on all psychophysical ophthalmological tests correlate with the Mini Mental State Examination (MMSE) score.
- 13.** In OCT analysis, changes in the thickness of the peripapillary fiber layer correlate better than macular changes with AD progression based on MMSE score.
- 14.** Contrast sensitivity and OCT results correlate best in the macular area.

- 15.** Retinas from a mouse model of AD show signs of microglial activation: increased number of microglia, thickening of their soma, retraction of their extensions, and their movements within and between layers. This glial reactivity alters the microglial plexus.
- 16.** Retinas from a mouse model of AD contain circular microglia clusters that show reorientation and polarization of their processes towards the interior of the circle. This may be a consequence of AD-associated protein aggregation.
- 17.** Reactive gliosis caused by AD-associated protein aggregation may trigger morphological changes in the retinas of AD patients.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2. INTRODUCCIÓN

La demencia es una enfermedad neurodegenerativa que presenta un síndrome clínico de etiología inespecífica. No forma parte del envejecimiento normal y su existencia implica una pérdida irreversible de las capacidades intelectuales, también conocida como función cognitiva.

Esta enfermedad produce cambios fisiopatológicos en el sistema nervioso que se traducen en patrones neuropsicológicos que se pueden identificar. En el cerebro estos cambios no afectan por igual a todas las regiones y pueden ser objetivados con técnicas de neuroimagen.

Actualmente, el diagnóstico definitivo *in vivo* no se puede realizar y se basa en el diagnóstico diferencial mediante observaciones clínicas o con técnicas de imagen. El diagnóstico solo puede ser confirmado con alta exactitud en el examen *post mortem* mediante una autopsia <sup>1,2</sup>.

El diagnóstico precoz del proceso no solo es importante por la posibilidad de iniciar un tratamiento con inhibidores de la acetilcolinoesterasa y terapias de rehabilitación cognitivas, sino que será la base para enlentecer el proceso degenerativo <sup>3</sup>.

### 2.1 Envejecimiento

En los países desarrollados, debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 65 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad, en casi todos los países.

Hemos pasado de una sociedad a principios del siglo XX en la cual, sólo algunos de sus miembros superaban los 65 años, a una en la que lo raro es no superarlo. El envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y su seguridad <sup>4</sup>.

Se denomina envejecimiento al proceso de cambios morfo-funcionales que se producen en el ser vivo en relación al paso del tiempo. Dicho proceso de envejecimiento puede ser contemplado desde dos perspectivas principales, la referida a los cambios fisiológicos o esperados para todos los individuos independientemente de sus experiencias vitales, o la referida a los cambios patológicos, propios de cada individuo y relacionados con las alteraciones del equilibrio orgánico <sup>5</sup>.

Se estima que únicamente entre el 20-25% de la variabilidad en la edad de fallecimiento vendrá determinado por los factores genéticos, de los cuales unos serán factores de supervivencia mientras que otros serán factores predisponentes para el padecimiento de ciertas enfermedades crónicas <sup>6</sup>.

Los determinantes socioeconómicos ejercen una gran influencia sobre el envejecimiento. La esperanza de vida al nacer llega a ser el doble en las sociedades ricas respecto a los países más pobres <sup>7</sup>.

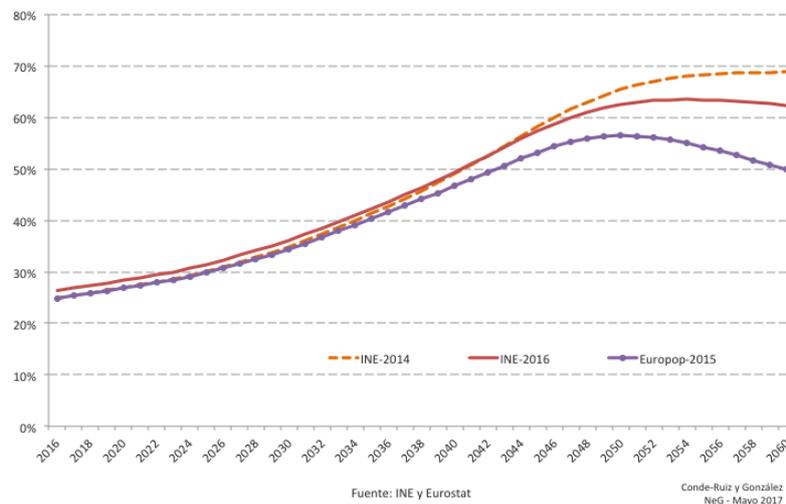
Otro factor con gran relevancia es el referido a los hábitos de vida. Se consideran hábitos con influencia negativa para el envejecimiento la vida sedentaria, dieta no equilibrada, obesidad, consumo de drogas, falta de relaciones sociales, estrés, etc.

Hay que señalar la diferencia de longevidad entre las mujeres y hombres, siendo para las primeras la esperanza de vida seis años superior a la de los hombres <sup>8</sup>. En cuanto a esta diferencia, muchas han sido las teorías que tratan de explicarlo, siendo probablemente las más acertadas las que se basan en la diferenciación genética y en la protección estrogénica de las mujeres antes de la menopausia <sup>9</sup>.

Según los últimos estudios del INE publicados en 2018, la esperanza de vida al nacimiento en España alcanzó unos valores de 80,37 años en los hombres y de 85,73 en las mujeres. Según estas proyecciones, la esperanza de vida al nacimiento, alcanzaría los 83,2 años en los hombres y los 87,7 en las mujeres en el año 2031, lo que supone una ganancia respecto a los valores actuales de 2,83 y de 1,97 años respectivamente. Estos valores serían de 88,6 años de esperanza de vida al nacimiento para los hombres en el año 2065 y de 91,6 años para las mujeres en el año 2065 <sup>8</sup>.

El porcentaje de población de 65 años y más, que actualmente se sitúa en el 18,2% de la población, pasaría a ser del 24,9% dentro de quince años (en 2029) y del 38,7% dentro de cincuenta años (en 2064) <sup>8</sup>.

De mantenerse las tendencias demográficas actuales, la tasa de dependencia (entendida como el cociente, en tanto por ciento, entre la población menor de 16 años o mayor de 64 y la población de 16 a 64 años) se elevaría más de siete puntos, desde el 52,1% actual hasta el 59,2% en 2029. Y en 2064 alcanzaría el 95,6% <sup>8</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Previsión de tasa de dependencia a los 67 años en España.** Fuente Instituto Nacional de Estadística (INE). Tomada de <https://noticierouniversal.com/actualidad-economica/la-importancia-de-los-escenarios-demograficos-ine-2016-vs-ine-2014/>

Esta nueva sociedad, nos trae como consecuencias una serie de patologías que en el siglo XIX no se daban o se daban en un porcentaje muy bajo. Son todas las patologías relacionadas con el deterioro progresivo o escalonado de las funciones orgánicas, entre estas patologías se encuentran las demencias.

Si tenemos en cuenta las necesidades sanitarias, sociales y económicas, siempre crecientes, de este grupo de población <sup>10</sup>, esta situación demográfica se convertirá en uno de los mayores retos que deberán afrontar las sociedades occidentales en un futuro cercano <sup>11</sup>.

### 2.1.1 Teorías del envejecimiento

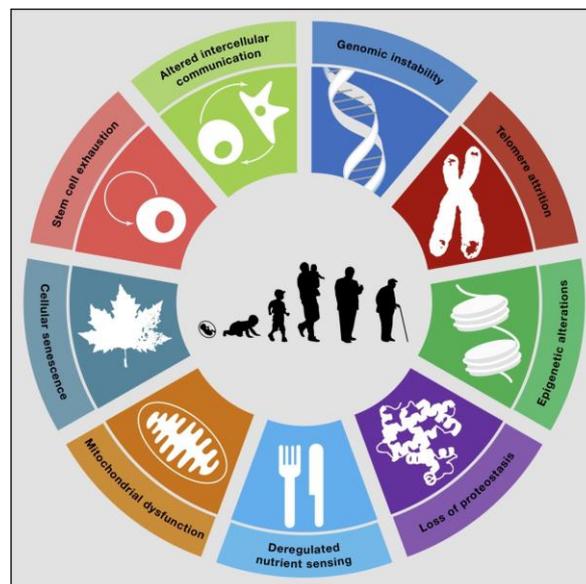
En 1985, Birren y Zarit establecieron la definición del envejecimiento biológico como el proceso de cambio del organismo que con el tiempo disminuye la probabilidad de

supervivencia y reduce su capacidad fisiológica de autorregulación, de regulación y de adaptación a las demandas ambientales <sup>12</sup>.

Nuestro organismo es un sistema dinámico, en estado de degradación y reparación permanente. El envejecimiento corresponde a una ruptura de ese equilibrio, cuando la acumulación de daños sobrepasa la capacidad de reparación. En la ruptura del equilibrio dinámico, intervienen factores muy variados: influencias genéticas, comportamentales y ambientales que pueden afectar de manera positiva o negativa en cada lado de la balanza.

El envejecimiento ocurre a todos los niveles; a nivel molecular, nivel celular y nivel de los órganos. Muchas teorías y clasificaciones han sido propuestas para explicar el envejecimiento humano, aunque para explicar el proceso de envejecimiento sería conveniente combinar varias.

En 2013, una revisión llamada “*The hallmarks of aging*”<sup>13</sup>, analizó ampliamente las actuales teorías del envejecimiento describiendo nueve características: la inestabilidad genómica, el desgaste telomérico, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis, la disregulación de la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de células madre, y la comunicación intercelular alterada (Figura 2).



**Figura 2. Teorías del envejecimiento.** El esquema enumera las nueve características que se describen en la revisión de López-Otin et al: la inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, nutrientes de detección desregulado, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de células madre, y la comunicación intercelular alterada. Tomada de López-Otin, 2013 <sup>13</sup>

- **Inestabilidad genómica:** Un denominador común de envejecimiento es la acumulación de daños genéticos a lo largo de la vida <sup>14</sup>. La integridad y la estabilidad del ADN son desafiados continuamente por agentes exógenos físicos, químicos y biológicos, así como por amenazas endógenas, incluyendo errores de replicación de ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) <sup>15</sup>. Las lesiones genéticas derivadas de daños extrínsecos o intrínsecos son muy diversas e incluyen mutaciones puntuales, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, el acortamiento de los telómeros, y la interrupción génica causada por la integración de los virus o transposones <sup>13</sup>.
- **Desgaste telomérico:** Existe una relación entre la edad de un individuo y la capacidad de división de sus células. Este fenómeno de senescencia replicativa celular se identificó en los años 1960 y se denomina "límite de Hayflick" en relación a su descubridor <sup>16</sup>.

A partir de los años 80, este fenómeno se ha asociado a la disminución de la longitud de los telómeros, que son las secuencias cortas que se encuentran en los extremos de los cromosomas para permitir su replicación completa y evitar que se fusionen entre sí. En efecto, los telómeros se recortan en cada división celular porque el complejo ADN polimerasa no puede replicar completamente los extremos de los cromosomas <sup>17</sup>. Por ello, la longitud de los telómeros puede considerarse como un marcador de la historia proliferativa de la célula: los telómeros de las células obtenidas en personas de edad avanzada son más cortos que los medidos en personas más jóvenes <sup>18</sup>.

Cuando los telómeros alcanzan una talla crítica, se activa una respuesta de daño del ADN, dependiente del gen supresor tumoral denominado p53, que desencadena la muerte celular por apoptosis <sup>19</sup>. En general, este mecanismo dependiente de p53 se activa cuando se produce cualquier tipo de lesión oxidativa del ADN, o por modificaciones de la cromatina que alteran su estructura (por ejemplo, por efecto de un fármaco) o también cuando se producen modificaciones oncogénicas. Para evitar la acumulación de daños en el ADN, la célula posee una batería de enzimas responsables del mantenimiento y la reparación del ADN, así como una telomerasa encargada de restituir la longitud de los telómeros. Sin

embargo, la telomerasa se reprime en tejidos somáticos, mientras que los mecanismos de reparación, como el resto de los componentes celulares, acumulan también daños que los inactivan de forma progresiva.

Desde este punto de vista, la senescencia y la muerte celular constituye un mecanismo de defensa, evitando que células que acumulan daños en su ADN puedan proliferar, dado que las células dañadas pueden convertirse en tumorogénicas y aumentar el riesgo de cáncer <sup>13</sup>.

- **Alteraciones epigenéticas:** Una variedad de alteraciones epigenéticas afecta a todas las células y tejidos durante toda la vida. Los cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de las histonas, y la remodelación de la cromatina <sup>20</sup>.
- **Pérdida de proteostasis:** El envejecimiento y algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento están relacionados con la alteración de la homeostasis de las proteínas o proteostasis <sup>21</sup>. La proteostasis implica mecanismos para la estabilización de proteínas correctamente plegadas (más prominentemente, la familia de proteínas de shock térmico) y los mecanismos de la degradación de proteínas por el proteasoma o el lisosoma <sup>22-24</sup>.
- **Disregulación de la detección de nutrientes:** La restricción calórica aumenta la vida útil en todas las especies eucariotas investigadas, incluyendo primates no humanos <sup>25-27</sup>. La evidencia actual disponible apoya fuertemente la idea de que la señalización anabólica acelera el envejecimiento y la disminución de la señalización de nutrientes extiende la longevidad <sup>26</sup>. Además, se ha comprobado que una manipulación farmacológica que imita un estado de disponibilidad limitada de nutrientes, tales como rapamicina, puede extender la longevidad en ratones <sup>28</sup>.
- **Disfunción mitocondrial:** Como en las células y los organismos de edad, la eficacia de la cadena respiratoria tiende a disminuir, aumenta así las fugas de electrones y la reducción de la generación de ATP <sup>29</sup>. La teoría mitocondrial de los radicales libres en el proceso de envejecimiento propone que: la disfunción mitocondrial progresiva que se produce con el envejecimiento da como resultado un aumento de la producción de ROS, que a su vez provoca un mayor deterioro

mitocondrial y daño celular global<sup>30</sup>. Múltiples datos apoyan el papel de ROS en el envejecimiento, obligando a una intensa re-evaluación de la teoría de los radicales libres del envejecimiento mitocondrial<sup>31</sup>.

- **Senescencia celular:** La senectud celular se puede definir como una detención estable del ciclo celular acoplado a cambios fenotípicos estereotipados<sup>32-34</sup>. Este fenómeno fue descrito originalmente por Hayflick en pases seriados de fibroblastos humanos en cultivo<sup>16</sup>. Hoy en día, sabemos que la senescencia observada por Hayflick es causada por la reducción de los telómeros<sup>35</sup>, pero habría otros estímulos asociados con el envejecimiento que desencadenarían la senescencia independientemente de este proceso telomérico. En particular, el daño en ADN no-telomérico y desrepresión del locus INK4/ARF, los cuales se producen progresivamente con el envejecimiento cronológico, también son capaces de inducir la senescencia<sup>33</sup>. La acumulación de células senescentes en tejidos envejecidos se ha deducido a menudo utilizando marcadores indirectos tales como marcadores de daño en el ADN.
- **Agotamiento de células madre:** La disminución en el potencial de regeneración de tejidos es una de las características más evidentes del envejecimiento. El agotamiento de células madre se desarrolla como consecuencia de la integración de múltiples tipos de daños asociados con el envejecimiento y probablemente constituye uno de los responsables últimos del envejecimiento de los tejidos y el del organismo<sup>13</sup>. Prometedores estudios recientes sugieren que el rejuvenecimiento de células madre puede revertir el fenotipo de envejecimiento<sup>36</sup>.
- **Comunicación intercelular alterada:** Más allá de las alteraciones de células autónomas, el envejecimiento también implica cambios a nivel de la comunicación intercelular, ya sea endocrino, neuroendocrino o neuronal<sup>36-39</sup>. Por lo tanto, la señalización neurohormonal tiende a ser desregulada en el envejecimiento a medida que aumentan las reacciones inflamatorias, disminuye la inmunovigilancia contra los patógenos y las células premalignas junto con los cambios en la composición del entorno peri-y extracelular.

Por otro lado, es evidente que existen factores ambientales y comportamentales que pueden colaborar en el proceso de degradación o al contrario reforzar los mecanismos de defensa:

- El **tabaco** disminuye la concentración de antioxidantes y aumenta los radicales libres de oxígeno. Los fumadores pueden presentar ciertas manifestaciones de envejecimiento prematuro y un incremento en la frecuencia de patologías asociadas al envejecimiento, como las cataratas y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).
- La exposición repetida a la luz **UV** puede provocar un envejecimiento prematuro de la piel y la retina por las mismas razones.
- La **restricción calórica**, iniciada en cualquier momento de la vida, mejora la mayor parte de los parámetros biológicos e incrementa la longevidad; sin embargo, si la restricción calórica es extrema, como ocurre en la anorexia, se produce una disminución de la fertilidad, lo que evidencia de nuevo la relación entre envejecimiento, equilibrio energético y reproducción.
- Una **dieta equilibrada**, rica en fibras y vegetales, que presentan antioxidantes naturales, produce también un efecto positivo sobre el mantenimiento de las funciones celulares.

### 2.1.2 Envejecimiento cerebral

Además de la preocupación por el envejecimiento global de la población, se percibe en los momentos actuales, un interés particular por los problemas derivados del envejecimiento cerebral. Somos cada vez más conscientes de que en el envejecimiento del cerebro está la clave para la conservación de la identidad y autonomía de las personas.

En principio, el sistema nervioso debe ser tan susceptible al paso del tiempo como cualquier otro órgano o sistema, y aún más, si tenemos en cuenta que los principales elementos celulares del tejido nervioso son células postmitóticas y que su capacidad de regeneración, aunque presente, es limitada.

Tanto en el ser humano como en los animales de laboratorio, se aprecia una disminución de las funciones cognitivas en edades avanzadas, sobre todo aquellas relacionadas con las capacidades ejecutivas, los procesos de atención y el aprendizaje y almacenamiento de informaciones nuevas. No obstante, las investigaciones más recientes han puesto de manifiesto que el envejecimiento no afecta en su totalidad al cerebro, sino a partes discretas del lóbulo frontal, aquellas que participan en las habilidades ejecutivas. Así como que el cerebro de las personas ancianas es capaz de utilizar estrategias funcionales compensatorias de posibles deficiencias funcionales y/o estructurales. Estos fenómenos plásticos observados en la ancianidad pueden disminuir o enmascarar la expresión clínica del envejecimiento cerebral <sup>40</sup>.

### **2.1.2.1 Cambios fisiológicos cerebrales**

Las investigaciones realizadas hace años sobre los cambios anatómicos cerebrales parecían demostrar la existencia de una marcada reducción del volumen cerebral debido a una muerte neuronal <sup>41</sup>. Sin embargo, los estudios más recientes, que controlan con mayor rigor los factores de confusión, indican que los cambios asociados con la edad no afectan al cerebro globalmente, sino que son altamente selectivos y se limitan a la corteza prefrontal dorsolateral y, en menor medida, a algunas subdivisiones del lóbulo temporal medial, como el subiculum y la circunvolución dentada <sup>42</sup>. La mayor aportación a esta pérdida de volumen es la disminución de la densidad sináptica <sup>43</sup> y del volumen de la sustancia blanca de los lóbulos frontales <sup>44</sup>.

Se cree que la disminución de la capacidad cognitiva asociada a la edad es la consecuencia de una alteración selectiva de los circuitos cortico-corticales, que comunican las áreas de asociación frontal y temporal y los circuitos cortico-estriatales <sup>42,44</sup>.

Los cambios microscópicos relacionados con la edad incluyen: la atrofia regional de neuronas <sup>44</sup>, la distrofia axonal cortical <sup>45</sup>, la lipofuscinosis <sup>46</sup>, la astrogliosis <sup>41</sup>, la degeneración neurofibrilar y las placas seniles <sup>47,48</sup>, así como los cambios focales diseminados en la sustancia blanca de origen vascular o distrófico <sup>49</sup>. Muchas de estas alteraciones, no pueden considerarse, sin embargo, específicas del envejecimiento. Por ejemplo, existen pruebas de que la atrofia cortical indica, en la mayoría de los casos, una enfermedad cerebral subyacente de tipo degenerativo <sup>50</sup> o vascular <sup>51</sup>. Los cambios de la sustancia blanca periventricular (leucariosis o leucoencefalopatía subcortical) suceden en pacientes con factores de riesgo vascular y, por tanto, se cree que reflejan una

insuficiencia de los vasos profundos del cerebro, secundaria a una arteriopatía degenerativa de origen hipertensivo, diabético o multifactorial <sup>52</sup>. Quizás, el único cambio cerebral atribuible al paso del tiempo son los depósitos de lipofucsina, que indica estrés oxidativo y peroxidación lipídica <sup>46</sup> así como pérdida sináptica local <sup>42,44</sup>.

En el cerebro se produce una reducción del volumen ocupado por los vasos sanguíneos, concretamente disminuye la superficie de los capilares, que son el lugar de intercambio de gases de la respiración y moléculas para el trofismo neuronal <sup>53</sup>. La barrera hematoencefálica es el lugar selectivo para el intercambio de nutrientes entre la sangre y el parénquima cerebral. Con el envejecimiento los sistemas de transporte molecular que operan a este nivel se ven reducidos, con las consecuencias metabólicas que esto tiene para el funcionamiento normal del sistema nervioso <sup>54</sup>.

Uno de los aspectos menos conocidos es el papel que durante el envejecimiento cerebral juegan las células gliales <sup>55</sup>. La neuroglia o glía está formada por un grupo de células que forman parte del tejido nervioso, pero que a diferencia de las neuronas que están orientadas, fundamentalmente, a los procesos de neurotransmisión (síntesis, transporte y liberación de neurotransmisores y la consiguiente generación de impulsos nerviosos), las células de la glía actúan de forma fundamental en el mantenimiento de la homeóstasis de la matriz extracelular del tejido nervioso (astrocitos), mantenimiento de correcto estado inmune (microglía), formación de mielina en el SNC (oligodendrocitos) y formación y circulación del líquido cefalorraquídeo (células de los plexos coroideos y ependimocitos). Se ha demostrado, tanto en el cerebro de animales de experimentación como en humanos, que con el envejecimiento se produce una proliferación de astrocitos (gliosis reactiva) para paliar los efectos de la reducción de las neuronas que van degenerando a lo largo de la vida, de tal forma que aunque el número de neuronas se reduce durante el ciclo vital, el número de células de glía se incrementa como efecto compensatorio <sup>56</sup>.

### **2.1.2.2 Cambios funcionales cognitivos**

Los cambios neuro-morfológicos asociados al envejecimiento provocan manifestaciones cognitivas. La cognición es el conjunto de actividades que tienen su base en el cerebro y que nos permiten tener constancia de nosotros mismos, de los demás y de nuestro entorno <sup>57</sup>. Una de las características más destacadas del envejecimiento cognitivo como expresión del envejecimiento cerebral son las recurrentes quejas de las personas mayores de la pérdida de memoria.

El aprendizaje y la memoria tienen su inicio y base neurobiológica principal, aunque no exclusiva, en el hipocampo. El hipocampo está constituido por una serie de poblaciones neuronales que establecen circuitos sinápticos muy precisos y ordenados, los cuales tras procesar la información que les llega, la envían a la corteza cerebral para su almacenamiento y posterior utilización en forma de memoria a largo plazo <sup>58,59</sup>.

Los procesos de aprendizaje están basados en la plasticidad neuronal, cuya base neurofisiológica fundamental es la potenciación a largo plazo que se consigue por el incremento de los receptores AMPA para el glutamato y un aumento de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas postsinápticas del hipocampo <sup>60</sup>.

Durante el proceso de envejecimiento se puede producir una reducción en la capacidad de las neuronas para sintetizar los neurotransmisores que actúan en las sinapsis <sup>61</sup>. Los neurotransmisores más utilizados son: glutamato, GABA, acetilcolina y dopamina, y las alteraciones en los niveles homeostáticos de estos neurotransmisores, ocasionan diferentes patologías que se ven incrementadas en el envejecimiento <sup>62</sup>. Así, la reducción en los niveles de acetilcolina es una de las características más notables en la Enfermedad de Alzheimer (EA) y base del tratamiento actual de esta enfermedad <sup>63</sup>.

### **2.1.3 Envejecimiento ocular**

De igual medida que se producen cambios fisiológicos y funcionales en todo el organismo durante el proceso de envejecimiento, el ojo no se escapa de este fenómeno, sino que por el contrario lo reproduce de manera fidedigna. El envejecimiento origina importantes cambios en las estructuras oculares y en la función visual, hasta el punto de ser una de las más afectadas.

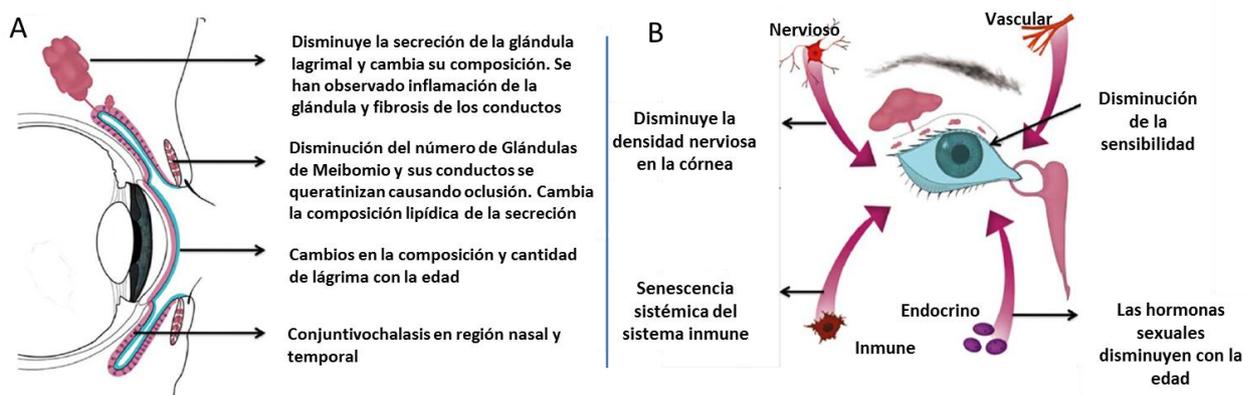
#### **2.1.3.1 Cambios fisiológicos oculares**

Con el paso de los años, el ojo, las estructuras para-oculares y los anejos van sufriendo cambios en su morfología y en su estructura. A estos cambios se le suman cambios funcionales que es lo que podemos considerar de forma genérica como “envejecimiento ocular”.

En la **órbita** y el tejido adyacente disminuye el tejido graso con preservación relativa de la almohadilla grasa nasal <sup>64</sup>. Esto favorece al hundimiento del globo ocular (enofthalmos).

Los **párpados** sufren un proceso de pérdida de las propiedades elásticas, con un aumento de laxitud palpebral <sup>65</sup> y tendencia hacia la versión, ya sea interna (entropion) o externa (ectropion).

En la **glándula lagrimal** existe una proliferación del tejido conjuntivo y una atrofia de los elementos glandulares que dan lugar a una disminución de la producción lagrimal, así como se produce una disminución del drenaje <sup>66</sup>. La patología lagrimal del anciano abarca situaciones que van desde el “ojo seco” hasta el lagrimeo continuo o epífora. La patología de ojo seco da lugar a una alteración de la película lagrimal con su correspondiente disconfort y disminución de agudeza visual (AV) (Figura 3).



**Figura 3. Cambios principales en la superficie ocular (A) y los componentes que integran la función (B).** Modificado de Gipson et al. 2013 <sup>67</sup>.

La **esclera** a causa del envejecimiento presenta placas hialinas, acúmulo de lípidos y pérdida del contenido acuoso, lo que provoca alteraciones biomecánicas en la esclera por un aumento de rigidez <sup>68,69</sup>.

Existen datos clínicos utilizando la tomografía de coherencia óptica (OCT), que indican una relación inversa entre la edad y el volumen de la **coroides** <sup>70</sup>. Estudios histopatológicos han demostrado una correlación negativa entre la edad y la densidad coriocapilar <sup>71</sup>.

La **conjuntiva**, en el proceso de envejecimiento, experimenta un descenso de la densidad de células dendríticas, así como una degeneración de las estructuras subepiteliales. Se produce un aumento de los microquistes conjuntivales que indican que la función de las células Globet está disminuyendo, ya que se ha comprobado que la población de éstas no sufre un descenso en su número <sup>72</sup>.

Refractivamente, con el envejecimiento, la **córnea** sufre un cambio en la queratometría produciéndose un astigmatismo en contra de la regla. Se produce una degeneración corneal con un depósito progresivo de material lipídico que provoca el gerontoxón o arco senil. Aparecen calcificaciones en la periferia de la membrana de Bowman y aumenta el espesor de la membrana de Descemet. La córnea se vuelve más rígida y edematosa con tendencia a la opacidad y se produce un descenso de la sensibilidad <sup>69,73</sup>. También se produce un descenso del número de células endoteliales en la córnea, siendo frecuente el desarrollo de una distrofia endotelial de Fuch. Esta pérdida endotelial provoca una disregulación de la homeostasis de la córnea causando una disminución de AV llegando incluso a la ceguera <sup>67,69</sup>.

La **mallá trabecular** cambia de forma en el proceso de envejecimiento pasando de una forma de cuña a una estructura más romboidal <sup>69,74</sup>. Las trabéculas se engrosan progresivamente y el examen ultraestructural muestra un cambio en la apariencia de los materiales extracelulares <sup>74</sup>. La gonioscopia muestra un incremento de la pigmentación en la mallá trabecular. Todo esto junto podría producir un aumento de la resistencia a la salida del humor acuoso, que podría precipitar la aparición de un glaucoma <sup>75</sup>.

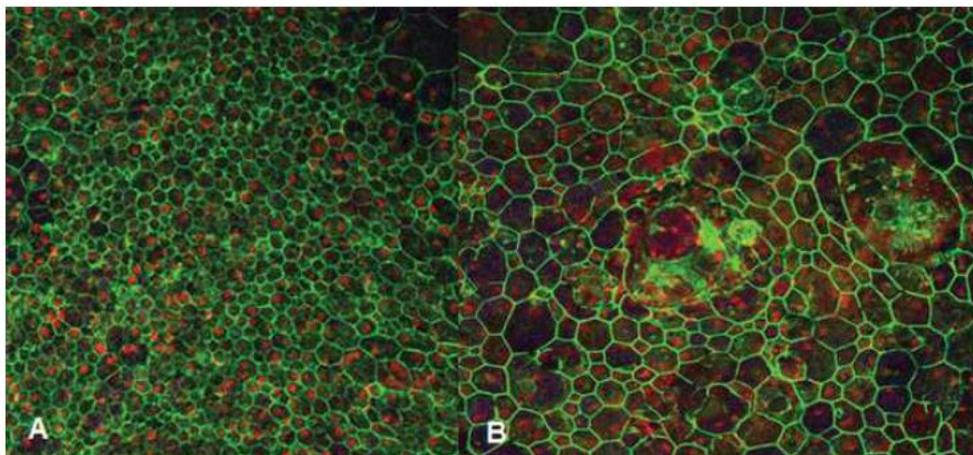
La **pupila** tiende a disminuir de tamaño y el **iris** es menos reactivo y existe más dificultad para la dilatación farmacológica de la pupila. En el envejecimiento se produce una pérdida de pigmento en el iris, que es la causa de la transiluminación de iris en la observación con lámpara de hendidura, especialmente en el margen pupilar.

Los cambios que se producen en el tamaño y el tono del **músculo ciliar**, junto con una pérdida de la elasticidad de la cápsula del cristalino y a un empaquetamiento de sus fibras, causan una disminución de la capacidad acomodativa provocando la presbicia <sup>76</sup>.

A medida que envejecemos, el **cristalino** tiende a absorber más luz azul (410nm) debido a la acumulación en él de pigmento amarillo, por la oxidación de las proteínas del cristalino <sup>69</sup>. Esto es lo que se denomina “ceguera al azul” en los procesos cataratogénicos.

En el **vítreo** se producen cambios en los componentes de las fibras de colágeno y del ácido hialurónico que causan cuerpos flotantes o flóculos vítreos, los cuales son condensaciones en el vítreo <sup>77</sup>. Con el envejecimiento, las uniones del vítreo a la retina se debilitan, dando así como resultado un desprendimiento del vítreo posterior. El espacio entre el vítreo y la retina se llena con vítreo licuado. Un desprendimiento posterior del vítreo puede dar lugar a la contracción de la base del vítreo, causando así la tracción sobre la retina periférica y, ocasionalmente, un desgarro retiniano <sup>69</sup>.

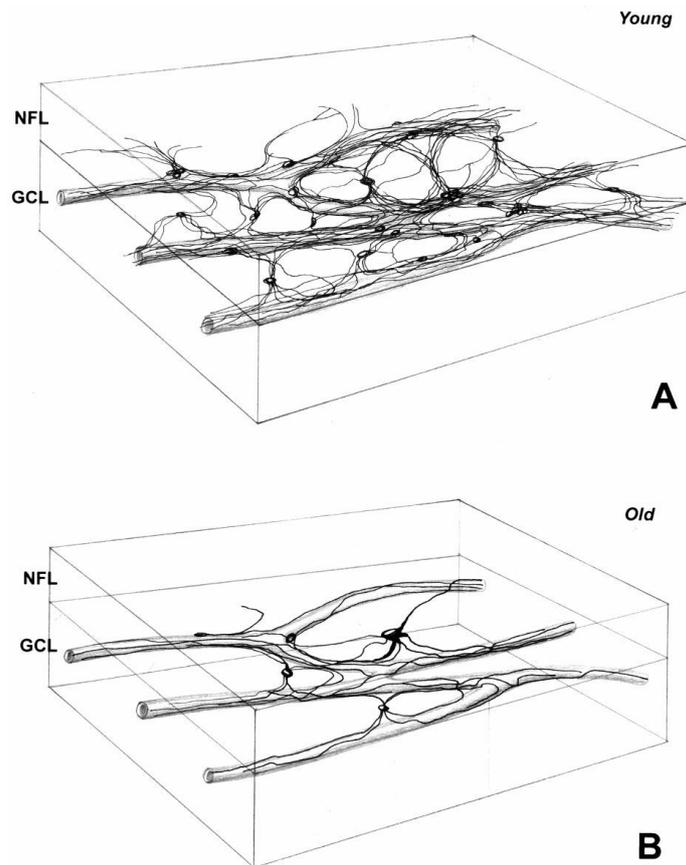
El **epitelio pigmentario de retina (EPR)**, que es vital para la integridad de los conos y de los bastones, muestra un aumento del pleomorfismo, disminución del número de sus células epiteliales en el polo posterior, disminución del contenido de melanina, incremento de la lipofucsina y disminución del volumen citoplasmático <sup>69,75,78</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Mosaico formado por el EPR en el área macular.** (A) Montaje plano de un paciente sin DMAE mostrando un patrón hexagonal compacto. (B) Montaje plano de un paciente pareado por edad con DMAE mostrando pleomorfismo y varios núcleos en cada célula.

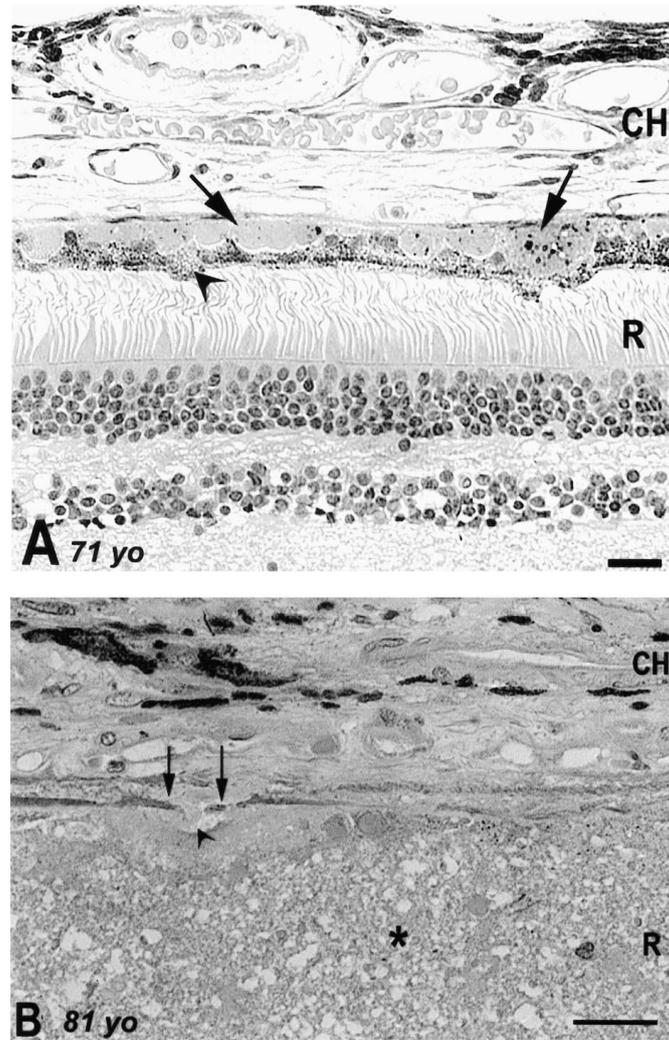
Montajes planos ex vivo de humano teñido con ZO1 y contraste con yoduro de propidio. La imagen fue tomada con filtros de excitación de 488 nm y filtros de emisión de 510. Tomada de Grossniklaus et al, 2013 <sup>69</sup>.

Con el envejecimiento también disminuye el **flujo sanguíneo** en la coroides y en la retina. Se produce una disminución estimada en un 20% de la microcirculación macular y de las células de la capa ganglionar <sup>79</sup>. Los **astrocitos** en el envejecimiento expresan una mayor inmunoreactividad de proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y más organelas citoplasmáticas y filamentos gliales. Se producen depósitos de lipofucsina y un descenso significativo del número de astrocitos en el plexo astrogliar en la capa de las células ganglionares (CCG) y en la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) <sup>78</sup> (Figura 5).



**Figura 5. Esquema tridimensional de las estructuras astrogiales en forma de panal en la capa de células ganglionares de (A) individuo joven y (B) individuo anciano. Se observa una disminución del número de astrocitos. Obtenido de Ramirez et al, 2001 <sup>78</sup>.**

La **membrana de Bruch** es la estructura que muestra más cambios en el envejecimiento con una aparición de acúmulos de residuos en la retina supraadyacente (Figura 6). Los depósitos de la membrana basal interna se sitúan sobre todo en el área macular y eventualmente se manifiestan como drusas <sup>75,78</sup>. Hay un aumento de grosor, alteraciones del colágeno y fibras elásticas y depósitos de materiales extraños en vesículas y cuerpos rodeando la membrana <sup>78</sup>.



**Figura 6. Epitelio pigmentario de la retina (EPR) y porción coroidea de ojos de donantes con pruebas histopatológicas de degeneración macular asociada a la edad (DMAE).** (A) Evidencia histopatológica de drusas (flecha) y de alteración del EPR (punta de flecha). (B) Interrupción de la membrana de Bruch (flecha), neovasos subretinianos (punta de flecha) y hemorragia (\*) (CH: coroides; R: retina; hematoxilina-eosina). Bar. 50 mm. Tomada de Ramírez et al, 2001 <sup>78</sup>.

Se han observado en el **nervio óptico**, a nivel de lámina cribosa, que los axones están inflamados y que hay una disminución en el número de axones del nervio óptico y aumento en el espesor del tejido <sup>69,80</sup>.

### **2.1.3.2 Cambios funcionales en la visión**

El envejecimiento normal reporta cambios en la funcionabilidad del sistema visual debido a que se produce una disminución de la transmisión de luz y un scattering dentro del ojo.

Con la edad se produce una disminución de la densidad de fotorreceptores en la retina, hay una menor eficacia en la fototransducción y la regeneración del fotopigmento. Disminuye la calidad de la transmisión y su procesamiento sináptico en la retina y a lo largo de toda la vía visual <sup>81</sup>.

Debido a todos estos cambios, la visión se ve afectada con el envejecimiento de varias maneras. La población mayor experimenta **cambios refractivos** significativos con la edad. Normalmente, se produce un cambio del astigmatismo contra la regla por el aplanamiento de la córnea, y el componente esférico se vuelve más hipertrópico debido al aumento de la rigidez de la esclerótica, a la miosis senil y a los cambios cristalinos propios del anciano, que hacen que esta lente pierda poder refractivo. La prevalencia del astigmatismo oblicuo y la anisometropía aumentan también con el envejecimiento <sup>82</sup>.

La **agudeza visual (AV)** es el parámetro que evalúa la capacidad del sistema visual para detectar y discriminar detalles de un objeto. El valor de agudeza visual será la inversa al tamaño del detalle más pequeño que el paciente puede distinguir.

La AV disminuye en la vejez por múltiples motivos, considerándose normal una visión de 0,8. En el envejecimiento, la disminución en la AV de cerca se puede deber a la presbicia o pérdida fisiológica de la acomodación por el menor tono del músculo ciliar con la edad. Así mismo, los cambios cristalinos pueden producir alteraciones en la AV, como la aparición de una miopía tardía que dificultara la visión lejana, causada por la rigidez del núcleo del cristalino que se produce en la catarata senil. Una persona con esclerosis nuclear temprana puede quejarse de deslumbramiento, especialmente en la conducción nocturna, debido a la dispersión de la luz. Al mismo tiempo, también necesitara más iluminación en el entorno que una persona más joven.

En el envejecimiento se altera la **sensibilidad al contraste (SC)**. Las células ganglionares de la retina parvo- y magnocelulares están localizadas en la CCG y dan lugar a dos vías visuales diferentes que identifican el color y el contraste en diferentes frecuencias espaciales <sup>83</sup>. Las células ganglionares parvocelulares son más pequeñas y más numerosas que otras células ganglionares de la retina y poseen campos receptores más pequeños y situados en la zona macular de la retina. Dan lugar a la vía visual parvocelular, que está especializada en la identificación de patrones y del color; y es más sensible a la baja frecuencia temporal y a la alta frecuencia espacial. La vía magnocelular se origina a partir de las células ganglionares magnocelulares de la retina, las cuales son más grandes y

numerosas, y tienen campos receptores mayores que son más sensibles a las frecuencias temporales altas y a las bajas frecuencias espaciales. Existe un tercer tipo de células ganglionares que son denominadas koniocelulares, que reciben información de los conos de onda corta y son sensibles a los tonos azul-amarillo <sup>83-85</sup>.

Los test de **SC** evalúan la capacidad del sistema visual para discriminar un objeto del fondo en el que se encuentra situado. Esto permite valorar la integración de la información de las células ganglionares de la retina (CGR) y su procesamiento cortical. La SC se mide mediante una curva umbral en la que se representan las diferentes frecuencias espaciales examinadas. Las frecuencias espaciales altas examinan la función de las células parvocelulares, mientras que, las frecuencias espaciales bajas representan el funcionamiento de las células magnocelulares.

La SC sufre pequeños cambios desde la infancia hasta los 65 años. En edades más avanzadas, muestra un declive más pronunciado sobre todo en las frecuencias espaciales medias y altas. Esta reducción de la SC se produce en parte por las opacidades en los medios, lo cual influye en una disminución en la percepción de la profundidad <sup>82,86</sup>.

Con el envejecimiento se produce disminución del **campo visual** normal por retracción y aumento de la mancha ciega, que se debe tener en cuenta a la hora de realizar campimetrías en pacientes sospechosos de glaucoma. También hay una reducción del número de conos en la fovea produciendo una disminución generalizada de la visión del color <sup>75</sup>.

Las personas mayores tienen dificultad para la **adaptación a la luz y a la oscuridad** y son incapaces de tolerar el resplandor <sup>75</sup>.

Con la edad suelen aparecer problemas **binoculares**, debido a que los cambios provocados por el envejecimiento afectan a los mecanismos neuromusculares y a las estructuras de los tejidos adyacentes al ojo. Estos pacientes, al no tener resto acomodativo, no pueden poner en juego la convergencia ligada a la acomodación y por lo tanto presentan una exoforia mayor en la visión cercana. Las desviaciones verticales son comunes en esta población. Así como son frecuentes los problemas de estereopsis <sup>87</sup>.

## 2.2 Demencia

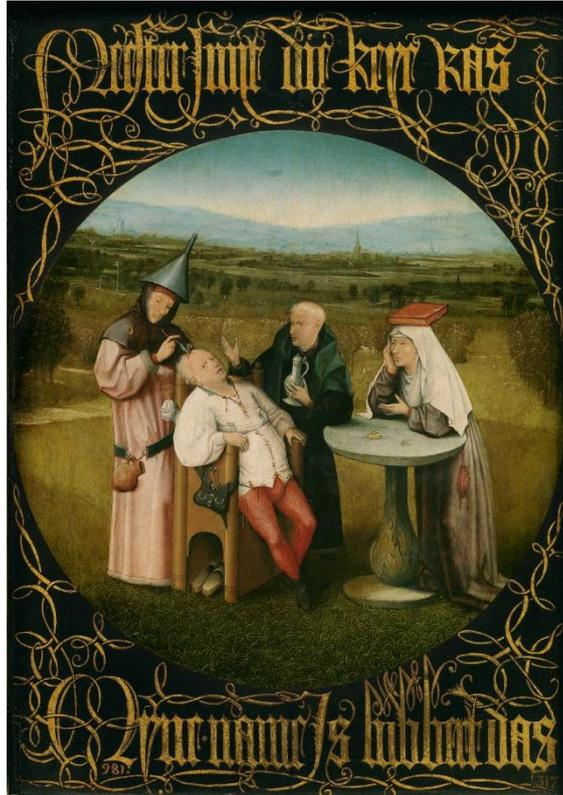
### 2.2.1 Historia de la demencia

La demencia se caracteriza por un deterioro cognitivo, funcional y comportamental, constituyendo una carga considerable en la sociedad. En el año 2015, en torno a 46,8 millones de personas sufrían demencia según el *World Alzheimer Report 2015*, y esa cifra se espera que se duplique cada 20 años. El coste global estimado de la demencia en 2015 ascendía a 818 billones de dólares <sup>88</sup>

La primera referencia a una deficiencia mental senil, se realizó en Grecia hacia el año 500 a.C. en la Ley de Solón. En la Grecia clásica la manía parecía significar locura en un sentido amplio y general. *Manía, melancolía y frenitos* se convirtieron gradualmente, en las 3 formas tradicionales de locura en la medicina antigua. Durante la época medieval persistió la relación entre melancolía y manía, apareciendo juntas en la clasificación de las enfermedades de la cabeza <sup>89</sup>.

Es en el primer siglo de nuestra era, cuando Aurelius Cornelius Celsus introdujo los términos de “demencia” y “delirium” en su obra *De Medicina* <sup>90</sup>. Los siglos XVI y XVII resultaron muy negativos para las enfermedades de la mente ya que su mal era atribuido a la posesión por el demonio (Figura 7).

Aparece por primera vez el término “*demency*” en 1522, en el texto de una sentencia judicial (“le dieron clemencia por sufrir demencia”) según se recoge en el *Oxford English Dictionary*. Culen en 1793 fue el primero en definir la demencia senil como una entidad médica, al igual que posteriormente lo haría Benjamín Rush, padre de la psiquiatría americana. El término fue incluido en la clasificación de las enfermedades mentales por Pinel en 1801 en su tratado “*Traité medico-philosophique sur l’alineation mentale*” <sup>91</sup>, y es a partir de él cuando se generalizó su uso. En 1838 Esquirol definió y clasificó la demencia, distinguiendo una demencia aguda causada por fiebre o hemorragia, una demencia crónica causada por alcohol, masturbación, epilepsia y manía y una demencia senil causada por la edad. En 1851 la demencia senil es citada en el Diccionario de Ciencias Médicas de Dunlison, como enfermedad <sup>92</sup>.



**Figura 7. Extracción de la piedra de la locura. c.1490.** Óleo sobre tabla de roble. El Bosco. Museo del Prado. Obtenida de <https://www.museodelprado.es/typo3temp/pics/add93c8687.jpg>

A principios de siglo XX la “*demencia senil*” se interpretaba como una enfermedad asociada a la involución. Evidentemente, el año 1907 supone un punto claro de inflexión en el estudio y conocimiento de la demencia. Es en este año cuando Alois Alzheimer (Figura 8) describe las bases anatomopatológicas para el conocimiento de la demencia <sup>93</sup>. En Tübingen, en 1906, durante la conferencia de *West German Society of Alienist*, Alois Alzheimer presentó sus hallazgos clínicos y neuropatológicos en una comunicación titulada “sobre una enfermedad peculiar de la corteza cerebral”, que fueron posteriormente publicados en 1907. Sus hallazgos correspondían a una mujer de 51 años que mostraba desorientación, celos, pérdida de memoria, déficit perceptivo, afasia, apraxia, agnosia, manía persecutoria, conductas anómalas y una progresión rápida en su enfermedad, falleciendo a los 56 años de edad. Tras el estudio del cerebro con microscopía observó la existencia de atrofia y lesiones miliars (Herdchen) y utilizando tinción de plata de Bielschowsky, identificó los ovillos neurofibrilares. En 1910 se

describe la enfermedad en la octava edición del *Compendium der Psychiatrie*, siendo Kraepelin quien la denominó Enfermedad de Alzheimer.



**Figura 8. Fotografía y firma del Dr. Alois Alzheimer.** Tomada de <http://gerontoprevention.free.fr/graphiques/alzheimer.jpg>

Pero después de esta descripción inicial se vuelve nuevamente a una época de penumbra que dura hasta los años 70. En esta década Roht y el grupo de Newcastle relacionaron, en la teoría del umbral, las puntuaciones de los test mentales y las lesiones por campo microscópico. Sentando así, las bases para relacionar las manifestaciones clínicas con la presencia de lesiones patológicas. Otro evento de gran interés que surge en los años setenta es la valoración de la presencia de cambios vasculares en pacientes con demencia y la probable relación entre datos neurodegenerativos y cambios vasculares.

En los años 80, se asientan los criterios diagnósticos de consenso para las demencias más prevalentes, y se sientan las bases para un diagnóstico más precoz de las mismas <sup>2</sup>. A partir de ahí, se inicia una febril actividad investigadora sobre las demencias en todos los campos. Neurólogos, psiquiatras, geriatras, internistas, infectólogos, epidemiólogos y expertos en biología molecular y genética forman, entre otros, la legión de especialistas volcados en la investigación y problemática general de las demencias, y se describen algunas de nueva aparición, como la del complejo demencia–sida y la de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

En 1971, el doctor Raymond Damadian (Premio Nobel de Medicina en 2003) demostró que la resonancia magnética (RM) podía ser usada para detectar enfermedades debido a que distintos tipos de tejidos emiten señales que varían en su duración, en respuesta al campo magnético. La aplicación de esta técnica en las demencias supuso un gran avance para el diagnóstico de esta patología, la cual nos proporciona hallazgos histopatológicos que se corresponden con los signos clínicos y nos permite descartar tumores, hematomas o hemorragias que pueden ser tratados, y que pueden ser fácilmente confundidos con la demencia por su clínica

Otro gran avance en 2002, viene con la aprobación por parte de un comité de la Unión Europea de la utilización de la tacrina en los países miembros, para el tratamiento de los casos de EA moderada o grave, ya que fue el primer fármaco que se había aprobado para esta patología.

En la actualidad hay abiertas varias vías de investigación de tratamiento bastante prometedoras en el campo de la inmunoterapia <sup>94</sup>.

### **2.2.2 Definición de demencia**

La demencia es un síndrome debido a una enfermedad cerebral, normalmente de naturaleza crónica y progresiva, en la que hay una alteración de múltiples funciones corticales superiores, incluyendo la memoria, el pensamiento, orientación, comprensión, cálculo, capacidad de aprendizaje, lenguaje y juicio. Sin embargo, la conciencia no se ve afectada. Las alteraciones en la función cognitiva están comúnmente acompañadas, y en ocasiones precedidas, por un deterioro del control emocional, del comportamiento social o de la motivación <sup>95</sup>.

La EA es la forma más común de demencia y posiblemente contribuye al 60-70% de los casos. Otros contribuyentes importantes a esta patología son: la demencia vascular (DV), la demencia con cuerpos de Lewy, y un grupo de enfermedades que contribuyen a la demencia fronto-temporal. Un porcentaje importante de pacientes, sobre todos aquellos que tienen un comienzo tardío, presentan formas mixtas de demencia (perfil degenerativo + perfil vascular).

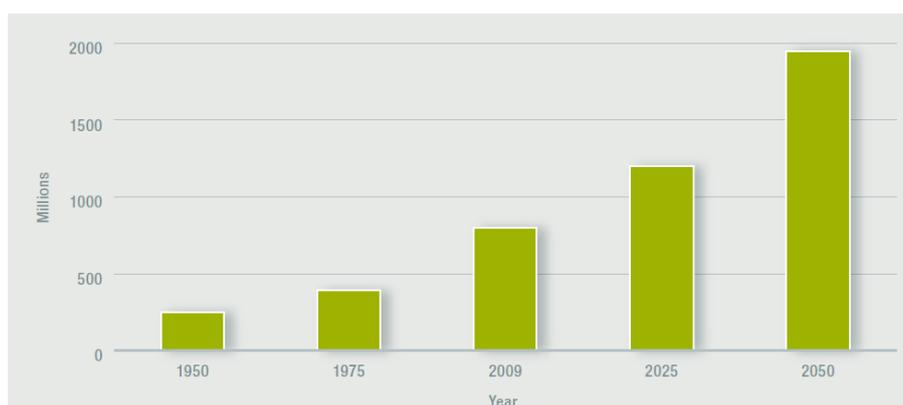
La demencia es muy heterogénea y afecta a cada persona de una manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y la personalidad pre-mórbida de la persona. Los problemas ligados a la demencia pueden ser entendidos en tres etapas <sup>96</sup>:

- Fase temprana: el primer o segundo año.
- Etapa media: del tercer al quinto año.
- Etapa de tardía: quinto año y después.

Estos periodos se dan como una guía aproximada solamente, a veces algunos pacientes pueden deteriorarse más rápidamente o más lentamente. Cabe señalar que no en todas las personas con demencia se mostrarán todos los síntomas.

### 2.2.3 Epidemiología de la demencia

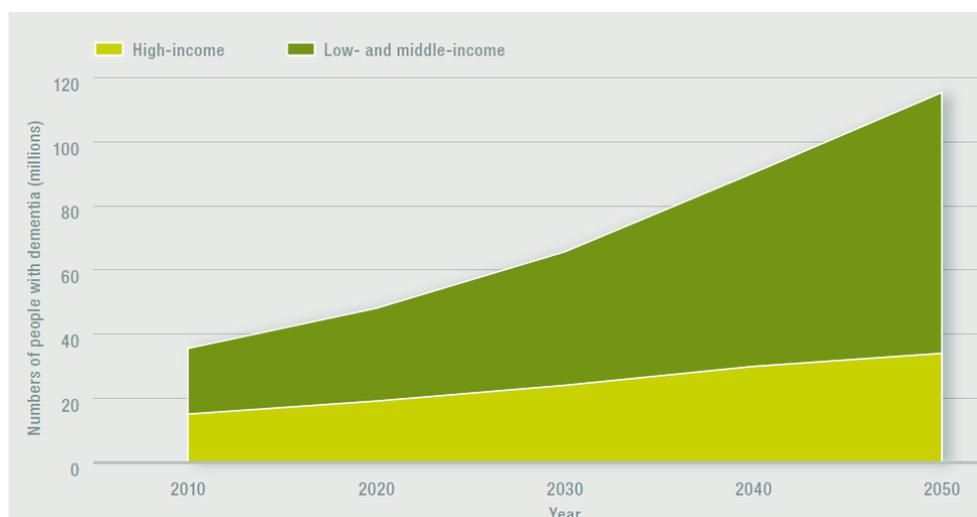
Se estima que para el 2050 la población mundial mayor de 60 años será de 2 mil millones (Figura 9). El envejecimiento de la población se está produciendo rápidamente en los países en vías de desarrollo. Un efecto claramente negativo del rápido envejecimiento de la población es el aumento en el número de personas con demencia. Aunque la demencia afecta principalmente a las personas mayores, no es una parte normal del envejecimiento <sup>95</sup>.



**Figura 9. Estimación de la población mundial mayor de 60 años.** Informe WHO demencia, 2012 <sup>95</sup>

Según diversas estimaciones, entre el 2% y el 10% de todos los casos de demencia comienzan antes de los 65 años. La prevalencia se duplica con cada incremento de cinco años de edad después de 65 años (Figura 10). El número de personas en el mundo que viven con demencia en 2011 se estima en 35,6 millones, y los estudios epidemiológicos

indican que este número se espera que crezca a un ritmo alarmante. Se estima que el número casi se duplicará cada 20 años, es decir, a 65,7 millones en 2030 y 115,4 millones en 2050 <sup>95,97</sup>. La mayoría de estas personas vivirán en los países en vías de desarrollo (Figura 10).



**Figura 10. Estimación del incremento del número de personas con demencia en países con altos y medios ingresos. Informe WHO demencia, 2012 <sup>95</sup>.**

La demencia es una de las principales causas de discapacidad en la vejez. Es la principal causa de dependencia y de discapacidad entre las personas mayores, tanto en países de altos ingresos como en los países en vías de desarrollo. El coste estimado de la demencia en todo el mundo en 2010 ha sido de 604 billones de dólares.

Los costes directos de atención médica contribuyen apenas al 16% del coste global. En países de bajos ingresos, la mayoría de los costes se deben al cuidado informal, es decir, atención no remunerada proporcionada por los miembros de la familia y otros <sup>95</sup>.

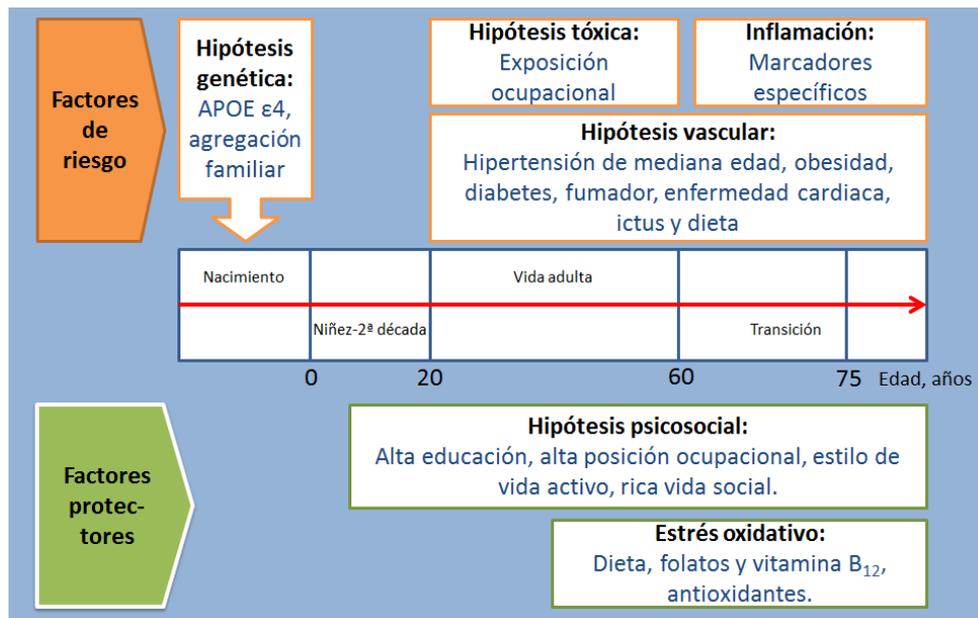
La demencia acorta la vida de las personas que desarrollan la enfermedad. Uno de los mejores estudios en este campo calcula que la media de supervivencia a la EA es de 7,1 años y en la DV de 3,9 años <sup>98</sup>. Hay mucha variabilidad individual en torno a estas estimaciones. La contribución independiente a la mortalidad de la demencia es difícil de evaluar debido a que son pacientes que normalmente tienen asociadas otro tipo de patologías.

## 2.2.4 Factores de riesgo de la demencia

Diversos trabajos de investigación han sugerido que la enfermedad vascular predispone a la EA, así como a la DV<sup>99</sup>. En los estudios de incidencia cortos<sup>100-102</sup> y de latencia más largos<sup>103,104</sup>, el tabaquismo aumenta el riesgo de EA. La diabetes es también un factor de riesgo<sup>105</sup> y, en estudios de cohortes de más largo plazo, la hipertensión aparecida en la mediana edad<sup>106,107</sup> y el aumento del colesterol<sup>107</sup> están asociados con la aparición más tardía de la EA. La sumación de factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia y el tabaquismo aumentan la incidencia de demencia gradualmente, si la exposición aparece en la mediana edad<sup>103</sup> o unos pocos años antes de la aparición de la demencia<sup>100</sup> (Figura 11).

La evidencia de estudios epidemiológicos de cohortes sugieren que la hipoactividad es un factor de riesgo para la aparición de la demencia, y que el ejercicio aeróbico puede reducir el deterioro cognitivo y proteger contra la demencia<sup>108,109</sup>.

A pesar de cierta inconsistencia entre los estudios de cohortes, hay pruebas bastante convincentes de que en países de renta alta se objetiva que altos niveles de educación y ocupacionales se asocian con una menor incidencia de demencia<sup>110</sup>. La evidencia en los países en vía de desarrollo es más limitada. Debido a que las funciones y responsabilidades de las personas mayores varían entre las culturas, pueden ser menos relevantes las habilidades cognitivas, la educación y el nivel ocupacional necesarios de mantener de cara a la neurodegeneración y claramente menos asociado con el riesgo de demencia<sup>111,112</sup> (Figura 11). Se produce una ligazón entre la neuroplasticidad y la reserva cognitiva.



**Figura 11. Principales hipótesis etiológicas de la demencia: una perspectiva del ciclo vital.**  
Modificada de Fratiglioni et al. 2010 <sup>53</sup>.

## 2.2.5 Clasificación de la demencia

Durante el siglo pasado, la clasificación de los subtipos de demencia ha sido revisada en varias ocasiones. La clave para la clasificación actual del diagnóstico de la EA, ha sido establecida gracias al Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y de derrame cerebral y a la asociación de EA y trastornos relacionados (NINCDS-ADRDA), que establecieron los criterios en 1984. Estos criterios vinculan patrones clínicos de neuropatología y utiliza las etiquetas de posible, probable y definitivo EA en el diagnóstico del paciente <sup>2</sup>.

Globalmente, las escalas más empleadas en la EA son: la Clinical Dementia Rating (CDR) <sup>113</sup>, la *General Deterioration Scale* (GDS) <sup>114</sup> y la Functional Assessment Staging (FAST) <sup>115</sup>, diseñada por el mismo autor que la anterior, con el objetivo de estadiar mejor el nivel funcional del paciente en correlación con la GDS.

En estas escalas se evalúa no sólo el deterioro cognitivo, sino también, la conducta y el nivel funcional del paciente. Son escalas ampliamente difundidas y usadas, tanto en la práctica clínica diaria como en ensayos clínicos <sup>116</sup>.

La GDS <sup>114</sup> presenta 7 grados de estadios evolutivos: 1-normalidad, 2- deterioro cognitivo leve (DCL), 3-demencia incipiente; en el estadio 4 se sitúa la demencia leve, en el 5 la

demencia moderada y los estadios moderado-severo y severo en los estadios 6 y 7. Dos años más tarde, el mismo equipo desarrolló la escala FAST para determinar, con más precisión, los estadios más avanzados de la enfermedad.

El diagnóstico definitivo de la EA requiere evidencia de apoyo patológico. EA probable es el máximo nivel de seguridad posible sin confirmación patológica. Para este diagnóstico el paciente no debe tener otra condición que pueda explicar sus síntomas. Otros rasgos de apoyo de probable EA incluyen evidencia de deterioro progresivo del lenguaje, praxis y el reconocimiento visual con deficiencias en las actividades de la vida diaria o con antecedentes familiares positivos de EA. Niveles bajos de A $\beta$  y altos de proteína tau en el líquido cefalorraquídeo, evidencia de atrofia cerebral progresiva en imágenes cerebrales y un patrón normal o inespecífico EEG apoyan el diagnóstico de probable EA <sup>117</sup>.

A pesar del uso generalizado de esta clasificación, varias cuestiones notables se relacionan con la extrapolación de los hallazgos clínico-patológicos para el diagnóstico.

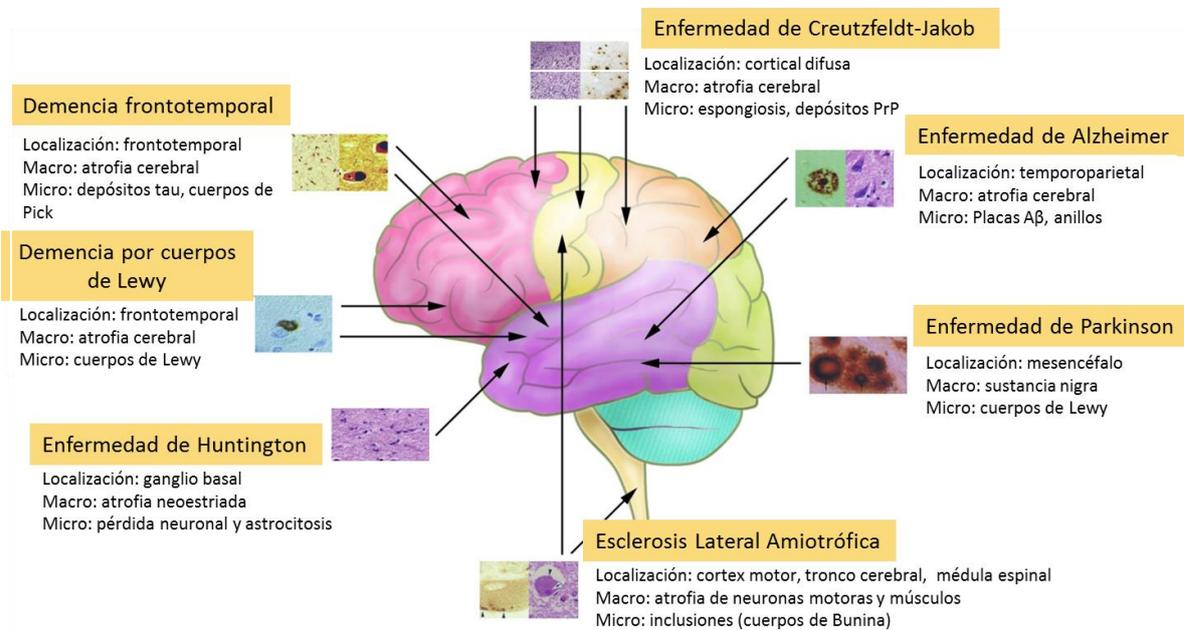
Desde su publicación los criterios originales NINCDS-ADRDA han sufrido actualizaciones y revisiones, y se han incorporado a los principales criterios internacionales, incluido el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales y la Clasificación Internacional de Enfermedades. En 2011 se realizó una nueva revisión de estos criterios adjuntando nuevos marcadores para el diagnóstico de esta patología <sup>1</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1. Biomarcadores incorporados a los criterios de demencia por Enfermedad de Alzheimer.** Modificado de Mackhann et al., 2011 <sup>1</sup>.

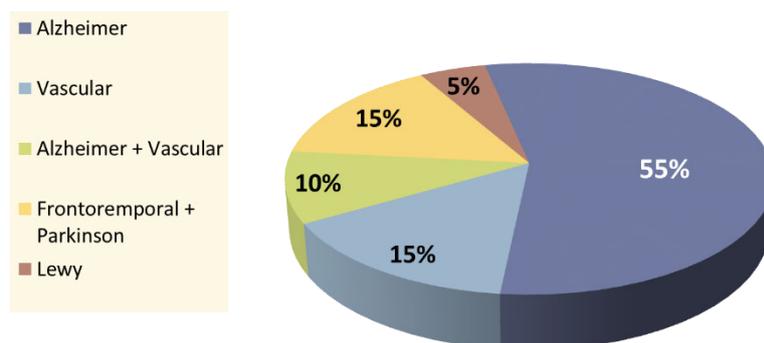
<i>Categoría diagnóstica</i>	<i>Probable biomarcador de etiología de EA</i>	<i>A<math>\beta</math> (PET o LCR)</i>	<i>Lesión neuronal (tau en LCR, FDG-PET, IRM)</i>	
<b>Probable EA</b>	<i>Basado en criterios clínicos</i>	Poco informativo	No disponible, conflictivo o indeterminado	
	<i>Con tres niveles de evidencia en el proceso patofisiológico</i>	Intermedio	No disponible o indeterminado	Positivo
		Intermedio	Positivo	No disponible o indeterminado
		Alto	Positivo	Positivo
<b>Posible EA (presentación clínica atípica)</b>	<i>Basado en criterios clínicos</i>	Poco informativo	No disponible, conflictivo o indeterminado	
	<i>Con evidencia del proceso patofisiológico</i>	Elevado pero no descarta patología secundaria	Positivo	Positivo
<b>Demencia poco probable producida por EA</b>		Más bajo	Negativo	Negativo

Abreviaturas: EA, Enfermedad de Alzheimer; A $\beta$ , beta-amiloide; PET, tomografía de emisión de positrones; LCR, líquido cefalorraquídeo; FDG, fluorodeoxyglucosa; MRI, imagen por resonancia magnética.

Los cuatro subtipos de demencia más comunes, por orden de frecuencia son la EA, la DV, demencia con cuerpos de Lewy y demencia fronto-temporal, cada una con unas alteraciones macroscópicas y microscópicas típicas para cada alteración así como una localización específica en el SNC (Figura 12) y una epidemiología específica (Figura 13).

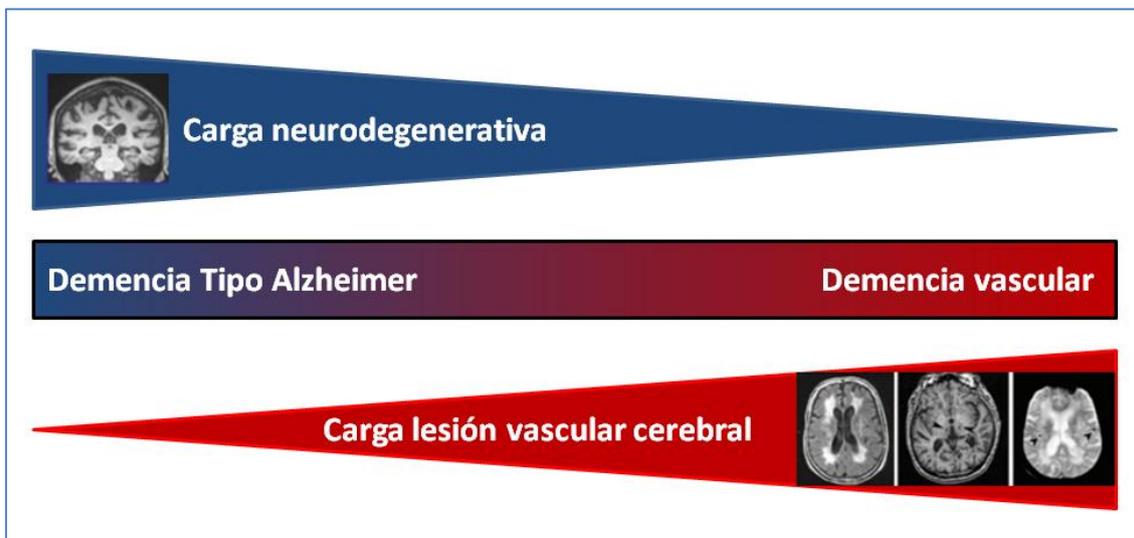


**Figura 12. Información general sobre la localización anatómica y los cambios macroscópicos y microscópicos característicos de los trastornos neurodegenerativos.** Modificada de Bertram et al, 2005 <sup>118</sup>.



**Figura 13. Distribución en porcentaje de los diferentes tipos de demencia.** Modificado de Möller et al, 2009 <sup>119</sup>.

Las patologías mixtas son mucho más comunes que las "puras" (en particular para la EA y la DV y la EA y DCL) <sup>120</sup> (Figura 14). En una serie de casos de más de 1000 autopsias, el 86% de las personas con demencia tenían patología relacionada con la EA pero sólo el 43% tenían una EA pura. El 26% tenía EA combinada con patología cerebrovascular, y el 10% tenían EA combinada con cuerpos de Lewy corticales <sup>121</sup>.



**Figura 14. Representación esquemática de las demencias más comunes.** En la izquierda estarían los sujetos con mayor carga de degeneración neuronal mientras que el extremo derecho estarían los pacientes con deterioro vascular más puro. En medio, la gran mayoría de pacientes que compartirían más o menos rasgos comunes. Modificada de Viswanathan et al., 2009 <sup>122</sup>.

El diagnóstico y clasificación de las demencias puede abordarse desde diferentes puntos de vista. Los criterios de clasificación más empleados en la actualidad hacen referencia a las características clínicas, a la etiología y a la fase evolutiva.

En función de su etiopatogenia podemos distinguir: demencias primarias o degenerativas, secundarias y de etiología múltiple (Tabla 2). Y además en función de las áreas cerebrales donde se localizan los cambios histopatológicos, se producirán unos síntomas cognoscitivos y psicopatológicos diferentes, diferenciando tres tipos principales de demencia: cortical, subcortical y global; pudiendo añadir a estos las demencias de inicio focal <sup>123</sup>.

<b>Tipos principales de demencias y etiopatogenia</b>
<b>Demencias primarias o degenerativas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tipo cortical</li> <li>▪ Tipo subcortical</li> <li>▪ Formas focales</li> <li>▪ Formas mixtas e infrecuentes</li> </ul>
<b>Demencias secundarias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vasculares</li> <li>▪ Otras demencias secundarias</li> </ul>
<b>Demencias combinadas o de etiología múltiple</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Demencia mixta (vascular y degenerativa)</li> <li>▪ Otras demencias combinadas</li> </ul>

**Tabla 2. Clasificación de la demencia según etiopatogenia.**

Modificado de Alberca et al, 2010 <sup>96</sup>.

## 2.3 Demencia tipo Alzheimer

### 2.3.1 Definición del Alzheimer

El término demencia tipo Alzheimer hace referencia a un síndrome demencial caracterizado por la afectación primaria de las funciones cognitivas corticales (memoria, lenguaje, praxias, etc.) con un alto impacto a nivel funcional y presencia constante de síntomas neuropsiquiátricos diversos <sup>124</sup>, y a un establecimiento característicamente lento y progresivo <sup>125</sup>.

Atendiendo a la clasificación etiológica de las demencias la EA se encuadra en las demencias degenerativas primarias, procesos que parecen estar relacionados con proteinopatías cerebrales <sup>96</sup>.

Se ha propuesto recientemente un modelo de biomarcadores y su correlación con las etapas de la EA <sup>126</sup>, en la que los biomarcadores más ampliamente validados de la EA se vuelven anormales y alcanzan asimismo un techo de una manera ordenada. El modelo de la enfermedad y la estadificación por biomarcadores se muestran en la Figura 15, representando el siguiente conjunto de principios:

- En primer lugar, los biomarcadores se vuelven anormales de manera temporal ordenada a medida que avanza la enfermedad.

- En segundo lugar, los biomarcadores de placas de beta-amiloide ( $A\beta$ ) son dinámicos al principio de la enfermedad, antes de la aparición de los síntomas clínicos, y alcanzan una meseta al mismo tiempo que aparecen los síntomas clínicos.
- En tercer lugar, los biomarcadores de lesión neuronal, disfunción y degeneración son dinámicos cuando la enfermedad avanza y se correlacionan con la gravedad de los síntomas clínicos.
- En cuarto lugar, la RM es el último biomarcador que se vuelve anormal, sin embargo, la RM mantiene una relación más estrecha con el rendimiento cognitivo cuando la enfermedad avanza, que otros biomarcadores <sup>127</sup>.
- En quinto lugar, ninguno de los biomarcadores es estático; el ratio de cambio de cada biomarcador en el tiempo sigue un curso no lineal con una forma sigmoidea <sup>126</sup>. Esta no linealidad ha sido claramente demostrada en estudios de RM, en el que la atrofia se acelera a medida que el paciente comienza con signos clínicos de demencia <sup>128</sup>. Una forma sigmoidea como una función en el tiempo implica que el efecto máximo de cada biomarcador varía en el transcurso de progresión de la enfermedad.

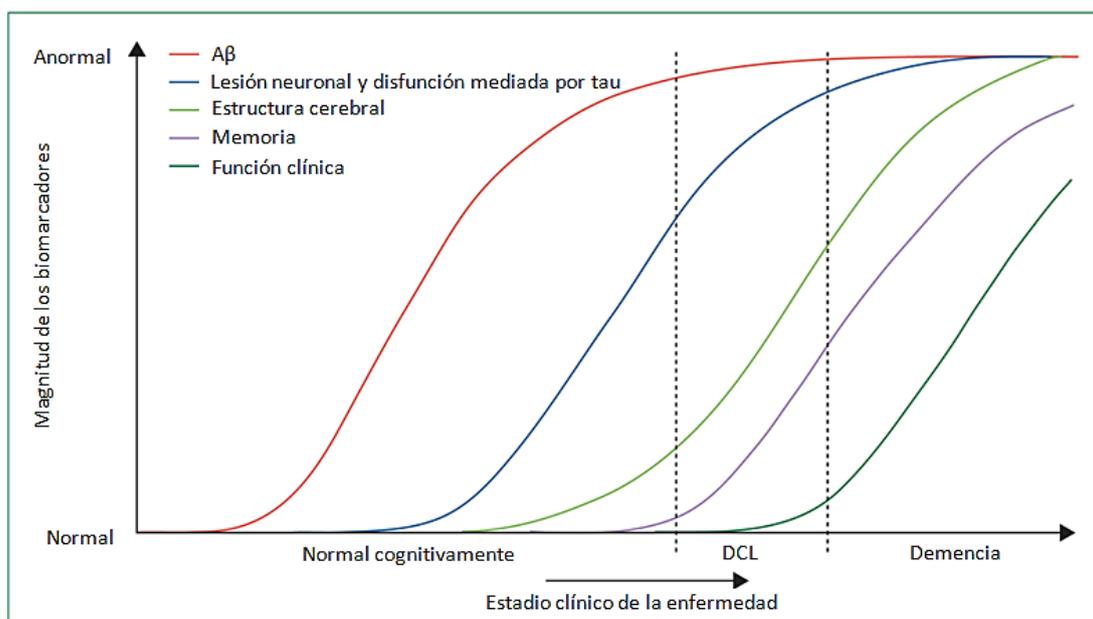
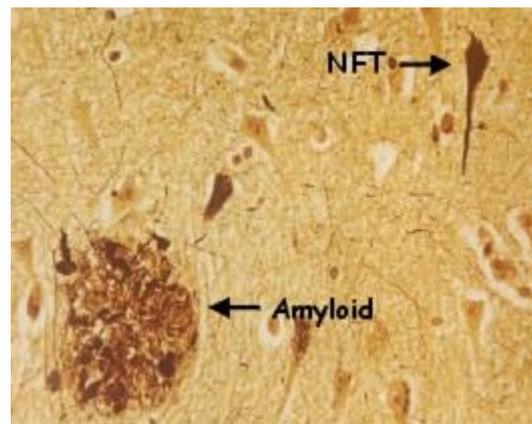


Figura 15. Modelo de aparición de biomarcadores y progresión de la EA propuesto por Jack et al. Modificado de Jack et al, 2010 <sup>126</sup>.

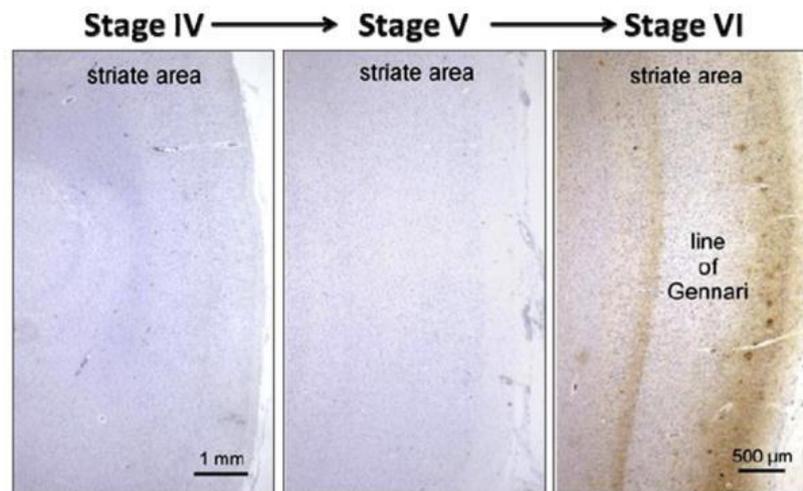
En las dos últimas décadas se han producido importantes avances en el conocimiento de la EA. Sin embargo, carecemos en este momento de certezas en cuanto a la causa, mecanismos íntimos de producción, o estrategias terapéuticas capaces de revertir o detener el curso de la enfermedad.

### 2.3.2 Fisiopatología del Alzheimer

La EA se caracteriza por la aparición de dos tipos de depósitos proteínicos diferentes: los depósitos de  $A\beta$  y los **ovillos neurofibrilares** (Figura 16). Ambos ejercen efectos tóxicos en las neuronas, activan células gliales que segregan sustancias citotóxicas y aumentan los daños tisulares alterando la sinapsis y la función neuronal, conduciendo en último término a la apoptosis. Cuando este daño en el tejido cerebral alcanza un cierto grado termina expresándose clínicamente <sup>129</sup> (Figura 18).



**Figura 16. Placa de  $A\beta$  y ovillos neurofibrilares en tejido cerebral.** Tomado de <https://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000622/50525540/images/nft-amyloid.jpg/image>

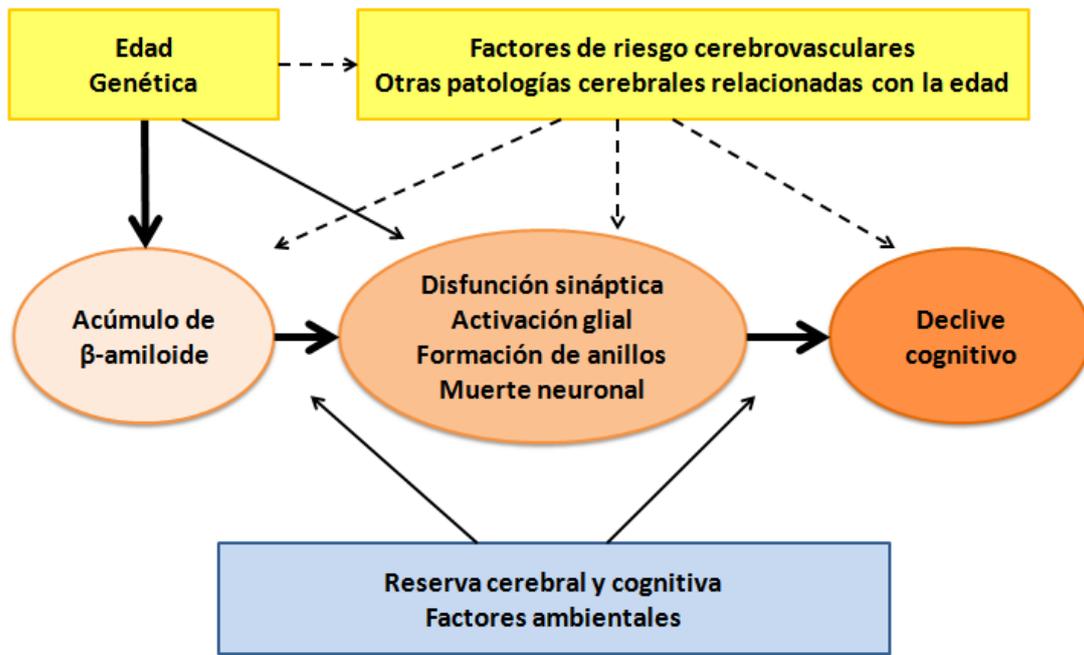


**Figura 17. Progresión anatómica de la Enfermedad de Alzheimer.** En la progresión típica de la enfermedad la corteza motora primaria y la sensorial son las últimas que se ven afectadas. Durante la última etapa de la enfermedad, la corteza visual primaria se caracteriza por la hiperfosforilación de tau (como se muestra utilizando anticuerpos anti-fosfo-tau), ovillos neurofibrilares, y las placas amiloides). Tomado de Small et al, 2008 <sup>130</sup>.

Los estudios sobre la patogénesis de la EA se centran principalmente en el papel de los depósitos proteicos. El prototipo de esta enfermedad es complejo ya que resulta de la combinación de una amilodopatía y una taupatía.

Numerosos estudios apuntan a que el fenómeno primario en la EA es una alteración en el metabolismo de la **proteína APP** (proteína precursora de amiloide) que provoca un aumento en la producción y un depósito anómalo del péptido  $A\beta$ , dando lugar a depósitos amiloides insolubles en forma de **placas seniles** (Figura 16 y Figura 17). Este proceso es apoyado por la denominada hipótesis de la “**cascada amiloide**”, que explica que por diversos factores genéticos se producen alteraciones a nivel de la expresión de la proteína APP, del proceso de proteólisis o del proceso de estabilidad del péptido  $A\beta$ , alterando el equilibrio de producción/aclaramiento del mismo, lo que finalmente resulta en un acúmulo gradual de degeneración neurofibrilar, en placas difusas, placas neuríticas y en vasos cerebrales y meníngeos <sup>131</sup>. Se ha demostrado que el efecto tóxico se produce fundamentalmente por la liberación de radicales libres en la unión de este amiloide con determinados receptores, lo que activa una cascada de sucesos inflamatorios y oxidativos, que acaban lesionando la neurona, alterando las sinapsis con el consiguiente déficit de neurotransmisores y conduciendo en último término a la muerte neuronal <sup>132</sup>. La

**apolipoproteína E (APOE)** también se ha reconocido de manera irrefutable como uno de los factores de riesgo más importantes para EA <sup>292</sup>.



**Figura 18. Modelo hipotético de la cascada fisiopatología en la Enfermedad de Alzheimer** <sup>133</sup>.

Este modelo propuesto por Sperling et al. postula que los depósitos de  $A\beta$  es un evento que ocurre primero y está relacionado con la posterior disfunción sináptica, la neurodegeneración y la pérdida neuronal. La edad y la genética, así como otros factores intrínsecos del paciente, tales como, otras patologías cerebrales o la respuesta cognitiva pueden influir en la respuesta del organismo a las placas de  $A\beta$  y/o el ritmo de progresión de las manifestaciones clínicas.

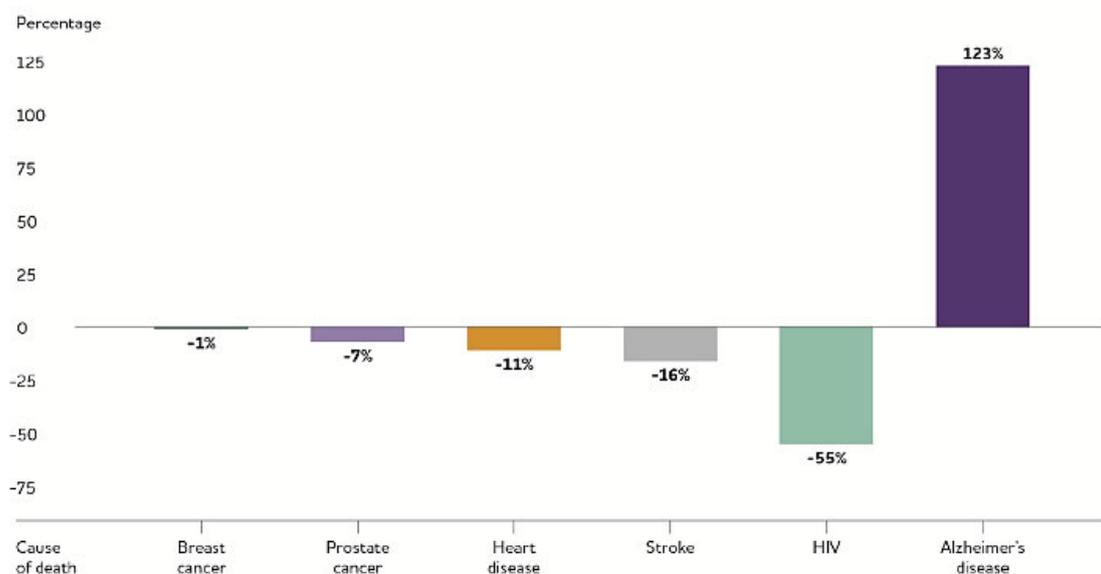
### 2.3.3 Epidemiología del Alzheimer

En 2015, existen más de 46 millones de pacientes con EA en todo el mundo, y basándonos en las expectativas de vida, estas cifras se seguirán incrementando, se estima que en 2050 el número de pacientes con EA sobrepasará 100 millones de personas <sup>88</sup>.

La EA es la sexta causa principal de todas las muertes en los Estados Unidos, considerando todos los grupos de edades, y está íntimamente relacionado con la quinta causa principal de muerte, la diabetes. El Alzheimer es la quinta causa principal de muerte entre los estadounidenses de 65 años o más <sup>134,135</sup>.

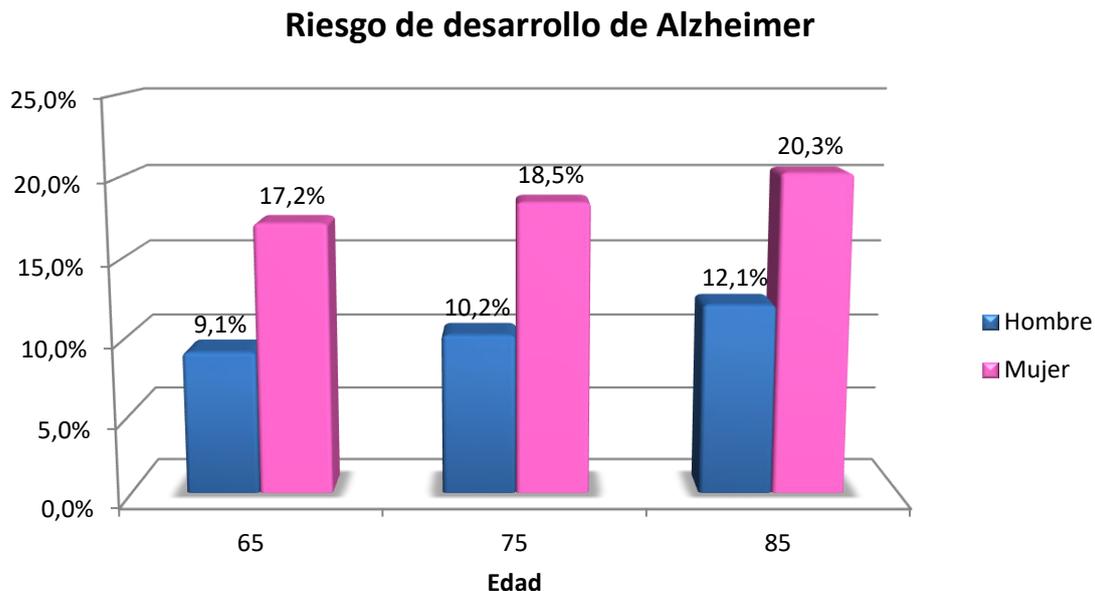
En 2005, el consorcio “*Alzheimer Disease International*” encargó a un grupo de expertos internacionales alcanzar un consenso sobre la prevalencia de la demencia y la incidencia estimada en 14 regiones de la OMS, con base en datos epidemiológicos adquiridos en los últimos años. Los resultados indicaron que 24,2 millones de personas vivían con esta demencia en ese momento, existiendo 4,6 millones de nuevos casos surgidos todos los años <sup>136</sup>. América del Norte y Europa Occidental tienen a los 60 años la mayor prevalencia de esta demencia (6,4 y 5,4% de la población a los 60 años respectivamente), seguida de América Latina (4,9%), China y sus vecinos en desarrollo occidental y el Pacífico (4,0%). Las tasas de incidencia anual (por 1000) para estos países se estimaron en 10,5 para América del Norte, 8,8 para Europa Occidental, 9,2 para América Latina y 8,0 para China y sus vecinos en desarrollo occidental y el Pacífico, aumentando exponencialmente con la edad en todos los países, especialmente a través de la séptima y octava década de la vida <sup>137</sup>.

Entre 2000 y 2015, la cantidad de muertes por EA registrada en los certificados de defunción de Estados Unidos se ha más que duplicado, con un aumento del 123%, mientras que la cantidad de muertes por enfermedad cardíaca, que es la causa número uno de muerte, disminuyó en un 11 por ciento (Figura 19). En el conjunto de los Estados Unidos, en 2015, la tasa de mortalidad por EA fue de 34 muertes por cada 100.000 personas <sup>135</sup>.



**Figura 19. Porcentaje del cambio de causas de muerte en todas las edades entre 2000 y 2015.** Datos tomados del *National Center for Health and Statistics*. Tomada de Alzheimer's Association, 2018 <sup>135</sup>.

El aumento del riesgo a corto y medio plazo del desarrollo de EA ha sido visto no sólo a los 65 años, sino que se incrementa notablemente a los 75 y 85 años, tanto para las mujeres como para los hombres. Sin embargo, en comparación con las mujeres, los riesgos de desarrollar esta demencia no son tan altos en los hombres (Figura 20). Una vez más, esta diferencia, es en gran parte debido a la mayor esperanza de vida para las mujeres <sup>138</sup>.



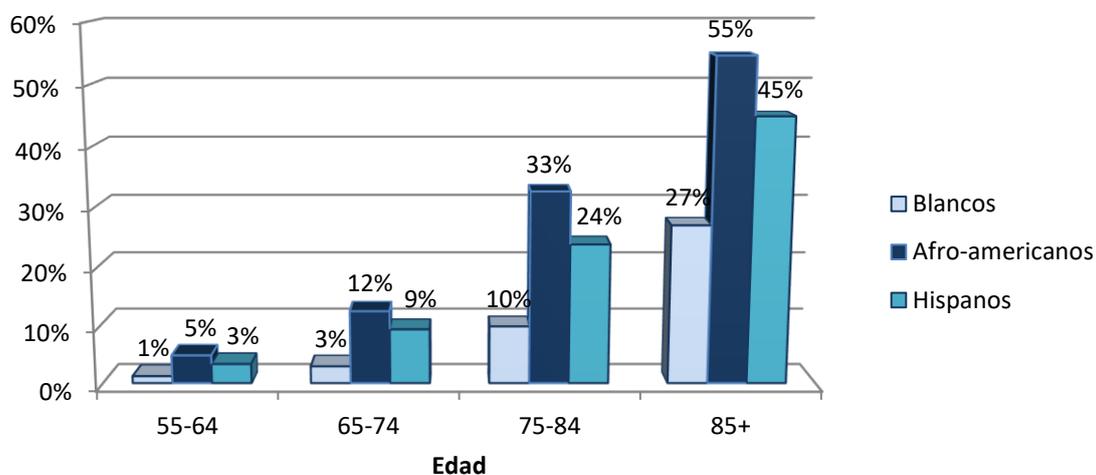
**Figura 20. Riesgo de desarrollo de Enfermedad de Alzheimer en función de la edad y el sexo.**  
Modificada de Alzheimer's Association, 2010 <sup>139</sup>.

En 2006 se realizó una encuesta en Estados Unidos en la que telefónicamente se contactó con más de 16.000 personas, siendo una muestra representativa de una población estimada de 68 millones de estadounidenses de 55 años o más, analizando el porcentaje de personas con deterioro cognitivo <sup>140</sup>. En este estudio se observó que en los tres grupos raciales analizados (blancos, afro-americanos e hispanos), la prevalencia de deterioro cognitivo es mayor cuando aumenta la edad en comparación con jóvenes (Figura 21).

Como se muestra en la Figura 21, los afroamericanos tienen de 2 a 3 veces más probabilidades que los blancos de tener un deterioro cognitivo. No solo entre las personas de 55 a 64 años, en las que los afroamericanos tienen 4 veces más probabilidades que los blancos de tener deterioro cognitivo, sino también entre la población mayor de 85 años.

Según este estudio los hispanos tienen, en promedio, 2 veces más probabilidades que los caucásicos de tener deterioro cognitivo, y estas diferencias son mayores en los jóvenes que en los grupos de mayor edad. Entre las personas de 55 a 64 años, los hispanos tienen casi 3 veces más probabilidades que los caucásicos de tener deterioro cognitivo en comparación con los mayores de 85 años, que tienen sólo 1,6 veces más probabilidades que los caucásicos de tener este deterioro. En cada grupo de edad, los hispanos son menos propensos que los afroamericanos de desarrollar deterioro cognitivo.

### Americanos mayores de 55 años con deterioro cognitivo en función de la raza



**Figura 21. Proporción de americanos mayores de 55 años con deterioro cognitivo por etnia.**  
Modificada de Gurland et al, 1999 <sup>140</sup>.

## 2.4 Demencia vascular

La DV es la segunda causa más común de demencia en los ancianos después de la EA. La DV se define como la pérdida de la función cognitiva resultante de la isquemia, la hipoperfusión, o lesiones cerebrales hemorrágicas <sup>141</sup> debido a una enfermedad cerebrovascular o a una patología cardiovascular. El diagnóstico de la DV requiere un deterioro cognitivo, lesiones vasculares cerebrales, a menudo predominantemente subcorticales, como se ha demostrado por imágenes cerebrales, un vínculo temporal entre el accidente cerebrovascular y la demencia, y la exclusión de otras causas de demencia <sup>142</sup>. La combinación de cambios patológicos en el cerebro de EA y de DV en las personas

mayores son muy comunes, por lo que la demencia mixta probablemente es el tipo más común de demencia <sup>143,144</sup>.

Diferentes estudios sugieren que la DV afecta entre el 3,1% y el 20,8% de la población de más de 65 años. De ella entre un 1,1% y un 6,4% corresponden a demencias en fases avanzadas y entre un 2 y un 14,4% a fases moderadas, respectivamente. Datos recientes sobre la prevalencia de DV en España la sitúan en el 1,4% <sup>145</sup>, dato muy similar a las estimaciones en otros países europeos. La EA representa el 60% y la vascular aproximadamente el 30% de la prevalencias de todas las demencias <sup>146</sup>.

Se considera que 1 de cada 3 individuos mayores de 65 años puede sufrir un ictus vascular con demencia; sin embargo, es posible que la mitad presenten deterioro cognitivo post-ictal, sin llegar a cumplir la definición de demencia <sup>96</sup>. En este contexto, López et al. <sup>147</sup> define la demencia como la pérdida de dos o más funciones cognitivas (memoria, función ejecutiva, orientación, praxis, lenguaje, etc.) que conlleva la pérdida de la independencia para realizar las actividades básicas o instrumentales de la vida cotidiana. El grupo con deterioro cognitivo post-ictal, sin demencia, se clasifica como deterioro cognitivo vascular.

Los avances en el control de los factores de riesgo vascular y en el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular, hacen de la DV una forma potencialmente tratable y prevenible de demencia.

Los criterios clínicos de demencia vascular se recogen en NINDS-AIREN o en el VASCOG.

## **2.5 Detección y diagnóstico actual de la demencia**

Debido al curso irreversible y a la ausencia de un tratamiento efectivo para la demencia y la EA, es primordial realizar una detección y un diagnóstico en una fase temprana, para tratar al paciente con fármacos que tiendan a retrasar la pérdida cognitiva, así como comenzar con un tratamiento no farmacológico basado en ejercicios intelectuales, para proveer al paciente de recursos que proporcione una mejor calidad de vida durante más tiempo.

En la mayoría de los casos, debido al carácter gradual de las manifestaciones, el paciente suele acudir a la consulta acompañado por algún familiar, que es quien se ha percatado del posible déficit. Por otra parte, cuando la demanda se expresa preferente e insistentemente por parte del propio paciente pueden ser atribuidos los síntomas a un cuadro de depresión o ansiedad <sup>148</sup>.

Actualmente para la detección de demencias se usan diferentes test cognitivos breves y biomarcadores que se deben practicar a individuos con riesgo elevado de desarrollar un trastorno cognitivo.

### **2.5.1 Historia del paciente**

La historia del paciente es la parte más importante para realizar un diagnóstico correcto. La anamnesis debe incluir cuestiones para evaluar el lenguaje, la memoria, la orientación, la función ejecutiva, el estado emocional y afectivo, la conducta y los cambios de personalidad, y la capacidad funcional. Es importante completar la entrevista con el informador acompañante del paciente <sup>148</sup>. Además, es importante conocer detalles como:

- Antecedentes familiares de demencia, enfermedades psiquiátricas, cerebrovasculares y epilepsia.
- Nivel educativo y habilidades sociales previas.
- Información para descartar causas secundarias de demencia como traumatismo craneal, neoplasias, tóxicos, etc.
- Tiempo de evolución, modo de instauración (brusco o lento), progresión (progresiva, fluctuante o escalonada).
- Consciencia de la enfermedad por el propio paciente.

### **2.5.2 Mini Mental State Examination**

Folstein, en 1975, desarrollo el Mini Mental State Examination (MMSE) <sup>149</sup>, lo que significó una enorme aportación respecto a otros test breves que exploraban sólo la memoria a corto plazo. El MMSE explora cinco áreas: orientación, registro, atención y cálculo, memoria y lenguaje. Sin embargo, el MMSE presenta algunas limitaciones que

hay que tener en cuenta. Los pacientes con inteligencia o nivel educativo superior previos muestran puntuaciones superiores al estado real y pueden dar falsos negativos. Por el contrario, la edad avanzada, un nivel educativo bajo, procedencia de culturas extranjeras y deterioros sensorial pueden asociarse a falsos positivos.

Existen dos versiones en castellano. Inicialmente, Lobo et al.<sup>150</sup> adaptó y amplió el MMSE hasta 35 puntos. Posteriormente, para facilitar la comparación con los estudios internacionales, validaron la versión de 30 puntos.

### **2.5.3 Test neuropsicológicos**

La exploración neuropsicológica pretende, en general, definir el estado de los distintos componentes del sistema cognitivo del paciente, definiendo patrones de capacidades afectadas y preservadas.

La evaluación neuropsicológica puede subdividirse en dos niveles de complejidad: un primer nivel consistente en la administración de escalas breves, estandarizadas y sencillas como el MMSE<sup>149</sup> y las Escalas de Información-Memoria-Concentración y de Demencia de Blessed<sup>151</sup> que permitan alcanzar el diagnóstico de demencia; y un segundo nivel de mayor complejidad en el que neuropsicólogos entrenados administran baterías más complejas con el fin de acotar el estadio evolutivo y severidad del deterioro, al tiempo que se establecen los dominios de la función cognitiva que se hallan afectados para facilitar el diagnóstico diferencial y para orientar el plan terapéutico.

### **2.5.4 Pruebas de neuroimagen estructural**

La tomografía axial computerizada (TAC) y la RM nuclear representan las dos principales técnicas de neuroimagen estructural. La introducción de estas técnicas en la práctica clínica habitual ha supuesto un gran avance en el diagnóstico precoz y en el conocimiento de las diferentes formas clínicas de la demencia. Su aplicación permite:

1. Detectar patologías potencialmente tratables como son los hematomas subdurales, la hidrocefalia a presión normal, los tumores cerebrales y otras patologías reversibles y tratables que pueden producir demencia.
2. Identificar patología vascular de pequeño vaso. Con la RM se puede detectar la isquemia en la sustancia blanca e identificar demencias vasculares y mixtas que

asemejan, con frecuencia, la clínica de la EA. La patología vascular de la sustancia blanca puede observarse en el TAC como zonas de hipodensidad y en la RM como alteraciones focales de la intensidad de la señal. Pero estos signos neurorradiológicos no son patognomónicos de DV, apareciendo tanto en EA como en sujetos sanos <sup>49</sup>.

3. Patología neurodegenerativa. Se han observado diferentes hallazgos estructurales con el TAC y la RM, que permiten confeccionar patrones de alteraciones estructurales correspondientes a las diferentes enfermedades que causan demencia, como en el caso de la EA, y que guardan relación con la presencia y severidad de la misma <sup>152</sup>.

### **2.5.5 Pruebas de neuroimagen funcional**

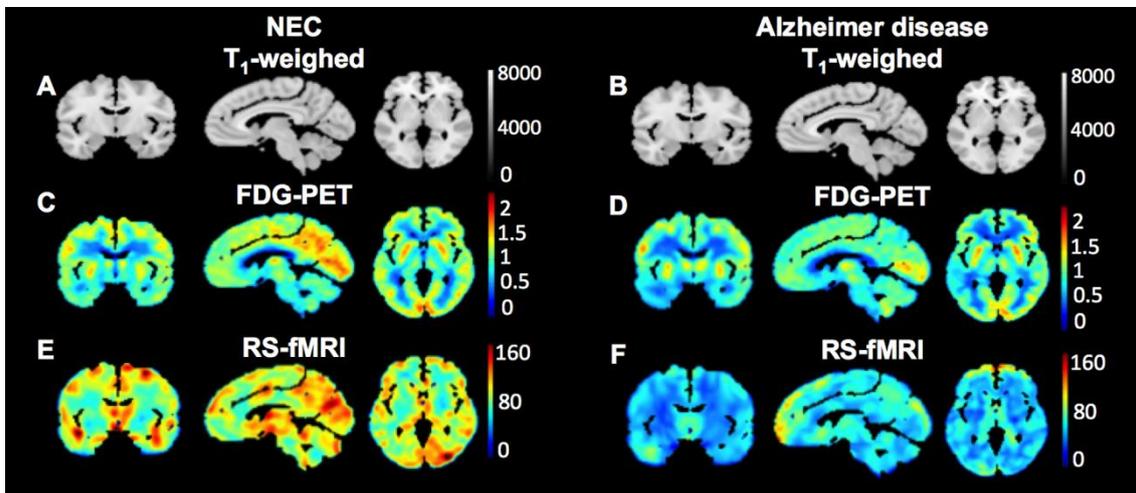
En los últimos años, la capacidad del TAC y de la RM para obtener excelentes imágenes anatómicas del cerebro normal y patológico ha mejorado el diagnóstico y el tratamiento de muchas lesiones neurológicas y neuroquirúrgicas; sin embargo, existen enfermedades y disfunciones cerebrales que aparecen con imágenes de TAC y RM normales o con hallazgos anormales inespecíficos.

Con la posibilidad del estudio in vivo de la función cerebral, estas técnicas han permitido obtener resultados sorprendentes en el diagnóstico diferencial de la demencia, en el estudio de las correlaciones clínico-neurobiológicas y en la investigación de procesos fisiopatológicos subyacentes al síndrome demencial <sup>92</sup>.

Las técnicas utilizadas para el estudio funcional de las demencias han contribuido en gran manera a la comprensión de la actividad cerebral y de su distribución espacial en diferentes condiciones fisiológicas (Figura 22). Estas técnicas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Aquellas que utilizan fuentes electromagnéticas para recoger la señal, como son: la resonancia magnética funcional (fMRI), la espectroscopía por resonancia (MRS), la Electroencefalografía (EEG) y la Magnetoencefalografía (MEG).

2. Las que utilizan la radiación procedente de la transformación de partículas o radionucleidos: la Tomografía por emisión de positrones (PET) y la Tomografía computerizada por emisión de fotones (SPECT).



**Figura 22. Actividad cerebral y mapas del metabolismo de la glucosa. A y B.** Imagen anatómica mediante resonancia magnética de paciente control y EA. **C y D.** PET del metabolismo de la glucosa en el grupo control y EA. **E y F.** fMRI de la actividad cerebral en los mismos pacientes controles y EA. Modificada de Kazemifar et al., 2017 <sup>153</sup>.

El funcionamiento cerebral se puede estudiar desde tres perspectivas diferentes. La primera se centra en la arquitectura de sus áreas y lóbulos, la segunda lo considera compuesto de columnas neuronales con funciones específicas y la tercera busca estudiar los circuitos que son activados de un modo sucesivo para resolver tareas concretas. Dentro de esta última perspectiva, la MEG permite, mejor que ninguna otra técnica, la investigación del procesamiento de información en pasos sucesivos a través de un circuito determinado <sup>154</sup>.

## 2.6 El ojo: extensión del SNC

Cicerón (106-43 aC) fue el primero en declarar "*ut imago est ut animi Voltus sic indices oculi*", el rostro es una imagen de la mente, los ojos son su intérprete. Muchas versiones diferentes de esta frase ya han sido citadas por filósofos, oradores, políticos y escritores. A través de los años, los científicos han indagado sobre el concepto de que "*los ojos son el espejo del alma*", en busca de evidencias científicas que determinen si la investigación

ocular podría ser útil para la investigación del cerebro y el diagnóstico de sus enfermedades <sup>155</sup>.

La retina y el nervio óptico son una proyección embrionaria del diencefalo, y por lo tanto se consideran parte del sistema nervioso central (SNC). La retina está compuesta por capas de neuronas especializadas que están interconectadas a través de las sinapsis. La luz que entra en el ojo es capturada por las células fotorreceptoras en la capa más externa de la retina, lo que inicia una cascada de señales neuronales que finalmente llegan a las células ganglionares de la retina (CGR), cuyos axones forman el nervio óptico. Estos axones se extienden hasta el núcleo geniculado lateral (NGL) del tálamo y al colículo superior (CS) en el cerebro medio, cuya información se transmite hacia centros de procesamiento visual más especializados que nos permiten percibir una imagen de nuestro mundo <sup>155,156</sup>.

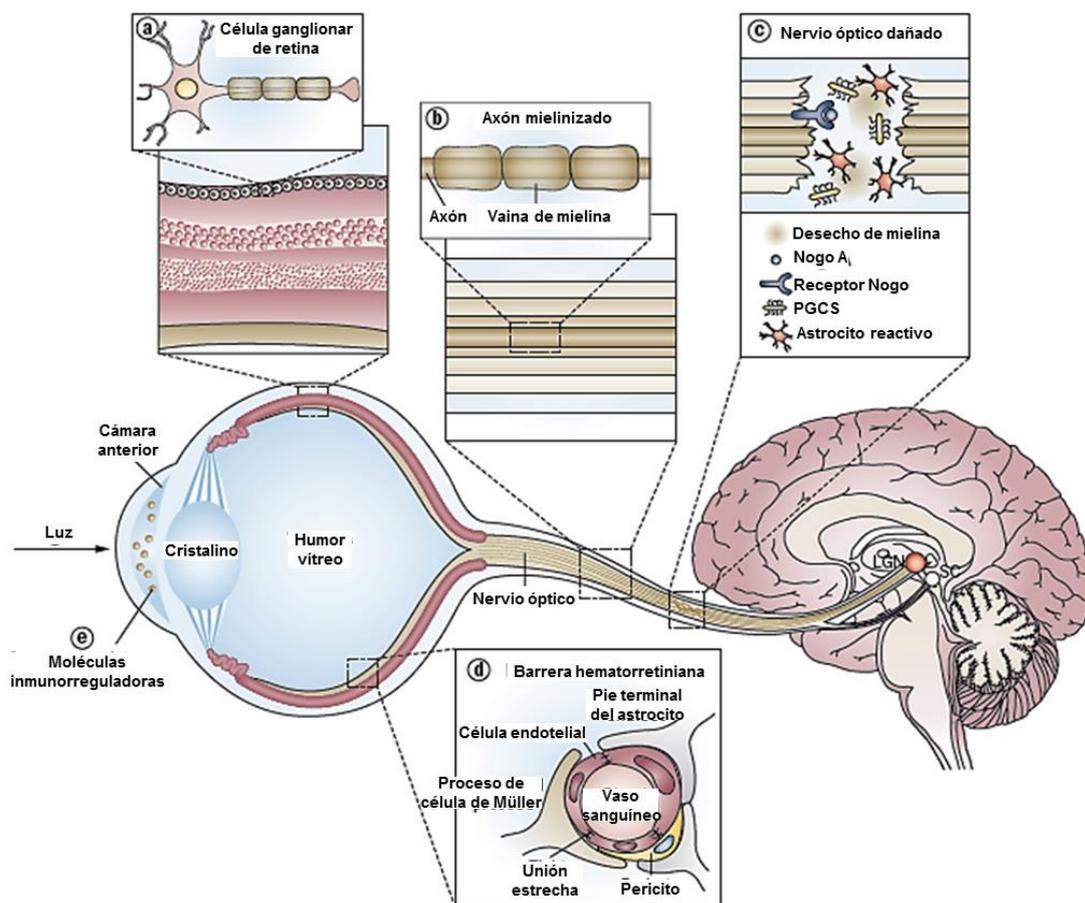
A pesar de la diversidad de su morfología <sup>157</sup>, las CGR presentan las propiedades típicas de las neuronas del SNC, y generalmente tienen un cuerpo celular, dendritas y un axón. La mayor parte de los axones de las CGR se unen para formar el nervio óptico. Después de atravesar la lámina cribosa en su salida del globo ocular, el nervio óptico, de la misma forma que el resto de nervios del SNC, está cubierto de una vaina de mielina producida por los oligodendrocitos, estando rodeado por las tres capas meníngeas.

Al igual que una agresión a los axones del SNC, una agresión en el nervio óptico puede dar como resultado una degeneración retrógrada y anterógrada de los axones dañados, la formación de cicatrices, una destrucción de la mielina, y la creación de un entorno neurotóxico que implique estrés oxidativo, privación de factores neurotróficos, niveles de neurotransmisores excitotóxicos, y la agregación anormal de proteínas y desechos. Tal entorno hostil a menudo provoca la muerte de las neuronas vecinas, que previamente se salvaron del daño inicial, fenómeno que es denominado degeneración secundaria <sup>158-163</sup>.

En el SNC, incluyendo el nervio óptico, la regeneración axonal después de una lesión es limitada. De hecho, gran parte de nuestro conocimiento sobre la respuesta axonal al trauma del SNC, ha surgido de los estudios del nervio óptico <sup>164-170</sup>. Los factores considerados responsables de la creación de un entorno que es no permisivo para el crecimiento axonal son comunes entre el nervio óptico lesionado y otros axones del SNC. Los primeros descubrimientos de regeneración de los axones del SNC en presencia de injertos de nervios periféricos fueron realizados en modelos de corte transversal del

nervio óptico y de lesión de la médula espinal <sup>164,165,171</sup>, destacando que existen similares condiciones restrictivas de crecimiento en estas dos estructuras del SNC (Figura 23).

El ojo, particularmente la retina, como una parte del SNC debe mantener interacciones reguladas con el sistema inmune, y es, de hecho, un sitio con privilegio inmunológico. El globo ocular se compone de estructuras físicas únicas, una colección local de moléculas de superficie y citoquinas, siendo la sede de respuestas inmunes especializadas, similares a las observadas en el cerebro y en la médula espinal <sup>172,173</sup>. El ojo también presenta una barrera hemato-retiniana que comparte estructura, características y mecanismos con la barrera hemato-encefalica (Figura 23).



**Figura 23. El ojo como una extensión del sistema nervioso central. Modificado de London et al., 2013** **A.** Las capas de la retina se componen de varios tipos neuronales incluyendo las células ganglionares de la retina, que comparten estructura morfológica con otras neuronas del sistema nervioso central. **B.** Los axones de estas células están mielinizados por oligodendrocitos posteriormente al globo, formando el nervio óptico, el cual se extiende hasta el NGL y CS del cerebro. **C.** Una lesión en el nervio óptico produce, de una manera similar a otras neuronas del sistema nervioso central, un entorno que es hostil tanto para la supervivencia de las neuronas que se salvaron en la agresión primaria y que inhibe la regeneración de los axones cortados. **D, E.** Similar al SNC, el ojo tiene una relación

única con el sistema inmune que consiste en barreras especializados tales como la barrera hematorretiniana interna, que comparte características con la barrera hemato-encefálica del SNC.. **Abreviaturas:** CSPG, proteoglicanos condroitín sulfato, NGL, núcleo geniculado lateral; NgR, receptor Nogo, CS, colículo superior.

La cámara anterior del ojo está llena de humor acuoso, un fluido enriquecido con mediadores antiinflamatorios e inmunorreguladores y que sería como una reminiscencia del líquido cefalorraquídeo que circula alrededor del cerebro y del parénquima de la médula espinal <sup>174,175</sup>. Además de estas similitudes con el SNC, el inmunoprivilegio ocular implica un fenómeno único denominado desviación inmune asociada a la cámara anterior, en el que células presentadoras del antígeno que entran en la cámara anterior del ojo, capturan al antígeno y luego migran al bazo, donde se convierten los leucocitos efectores en leucocitos reguladores. Este proceso, establece una respuesta inmune estrechamente regulada hacia antígenos oculares <sup>172</sup>. Estos mecanismos descritos anteriormente, en combinación, permiten al ojo beneficiarse de una maquinaria de defensa inmune que evitaría asimismo el riesgo de daño a los tejidos debido a una inflamación incontrolada <sup>155</sup> (Figura 23).

Teniendo en cuenta las características comunes de los ojos y del resto del SNC, gran parte de lo que se aprende en la investigación ocular puede ser aplicable al cerebro y la médula espinal, y viceversa. Como ya se ha mencionado, las similitudes entre el ojo y otras estructuras del SNC hacen del ojo un modelo viable para el estudio del SNC ya sea en paciente enfermos o sanos.

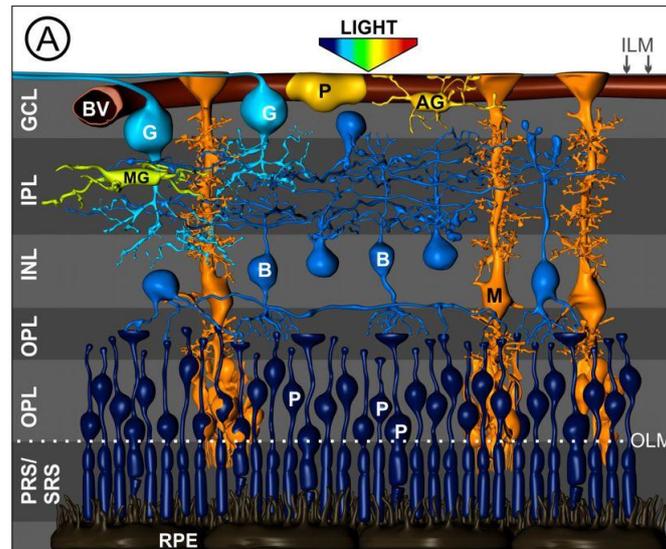
El ojo es un buen modelo para ello debido a una serie de razones <sup>155</sup>:

1. Comparado con otras estructuras del SNC, el ojo es relativamente accesible para su manipulación y observación *in vivo*.
2. Las neuronas de la retina son claramente reconocibles y la muerte neuronal puede ser directamente cuantificada.
3. La característica organización de la retina nos permite identificar las diferentes neuronas de la retina y sus interconexiones, en consecuencia, un daño que produce un cambio en la retina puede ser fácilmente detectable.

4. La administración de diversos compuestos (ya sea terapéutico o experimental) al ojo es relativamente simple, y las inyecciones en el vítreo o el espacio subretiniano se pueden realizar sin penetrar directamente en el parénquima retiniano.
5. El nervio óptico consta de un largo tracto continuo de axones que son ininterrumpidos por interneuronas, lo que hace que sea ideal para los estudios de regeneración.
6. Debido a que la retina tiene un compartimiento neuronal bien definido, se puede aislar y usar para el estudio de los mecanismos moleculares patológicos y la reacción a diversos agentes farmacológicos, ya sea utilizando cultivos de explantes de retina o a través de inmunohistoquímica en montaje plano y cortes histológicos.

### **2.6.1 La retina**

La retina es la túnica más interna del ojo que está considerada como una extensión del SNC que es fotosensible. Las retinas de los vertebrados están compuestas por diferentes tipos celulares que están interconectados entre sí <sup>176</sup>. En la retina existen diferentes tipos de neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células interplexiformes y las CGR) que están dispuestas de una manera ordenada en el tejido dando lugar a la estratificación de la retina en 10 capas (3 capas nucleares y 2 capas plexiformes donde se forman las sinapsis).



**Figura 24. Esquema de la retina de los vertebrados.** Los somas se encuentran en tres capas nucleares, la capa de células ganglionares de la retina (GCL), la capa nuclear interna (INL) y la capa nuclear externa (ONL). Los fotorreceptores (P) están altamente empaquetados en la porción inferior, por lo que la luz debe atravesar toda la retina para llegar hasta ellos. Los contactos sinápticos que median la información tienen lugar en la capa plexiforme interna (IPL) y en la capa plexiforme externa (ONL). Las células de la macroglía son los astrocitos (AG) y las células de Müller (M) y la microglía (MG), que se sitúa en las capas plexiformes y la capa de fibras. Modificada de Reichenbach and Bringmann, 2010 <sup>177</sup>.

Estas capas son:

1. Epitelio pigmentario de retina (EPR): es la capa más externa de la retina que está en contacto con la Membrana de Bruch de la coroides. Está formada por una monocapa de células epiteliales altamente pigmentadas.
2. Capa de fotorreceptores: en ella se encuentran los segmentos externos de los fotorreceptores (conos y bastones).
3. Membrana limitante externa: está formada por los pies terminales de las células de Müller.
4. Capa nuclear externa (CNE): en ella se encuentran los cuerpos celulares de los bastones y los conos.
5. Capa plexiforme externa (CPE): formada por las sinapsis entre las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares (que están

dispuesta de forma radial en la retina), las células horizontales (dispuestas de forma paralela a las capas de la retina) y las células interplexiformes.

6. Capa nuclear interna (CNI): constituida por los núcleos de las bipolares, horizontales, amacrinas y células de Müller.
7. Capa plexiforme interna (CPI): está formada por los axones de las células bipolares que sinaptan con las dendritas de las CGR y con las prolongaciones de las amacrinas.
8. Capa de células ganglionares (CCG): como su nombre indica reúne los núcleos de las CGR y las células amacrinas desplazadas.
9. Capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR): integrada por los axones de las CGR.
10. Membrana limitante interna (MLI): es la capa más interna de la retina y está formada por los pies terminales de las células de Müller dispuestos sobre una membrana basal que se encuentra en contacto con el vítreo.

Finalmente, toda la información recogida tras este procesamiento neuronal es transmitido al cerebro mediante los axones de las células ganglionares que forman el nervio óptico.

En la retina, además de todas las neuronas implicadas en el proceso de procesamiento y transmisión del impulso nervioso, también se encuentran las células gliales, que son necesarias para el mantenimiento y correcto funcionamiento de las neuronas retinianas, y las células que constituyen los vasos sanguíneos (células endoteliales y pericitos).

### **2.6.2 La glía retiniana**

Las células de la glía, durante un gran periodo de tiempo, se han considerado elementos puramente pasivos del SNC. Sin embargo, su proximidad a las neuronas y los vasos sanguíneos los involucra en tareas vitales que son esenciales para la supervivencia neuronal <sup>178,179</sup>.

En la retina humana se han encontrado tres tipos básicos de células gliales: las células de Müller, los astrocitos y la microglía, todos ellos ya descritos por Cajal y por del Río-Hortega hace más de 100 años <sup>176,180</sup>.

Las células gliales de la retina pueden establecer importantes comunicaciones entre ellas, sugiriéndose que funcionan como mediadores de las interacciones neurona-glia, actuando como sensores para las señales de neurotransmisión, contribuyendo al mantenimiento de la actividad neuronal y homeostasis en el SNC <sup>181</sup>.

### ***2.6.2.1 Macroglía***

Las células macrogliales de la retina están formada por las células de Müller y los astrocitos. Estas células cumplen funciones claves para el mantenimiento y supervivencia de las CGR <sup>182,183</sup>. Por su estrecha relación con los vasos sanguíneos y los axones, pueden almacenar glucosa en forma de glucógeno para ser suministrado posteriormente durante situaciones de estrés neuronal <sup>179,184</sup>.

La macroglía interviene en el mantenimiento del equilibrio iónico del sodio y del potasio, y en el metabolismo de neurotransmisores como el glutamato <sup>185-187</sup>. Entre otras funciones producen el factor de crecimiento fibroblástico básico, el factor de transformación de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) o factores de supervivencia neuronal como el factor de crecimiento nervioso (NGF) <sup>188,189</sup>. Suministran factores antioxidantes, y además son los inductores de las propiedades de barrera hemato-retiniana ya que liberan sustancias que estabilizan las uniones estrechas de las células endoteliales vasculares <sup>190</sup>.

Ante una situación de estrés, la macroglía se vuelve reactiva, caracterizándose por una hipertrofia, una hiperplasia y un incremento de la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) <sup>78,179,191,192</sup>. Esta activación generada de forma moderada y transitoria puede tener una función protectora gracias al suministro de ciertos metabolitos, factores de crecimiento y otras sustancias antiinflamatorias, así como la eliminación de sustancias neurotóxicas del medio (como por ejemplo la recaptación del glutamato) en un intento de promover la reparación del tejido retiniano <sup>187,191</sup>.

Por otro lado, la activación macroglial crónica provoca una serie de cambios en la retina que puede conducir a las disfunción y muerte de las CGR <sup>193</sup>. Entre estos cambios se encuentran el aumento de radicales libres <sup>187,194</sup>, la presencia de citoquinas inflamatorias <sup>195-197</sup>, la pérdida de la homeostasis del glutamato <sup>198,199</sup>, y la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno (MHC-II) <sup>192</sup>.

El tipo de célula microglial mayoritaria en la retina es la **célula de Müller**. Estas células asumen muchas de las funciones llevadas a cabo por astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales en otras regiones del SNC<sup>200</sup>. Las células de Müller presentan unos procesos que se extienden radialmente a través de las capas de la retina proporcionando apoyo arquitectónico a las neuronas. Son responsables del mantenimiento homeostático y metabólico, estando también involucradas en la actividad sináptica y contribuyendo al aumento de la absorción de fotones por los conos<sup>201-203</sup>.

Los **astrocitos** de la retina presentan cuerpos celulares aplanados de los que parten prolongaciones radiales. El citoplasma de estas células tiene numerosos filamentos intermedios constituidos por la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), lo que permite ponerlos de manifiesto cuando se utilizan anticuerpos frente a la GFAP<sup>204</sup>. Los astrocitos también ejercen un papel de soporte estructural y están implicados en la modulación de la actividad neuronal en la retina. Su distribución no es uniforme a lo largo de la retina, con una mayor densidad en la región del nervio óptico, donde se distribuyen siguiendo la red vascular y son parte integrante de la barrera hemato-retiniana<sup>201</sup>. Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongados a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica. No existen astrocitos a nivel de la fóvea avascular ni de la ora serrata<sup>204-206</sup>.

### **2.6.2.2 Microglía**

Las células microgliales son los monocitos residentes del SNC, incluyendo la retina. La microglía tiene como función principal en el SNC la continua vigilancia del parénquima nervioso para la limpieza del tejido, así como la limitación de las consecuencias neurodegenerativas que provocan las condiciones de estrés<sup>180,207</sup>.

La microglía se distribuye uniformemente por toda la retina desde la zona central hasta la periferia. Se encuentra en las capas CFNR-CCG, CPI y CPE. La mayor parte de la microglía presenta una morfología ramificada. En general, la microglía tiene soma pequeño ovoidal o triangular de la cual salen varios procesos primarios que posteriormente se dividen para formar los secundarios. En las capas CFNR-CCG, CPI y CPE, los somas y procesos de la microglía ramificada se disponen paralelamente a la superficie de la retina. En las capas plexiformes, la microglía ramificada se distribuye en forma de mosaico, sin superposición entre las células vecinas<sup>208</sup>.

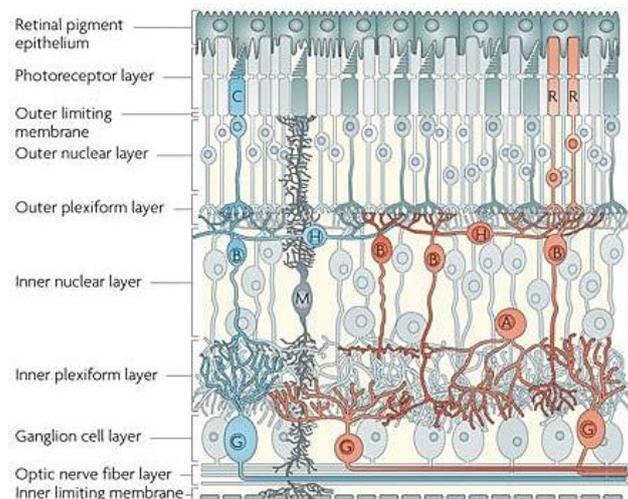
En general, la microglía se pueden dividir en dos fenotipos, en reposo y reactivo, dependiendo de la situación del microambiente circundante. Las células microgliales en reposo monitorean constantemente el parénquima y, en respuesta a las condiciones de estrés, adoptan un fenotipo reactivo, caracterizado por alteraciones de la morfología celular, cambios en la estructura de los procesos celulares, cambios de la distribución de la microglía en el tejido, características migratorias, proliferación, expresión de varios factores de crecimiento y citoquinas, o capacidad fagocítica<sup>208</sup>. Asimismo, la microglía puede actuar como célula presentadora de antígenos por la sobreexpresión de MHC-II<sup>192</sup>. Esta capacidad va a controlar la transición desde una inmunidad innata a una inmunidad adaptativa<sup>209,210</sup>.

En la EA, el estudio de la microglía se ha centrado principalmente en el cerebro debido a que no se conocía la relación con otras estructuras del SNC, como es el ojo. En el cerebro de los modelos animales con EA, la microglía inicialmente reacciona contra el daño neuronal tratando de resolver la inflamación, mostrando un fenotipo antiinflamatorio; luego, durante la progresión de la enfermedad, la microglía adquiere y permanece en un fenotipo proinflamatorio caracterizado, entre otros, por la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que provocan la muerte neuronal<sup>211</sup>.

En los cerebros de pacientes con EA la microglía reactiva rodea los depósitos de A $\beta$  y contribuyen a la limpieza de estos depósitos. Esta microglía también está asociada a la liberación de citoquinas proinflamatorias cuando la enfermedad progresa, así como a los procesos de *prunning* sináptico<sup>212</sup>.

### 2.6.3 La vía visual

La información visual recogida por los fotorreceptores (bastones, sensibles al contraste, y conos, sensibles al color) pasa a través CPI de la retina (células bipolares, horizontales y amacrinas) hacia la CCG (células enanas, parasol, y biestratificadas)<sup>213</sup> (Figura 25).

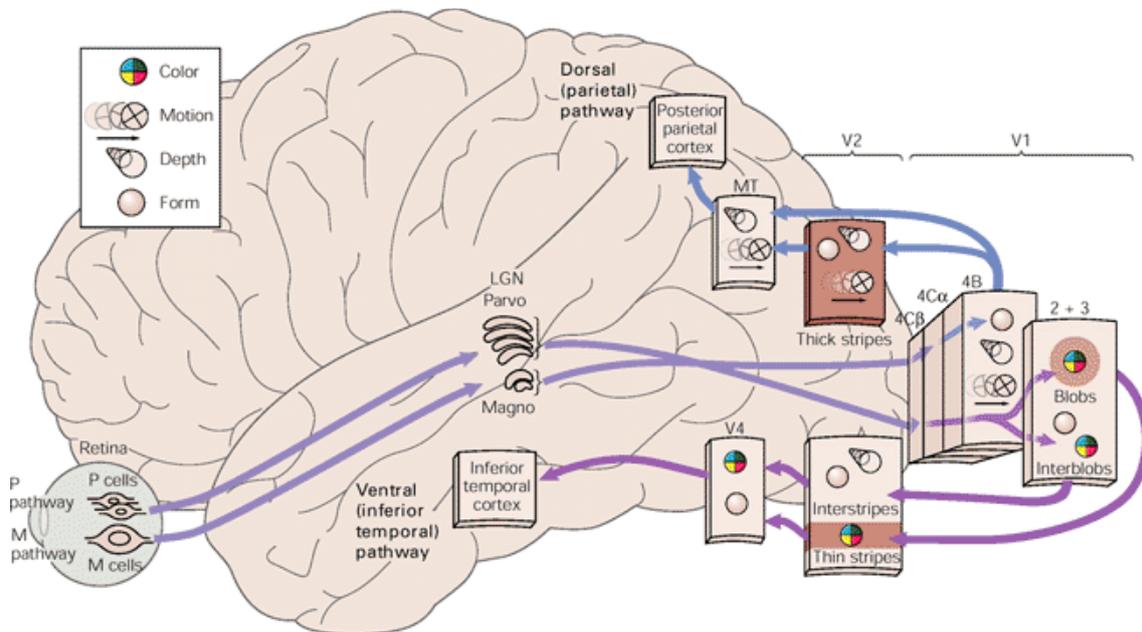


**Figura 25. Organización de los circuitos de la retina.** Los fotorreceptores bastón (R) y cono (C) tienen los cuerpos celulares (CB) en la capa nuclear externa y extienden los segmentos internos (IS), que contienen el mecanismo metabólico, y los segmentos externos (OS), que se asocian con las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Los axones de los fotorreceptores terminan en la capa plexiforme externa y hacen sinapsis con las células horizontales (H) y bipolares (B) en la capa nuclear interna, que también contiene Glía de Müller (M) y células amacrinas (A). Las células bipolares transmiten señales a las células amacrinas y ganglionares (G) a través de las sinapsis en la capa plexiforme interna. Los axones de las células ganglionares proyectan hacia la cabeza del nervio óptico y llevan señales al cerebro. Los pies terminales de la glía Müller forman las membranas limitantes externas e internas. Están representados un campo receptor de un cono en azul y de un bastón en naranja. Tomado de Swaroop, 2010 <sup>214</sup>.

La disposición de estos tres tipos distintos de CGR forma diferentes campos receptores, que ayudan en la segregación y la codificación de la información visual <sup>215</sup>. Estas CGR a continuación se proyectan a través de distintas vías (Parvocelular, Magnocelular, y Koniocelular) hacia la región sub-cortical del NGL y también sobre el área cortical V1 <sup>215-217</sup>. La vía P recibe la información del color y de la forma desde las células enanas, la vía K recibe información de color oponente azul-on/amarillo-off desde las células biestratificadas y la vía M lleva la información de luminancia y de movimiento a partir de las células parasol. La información visual que ha sido por lo tanto segregada en V1, se proyecta hacia la región de procesamiento V2 <sup>215,218,219</sup> (Figura 26).

El color y la orientación y la información de frecuencia espacial siguen ventralmente a través de V2 y V4. Esta vía continúa a la corteza temporal inferior, donde progresivamente, se llevan a cabo aspectos más complejos del procesamiento visual de objetos, tales como la percepción de caras. Un proceso ascendente de información del

movimiento y de la localización sigue una vía dorsal a través de V2 y V3. El área dorsal de V3 parece estar especializada en la detección del movimiento global <sup>220,221</sup>. V5 está especializada en el movimiento local <sup>222</sup>. La vía dorsal continúa hacia la corteza parietal posterior, donde se llevan a cabo los aspectos complejos de la percepción del espacio, como la percepción de los detalles de una escena como una percepción integrada <sup>221</sup> (Figura 26).



**Figura 26. Posibles funciones mediadas por las dos vías que conectan los centros de procesamiento visual en la corteza cerebral.** Los iconos representan las propiedades fisiológicas sobresalientes de las células en estas áreas. En la parte superior es la vía que se extiende a la corteza parietal posterior, que se cree que esta particularmente involucrada en el procesamiento del movimiento, la profundidad y la información espacial. En la parte inferior está la vía a la corteza temporal inferior, que está más dedicado a la percepción de la forma y el color. Estas dos vías corticales son las vías P y M de la retina. (MT = media temporal; LGN = núcleo geniculado lateral). Tomado de Van Essen et al., 1994 <sup>223</sup>.

La EA puede afectar a diferentes aspectos del procesamiento visual, en consonancia con el impacto de la enfermedad en las regiones dorsales y ventrales. Los pacientes que tienen dañada la región dorsal tienen afectadas funciones como la discriminación angular y la percepción del movimiento <sup>224-227</sup>, y si lo que está dañado es la región ventral, se produce un deterioro en la discriminación de caras, colores y formas <sup>228-230</sup>.

## 2.6.4 Manifestaciones oculares en desórdenes del SNC

Debido a que el ojo es una extensión del cerebro, buscar manifestaciones oculares en patologías cerebrales parece razonable. De hecho, se han detectado varios cambios oculares, que se han caracterizado a través de evaluaciones oftalmológicas en pacientes con trastornos del SNC tales como EA, ictus, esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Parkinson (EP). Aunque algunas manifestaciones oculares no son específicas de una enfermedad en particular y su existencia hace hincapié en el fuerte vínculo entre la retina y el cerebro. Además, en muchos de estos trastornos, las manifestaciones oculares preceden a menudo a los síntomas cerebrales, lo que parece indicar que las exploraciones oculares podrían ofrecer un medio de diagnóstico precoz<sup>155</sup>.

### 2.6.4.1 Ictus

Los estudios prospectivos han demostrado que las anomalías microvasculares retinianas, incluyendo: la formación de cruces arteriovenosos, las hemorragias y el estrechamiento arteriolar, podrían predecir el riesgo de cambios isquémicos cerebrales (tales como infartos cerebrales y lesiones en la sustancia blanca), y de ictus<sup>231-234</sup>. Además, la presencia de cruces arteriovenosos en la retina estaba vinculada a un mayor riesgo de infarto cerebral, especialmente cuando tales anomalías retinianas se asociaron con lesiones en la materia blanca cerebral, una característica que suele ser predictiva de ictus<sup>231-234</sup>. Más allá de estos estudios prospectivos, los estudios de los ojos en modelos animales han puesto de manifiesto que el accidente cerebrovascular se asocia con el deterioro funcional de la retina, incluyendo adelgazamiento de las capas de la retina, gliosis reactiva, aumento de la expresión de genes asociados con la lesión celular, suministro restringido de oxígeno, fragmentación del ADN, y neurodegeneración del nervio óptico (Figura 27a)<sup>235</sup>.

Las manifestaciones oculares son de esperar en el accidente cerebrovascular, debido a que los pequeños vasos de la retina y del cerebro tienen orígenes embriológicos, características anatómicas y propiedades fisiológicas similares<sup>236,237</sup>. La disfunción de la barrera hematoencefalica y de la barrera hematorretiniana se sospecha que tienen un papel central en el desarrollo de la microangiopatía cerebral y retiniana, respectivamente<sup>155,173,238</sup>.

Es importante destacar que, mientras que la rotura de la barreta hemato-encefálica normalmente permanece sin ser detectada hasta que se ha producido un marcado edema vasogénico y el consecuente daño cerebral, los cambios en la vascularización de la retina pueden ser visualizados en el proceso temprano de la enfermedad, y de una manera directa y no invasiva en el estudio del fondo de ojo <sup>231</sup>.

#### **2.6.4.2 Esclerosis múltiple**

En la EM la disfunción visual es una de las principales causas de discapacidad. La pérdida visual es un síntoma que se presenta hasta en el 50 % de los pacientes con EM, desarrollándose cierto grado de discapacidad visual a lo largo del curso de la enfermedad en la mayoría de los casos <sup>239-241</sup>.

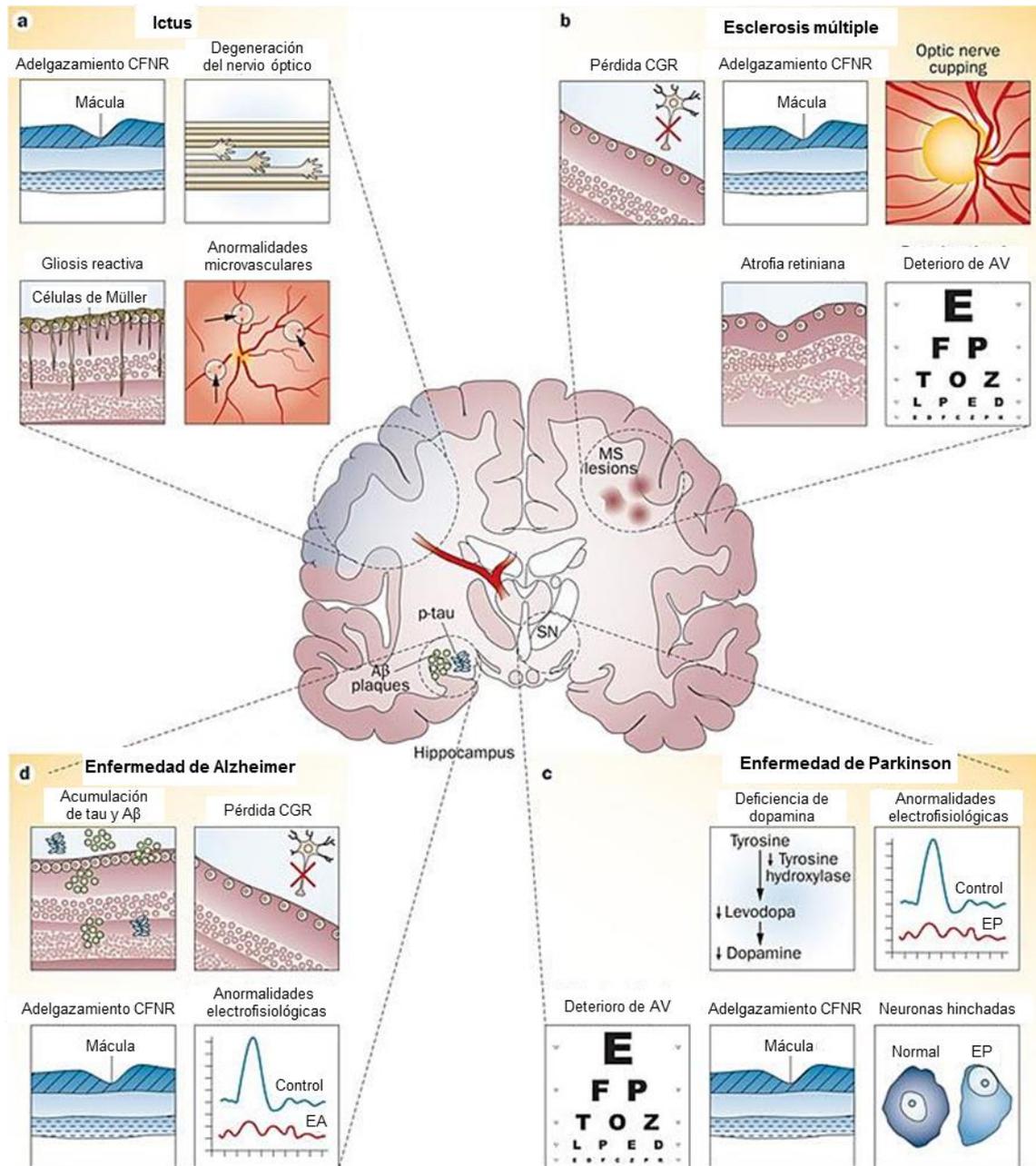
No es sorprendente que la EM se relacione con la patología ocular dado que los componentes de la mielina, los cuales son esenciales tanto en el cerebro como en la vía visual, son los principales objetivos del daño autoinmune en la EM. Los defectos visuales son normalmente el resultado de la desmielinización de los axones a lo largo de la vía visual <sup>242</sup>. Se ha comprobado que zonas internas de la retina, que no están asociadas a la mielina, también se ven afectadas en la EM, lo que sugiere que la respuesta autoinmune se dirige también contra otros antígenos en el ojo <sup>243</sup>.

La neuritis óptica retrobulbar, una neuropatía óptica inflamatoria asociada con desmielinización y degeneración de las CGR, se diagnostica en el 75 % de los pacientes con EM, y a menudo es el primer síntoma que se presenta en esta enfermedad <sup>242,244,245</sup>. Es importante destacar que los déficits visuales en EM también ocurren en pacientes sin un diagnóstico de neuritis óptica. Diversos estudios han observado que, aunque los valores de la AV no se vean alteradas <sup>246-248</sup>, un descenso en la SC se produce en estos pacientes <sup>246,248</sup>, así como la CFNR es más delgada que en los individuos sanos <sup>248,249</sup>, ocurriendo la disminución de esta capa tanto a nivel peripapilar <sup>250-254</sup> como a nivel macular <sup>252,253,255</sup> (Figura 27b). Por otra parte, en los pacientes con EM, la disminución de espesor de la CFNR se correlaciona directamente con la progresión del deterioro neurológico y con duración de la enfermedad <sup>248</sup>.

### 2.6.4.3 Enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo crónico que se asocia principalmente con disfunción motora, pero también implica síntomas no motores que pueden incluir déficits visuales. Tales deficiencias pueden manifestarse como disminución de la SC <sup>256,257</sup>, alteración en la visión del color (primeramente se ve alterado el eje tritán) <sup>256</sup>, y respuestas anormales en las pruebas electrofisiológicas <sup>256,257</sup>.

Las retinas de los pacientes con EP presentan alteración de los fotorreceptores y CGR, así como un deterioro morfológico del plexo dopaminérgico perifoveal <sup>258</sup> con adelgazamiento de la CFNR <sup>257,259-262</sup>. De acuerdo con la hipótesis de que la enfermedad es consecuencia de un desequilibrio de la dopamina, parece que los déficits visuales en la EP también serían causados por un déficit dopaminérgico, dando como resultado una reducción de expresión de la tirosina hidroxilasa, enzima que limita la velocidad en la síntesis de dopamina (Figura 27c) <sup>263</sup>. De hecho, algunos de los déficits visuales que presentan los pacientes con EP pueden mejorar mediante el tratamiento con levodopa <sup>264</sup>.



**Figura 27. Manifestaciones oculares en enfermedades neurodegenerativas.** Principales trastornos del SNC que presentan manifestaciones oculares que reflejan el estado del cerebro y, a menudo, preceden al diagnóstico convencional. **A.** Accidente cerebrovascular. **B.** Esclerosis múltiple. **C.** Enfermedad de Parkinson. **D.** Enfermedad de Alzheimer. Abreviaturas: A $\beta$ ,  $\beta$ -amiloide; p-tau, tau fosforilada; EA, Enfermedad de Alzheimer; EP, Enfermedad de Parkinson; CFNR, capa de fibras nerviosa de retina; CGR, células ganglionares de retina; SN, sustancia nigra. Modificado de London et al., 2013<sup>155</sup>.

#### ***2.6.4.4 Enfermedad de Alzheimer***

Las primeras anomalías en el sistema visual en la EA fueron observadas en la década de los 70, e inicialmente fueron consideradas estrictamente como una disfunción a nivel cortical. Los estudios, a lo largo de los últimos 20 años, han revelado que todas las partes del sistema visual podrían estar afectadas, incluyendo el nervio óptico y la retina (Figura 27d). Algunos aspectos de esta implicación todavía no se entienden bien y están siendo sujeto de investigaciones recientes. En esta patología se han observado cambios anatómicos a lo largo de toda la vía visual y sus correspondientes cambios funcionales, que se han analizado mediante procedimientos psicofísicos. A continuación, se describe en los siguientes apartados los cambios observados en los últimos 20 años en la EA tanto en la vía visual como en su procesamiento.

### **2.7 Fisiopatología de la EA en la vía visual en humanos y modelos experimentales de EA.**

Los cambios en el sistema visual asociados con la EA, han sido de interés en la comunidad científica a lo largo de muchos años con extensas revisiones disponibles, centradas en diferentes aspectos del problema <sup>124,155,265-295</sup>. Todas estas evidencias dan énfasis a que los cambios visuales pueden ayudar en la práctica médica a la evaluación de este tipo de pacientes e incluso aportar un valor predictivo, llegando a considerarse potencialmente herramientas para el diagnóstico.

Se han mostrado notables similitudes entre la EA y otras patologías neurodegenerativas <sup>296-298</sup>. Todas comparten características biológicas comunes: son enfermedades neurodegenerativas lentas relacionadas íntimamente con el envejecimiento, tienen mecanismos similares de lesión celular y de depósitos proteicos en áreas anatómicas específicas <sup>299-301</sup>; y en ellas ocurre la muerte en una o más poblaciones neuronales (neuronas del hipocampo y de la corteza en EA) <sup>302</sup>. Aunque el mecanismo exacto que provoca esta muerte neuronal no es conocido, estas patologías neurodegenerativas parecen compartir mecanismos patogénicos, los cuales incluyen estrés oxidativo <sup>303</sup>, disfunción mitocondrial <sup>304-306</sup>, alteraciones del sistema ubiquitina-proteosoma <sup>307</sup>, acumulación de proteínas mal plegadas, excitotoxicidad por glutamato <sup>308,309</sup> y activación

glial<sup>310,311</sup>. Estos mecanismos pueden actuar de forma individual o de manera sinérgica<sup>292,301</sup>.

### **2.7.1 Cristalino y humor vítreo y acuoso en la EA**

Los depósitos de A $\beta$  en el cerebro son un referente patológico de EA. Además de en las capas retinianas, los estudios sugieren que el A $\beta$  también se acumula en los fluidos oculares<sup>312-314</sup>. Prakasam et al., mostraron que los niveles de APP soluble son más altos en el vítreo en comparación con el humor acuoso y que el A $\beta_{42}$  era un 50% más bajo en el humor acuoso que vítreo, sugiriendo un movimiento libre de A $\beta$  entre la cavidad posterior y anterior<sup>314</sup>. También se ha encontrado que la concentración de A $\beta$  en el humor acuoso es comparable con la que se encuentra en el cortex cerebral y en el fluido cerebroespinal y han sido identificados en el cristalino de humanos los depósitos de A $\beta_{42}$  y A $\beta_{40}$ <sup>312</sup>. También se ha descubierto recientemente que hay un aumento de los depósitos de A $\beta$  en las fibras supranucleares del cristalino lo cual puede tener relación con las cataratas supranucleares ecuatoriales encontradas con más prevalencia en estos pacientes<sup>315</sup>. Por otro lado el estudio de Bei et al. determinó que la medida del grado de cataratas o de opacidad del cristalino era poco probable que proporcionara una medida no invasiva del riesgo de desarrollar una demencia de tipo Alzheimer<sup>316</sup>.

### **2.7.2 Retina en la EA**

#### **2.7.2.1 Células ganglionares de la retina en la EA**

Las CGR son las últimas neuronas dentro de la vía vertical de señalización retiniana. Se encuentran situadas mayoritariamente en la CCG y sus axones constituyen el nervio óptico, a través del cual viaja el impulso nervioso hacia el CGL y posteriormente al cerebro.

Un 44% de los núcleos situados en la CCG de la retina corresponden a las CGR, mientras que el resto corresponden a somas de otras células desplazadas a esta capa<sup>317</sup>.

Los primeros estudios histopatológicos realizados en retinas humanas de cadáveres de enfermos con EA fueron realizados en la década de los 80. En ellos el equipo de Hinton et al.<sup>318</sup> examinó 4 ojos de pacientes con EA, encontrando una pérdida de número de

CGR, aunque no proporcionaba valores numéricos en sus resultados. Sin embargo, Curcio et al.<sup>319</sup> en sus estudios no encontró diferencias significativas en el número de CGR entre el grupo con EA y los controles pareados por edad.

Blanks et al.<sup>320,321</sup> a mediados de la década de los 90 amplió las observaciones iniciales de Hinton et al., comparando el número de CGR entre 12 retinas de 9 pacientes post-mortem con EA severa y 15 retinas de 12 controles pareados por edad. En estos estudios se encontró que existía un descenso de un 25% del número de CGR y un aumento de la ratio de astrocitos por neurona de un 82% en la retina.

Por otra parte, estudios realizados en ratones transgénicos (TgF344-AD) no observaron una diferencia significativa en el número de CGR comparado con los controles<sup>322,323</sup>.

Hasta la fecha todos los estudios histopatológicos llevados a cabo implican un número relativamente pequeño de sujetos y por lo tanto sería recomendable que se llevaran a cabo más estudios con mayor número de sujetos para ratificar la disminución de CGR en EA.

La presencia de placas de A $\beta$  en la CCG puede explicar la degeneración de las ganglionares durante la EA<sup>318,324</sup>. De hecho, se ha demostrado que la mayoría de las placas de A $\beta$  presentes en la retina se encuentran en la CCG<sup>325</sup>. Los depósitos de A $\beta$  tienen un efecto neurotóxico sobre las CGR, ya que existen estudios que muestran que la inyección intravítrea de A $\beta$  en ratones induce una apoptosis de las ganglionares significativa, dependiente de la dosis y del tiempo<sup>326</sup>. El mismo estudio fue capaz de demostrar una co-localización del A $\beta$  y células apoptóticas en la CCG. Hay evidencias que sugieren que la expresión de A $\beta$  es mayor en la retina central que en la periférica en un modelo de EA<sup>327</sup>.

Más recientemente, algunos autores han estudiado las células ganglionares de la retina melanopsínicas (CGRm) en las retinas de pacientes con Alzheimer<sup>328</sup>. Estas células representan una subpoblación de las CGR (entre 1-2%) y son intrínsecamente fotosensibles debido a la expresión del fotorpigmento melanopsina que es más sensible a la longitud de onda corta<sup>286,329</sup>. Las CGRm son las encargadas de enviar la información de la luz ambiente al cerebro a través de la vía neuronal monosináptica, conocida como tracto retinohipotalámico<sup>330</sup>, que se proyecta hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo<sup>331,332</sup>. La pérdida de las CGRm se ha descrito que ocurre relacionada con la edad<sup>333,334</sup>, en enfermedades como el glaucoma<sup>335</sup> y en la EA sugiriéndose que la

disfunción del ciclo circadiano en estos pacientes puede estar causada por la pérdida de estas células<sup>336,337</sup>. De hecho, la presencia de disfunción del ritmo circadiano en estadios tempranos de la EA puede ser un factor predictivo de peor pronóstico en pacientes con EA<sup>328</sup>. Además, estas neuronas son más sensibles que las CGR a los mecanismos neuropatológicos ya que se ha visto que existe una pérdida significativa de CGRm en EA aun cuando el conteo de CGR es normal<sup>328</sup>. También se ha visto que el declive cognitivo y la alteración del ritmo circadiano no progresan a la misma velocidad en los pacientes con EA<sup>286,338</sup>.

En los pacientes con EA, al realizar una evaluación cualitativa en secciones de retina a microscopía óptica, se ha observado que los somas de las CGRm son más pequeños y con dendritas más finas, lo que podría causar un posible empeoramiento de su función. En los cuerpos celulares aparece un manchado en forma de “parche” y en las dendritas una “atenuación focal”<sup>328</sup>.

A pesar de que la inmunoreactividad de las CGRm en las retinas de pacientes con EA tenía una distribución similar a los controles y estaban situadas entre la capa de células ganglionares y la capa limitante interna, la densidad de CGRm estaba reducida en las retinas de EA<sup>328</sup>.

Curiosamente la densidad de CGRm y el conteo axonal no tienen una correlación ni con la duración de la patología, ni con la puntuación de MMSE, ni con la severidad de la enfermedad<sup>328</sup>.

Oliveira-Souza en 2017, realizó un estudio mediante técnicas de inmunohistoquímica y de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) en ratones triple transgénicos Tg-SwDI en el cuál determinó que existían alteraciones en la retina de este modelo animal similares a las ocurridas en el cerebro<sup>339</sup>. Estos autores encontraron que había una disminución significativa en el número total de células presentes en la CCG en los ratones jóvenes y de mediana edad con EA; y que en la CNI y CNE el descenso era solo evidente para los ratones jóvenes. También observaron que se producía una astrogliosis en la CFNR en los ratones de mediana edad y los ancianos. En los ratones Tg-SwDI, la pérdida específica de las neuronas colinérgicas en la CCG de la retina de los ratones con mediana edad ocurría después de la pérdida de las no colinérgicas. Los autores postulaban que todos estos cambios podrían ser responsables, en parte, de los déficits visuales que ocurren en

la EA debido a que la acetilcolina es esencial en el procesamiento visual en las retinas sanas <sup>339</sup>.

### **2.7.2.2 La glía retiniana en la EA**

El papel de la glía en la EA se ha estudiado ampliamente en la patología a nivel cerebral, aunque en la patología de la retina no existen tantos estudios, sobre todo a nivel microglial.

La atrofia astrogliar se postula como una parte importante en la patogénesis de la EA. Primeramente, la atrofia de los astrocitos reduce la cobertura sináptica que afecta a la transmisión sináptica y a la homeostasis de los neurotransmisores <sup>340</sup>. En segundo lugar, esta atrofia provoca una disfunción de la unidad glio-vascular contribuyendo al componente vascular de la EA. En tercer lugar, estos astrocitos malfuncionantes pueden perjudicar el soporte metabólico neuronal, que de hecho se observa generalmente en la EA <sup>341</sup> (Figura 28). Todos estos cambios hacen que la transmisión sináptica esté debilitada y afectan a la plasticidad sináptica y son por lo tanto responsables del inicio del deterioro cognitivo observado en las etapas tempranas de la EA <sup>310</sup>. Los astrocitos reactivos acumulados alrededor de las placas amiloides son una característica histopatológica muy conocida de la EA y, en el pasado, a menudo se los consideraba un componente de la respuesta neuroinflamatoria neurotóxica <sup>342,343</sup>. Esporádicamente, en cortes cerebrales de un modelo de ratón con EA, también se demostró que los astrocitos degradan las placas de A $\beta$  <sup>344</sup> ralentizando la progresión de la EA <sup>310</sup>.

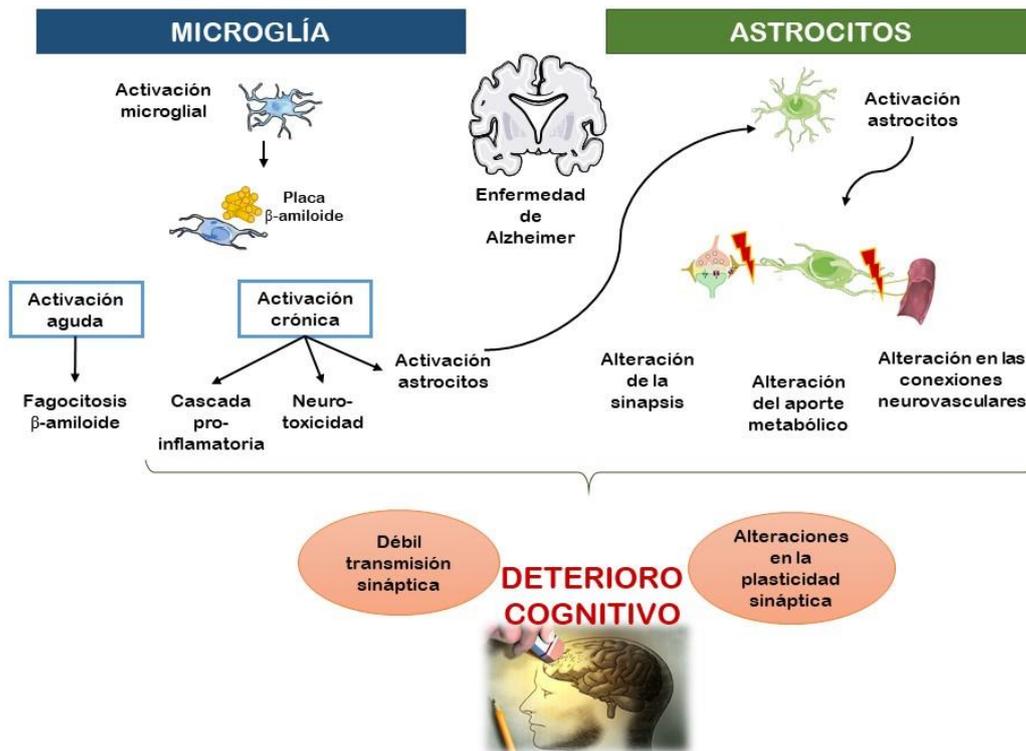


Figura 28. Respuesta glial en el cerebro en la Enfermedad de Alzheimer.

Se conoce que en el cerebro la microglía activada junto con las inmunoglobulinas y los componentes del complemento están estrechamente relacionados con los depósitos de A $\beta$  en los cerebros de los pacientes con EA y en modelos de ratón con EA<sup>345-350</sup>.

La microglía cerebral activada en la EA muestra un aumento de la proliferación<sup>351,352</sup> y un aumento de la expresión de marcadores inflamatorios tales como CD36, CD14, CD11c, MHC-II e iNOS<sup>353,354</sup>, así como marcadores del fenotipo M1<sup>350</sup>.

En el cerebro, la propagación trans-sináptica de la proteína tau se produce a través de las sinapsis. Sin embargo, la microglía también está implicada en la diseminación de los agregados tau a través de la endocitosis (a través de la fagocitosis) y la exocitosis (a través de los exosomas) en una vía de transmisión no sináptica<sup>355</sup>. Además, la microglía puede contribuir indirectamente a la muerte neuronal a través de la regulación de los astrocitos vecinos. Los factores inmunes derivados de la microglía pueden inducir un fenotipo de astrocito llamado A1, que contribuye a la muerte neuronal a través de un soporte trófico reducido, una capacidad de limpieza alterada y a la liberación de toxinas<sup>356</sup> (Figura 28).

En la patogénesis de la EA, la activación de la microglía en el cerebro puede jugar un papel doble: por un lado, la activación microglial aguda conduce a una disminución de A $\beta$  al aumentar la fagocitosis. Por el contrario, la activación crónica de la microglía contribuye a la neurotoxicidad y la pérdida de sinapsis desencadenando varias cascadas proinflamatorias <sup>350</sup>.

Respecto a los estudios realizados en las retinas de modelo de ratón transgénico de EA se ha encontrado que hay una sobre-regulación de la inflamación (evidenciada por la activación astrogliar y microglial) en relación con las placas de A $\beta$  <sup>274,292</sup>. Ning et al. observaron que existía un incremento relacionado con la edad de depósitos A $\beta$  en la retina del modelo de ratones dobles transgénicos APPswe/PS11E9. Este incremento fue acompañado por incrementos en la expresión de la citoquina inflamatoria MCP-1, el marcador microglial F4/80, y la presencia de células TUNEL-positivas en la CCG <sup>357</sup>. También ha sido sugerido que los depósitos de A $\beta$  en la retina tienen un papel importante en los procesos de inflamación y neurodegeneración de la EA. En el mismo modelo transgénico, Pérez et al. observaron una actividad microglial significativamente mayor que en los controles <sup>358</sup>, postulando que dicha activación microglial podría ocurrir en tiempos tempranos en la retina estando implicada en la eliminación de los depósitos A $\beta$ . Además, la microglía activada podría desencadenar una respuesta neuroinflamatoria, contribuyendo a una desorganización de la retina, como han demostrado las alteraciones funcionales del electroretinograma (ERG) de los pacientes de EA <sup>359</sup>. Esta respuesta neuroinflamatoria asociada con placas de A $\beta$  y proteína tau fosforilada (pTau), también se ha observado en ratones Tg2576AD. En estos animales, hubo un aumento significativo en las células Iba-1 (marcador microglial) y un aumento en la inmunoreactividad GFAP (marcador de astrocitos) <sup>325</sup>. La vacunación con el antígeno de oligómero A $\beta$  redujo los depósitos en la retina de los animales transgénicos. Sin embargo, los depósitos de A $\beta$  microvasculares, así como la infiltración microglial y astrogliosis, se incrementaron y se asociaron con la interrupción de la arquitectura de la retina <sup>325</sup>.

Otros estudios apoyan la participación de la neuroinflamación en la progresión de la EA. Estos estudios analizaron el papel del complemento en esta enfermedad <sup>274</sup>. Se han encontrado déficits en la expresión del gen del factor H del complemento (CFH) asociado con aumentos significativos de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> en cerebros y retinas de modelos transgénicos de EA <sup>360</sup>. El CFH funciona como un cofactor en la inactivación de C3b en la vía alternativa del complemento, y por lo tanto, niveles bajos de CFH provocan la

activación del complemento, desencadenando inflamación en la retina y en el cerebro <sup>361</sup>. En el modelo de rata transgénica (TgF344-AD) también se ha observado, que junto con los depósitos de A $\beta$ , existe un reclutamiento microglial y una activación del complemento en asociación con una disminución en la función visual <sup>322</sup>.

### **2.7.2.3 Placas de amiloide y ovillos neurofibrilares.**

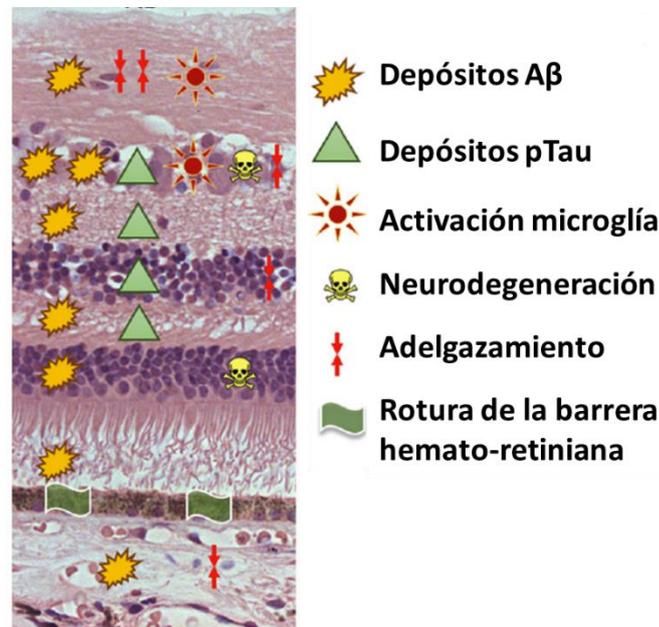
El gen de la APP localizado en el cromosoma 21q21 está altamente expresado en las CGR y en el EPR <sup>362,363</sup>. Las mutaciones en la codificación de la APP y también de la enzima presenilina promueven la producción de A $\beta$  a través del complejo de la  $\gamma$ -secretasa <sup>364</sup>. Además, las CGR y el EPR expresan  $\gamma$ -secretasa que las hace altamente susceptibles de sintetizar y secretar A $\beta$  <sup>314,362,363,365-367</sup>.

Los primeros intentos fallidos de observar placas de amiloide, anillos neurofibrilares o angiopatía vascular en la retina fueron realizados en 1989 por Blanks et al. <sup>368</sup>, sin embargo a pesar de no encontrar estos signos típicos de la EA, estos autores revelaron en sus hallazgos varios niveles de degeneración en las CGR correlacionados con el grado de afectación del paciente. Posteriormente, otro trabajo tampoco encontró depósitos de A $\beta$  en la retina sugiriendo que quizás no se deposita de igual manera que en el cerebro o su análisis se debe hacer con técnicas distintas a las empleadas en el cerebro <sup>323,369</sup>.

En 2003, Goldstein et al. <sup>312</sup> identificó A $\beta$  en el citosol de las células de las fibras del cristalino en pacientes con EA, siendo observado posteriormente por otros trabajos <sup>370,371</sup>. Este A $\beta$  puede fomentar la agregación de las proteínas en una región específica dando lugar a cataratas supranucleares en la EA. En contraste con estos resultados otro trabajo no encontró inmunoreactividad A $\beta$  en el cristalino de pacientes con EA <sup>369,372</sup>.

En los últimos años se ha observado, en un modelo de EA en ratones transgénicos dobles APP/PS1, que existen depósitos de A $\beta$  <sup>325,357</sup> y acúmulo de tau hiperfosforilada en las retinas ancianas de estos animales <sup>373,374</sup>. Estas placas de A $\beta$  se han identificado, dispuestas mayoritariamente desde la CCG a la CPI, localizándose algunas en la CNE, en la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores y en el nervio óptico <sup>325</sup>. Con técnicas inmunohistoquímicas se ha observado que estos depósitos están acompañados por un aumento de la inmunoreactividad MCP-1 (+) y F4/80 (+) en la CCG, por lo que estos resultados sugieren que los depósitos de A $\beta$  causan una neurodegeneración en la retina de estos ratones, apoyado además por la presencia del TUNEL + en esta capa, por

lo que hay evidencia histológica de apoptosis en la capa de CCG en este modelo de EA<sup>357</sup> (Figura 29).



**Figura 29. Representación esquemática de los eventos asociados con la patología de la Enfermedad de Alzheimer en la retina.** Modificada de Ramirez et al., 2017<sup>292</sup>.

En 2009 se probó una vacuna de A $\beta$  en estos animales de experimentación observándose una reducción de los depósitos, sin embargo, a pesar de este hallazgo, se producía un marcado aumento de los depósitos de A $\beta$  microvasculares, así como una neuroinflamación local manifestándose ésta por una infiltración microglial y una astrogliosis relacionada con la disrupción de la organización de la retina<sup>325</sup>.

Estudios realizados post-mortem en retinas humanas, confirman la presencia de placas de A $\beta$  en pacientes con EA<sup>322,328,375,376</sup>. Estas placas son comparables con los informes neuropatológicos de los mismos pacientes en los que se identificaban presencia de placas de A $\beta$  dispersas por la corteza occipital<sup>328</sup>. Los depósitos de A $\beta$  encontrados fueron de diferente tamaño y de forma redondeada situados con más prevalencia en las áreas perimacular y perivascular tanto en pacientes con EA como en aquellos que tenían un DCL<sup>322,328,377</sup>.

En el estudio de La Morgia et al. describen que los depósitos de A $\beta$  se encontraban alrededor de CGRm degeneradas sugiriendo que el A $\beta$  es tóxico para las células de la retina<sup>328,376</sup>. Estos depósitos se encuentran frecuentemente formando racimos y a mayor

magnificación se revela una morfología diversa de los depósitos <sup>328</sup>. Al igual que en el cerebro, en la retina se encuentran las placas con “estructura clásica”, donde hay un núcleo central de A $\beta$  en la que irradian unos brazos fibrilares, así como otras placas “compactas” compuestas por múltiples depósitos de A $\beta$  de núcleo denso y aparentemente sin fibrillas que irradian de ellos <sup>328</sup>. El estudio ultraestructural de las placas de A $\beta$  en la retina ha revelado un núcleo central amiloide denso, con y sin radiación de brazos fibrilares, fibrillas, protofibrillas y otros tipos de depósitos A $\beta$  <sup>376</sup>.

Estos estudio se correlacionan con los realizados por Koronyo et al. en retinas humanas *post mortem* donde además han observado que los pacientes con EA presentan 4,7 veces más placas de A $\beta$  que los controles, en las capas más internas de la retina <sup>376</sup>. Estos depósitos de A $\beta$  observados en la retina se ha visto que tienen una morfología similar a la del cerebro pero de un diámetro entre 6 y 7 veces menor de media <sup>376</sup>. Los depósitos de A $\beta$  suelen aparecer más frecuentemente en la periferia del cuadrante superior y asociado a los vasos sanguíneos, sobre todo en la CCG <sup>376</sup>. Algunas neuronas de las capas más internas de la retina muestran una morfología parecida a los ovillos neurofibrilares, agregados de proteínas intracelulares citoplasmáticas y específicamente en la CCG con aparición de placas neuríticas <sup>376</sup>. Alrededor de las acumulaciones de A $\beta$  se ha visto que existe una marcada pérdida de células en la retina en la CCG, CPI y CPE en los pacientes con EA. De hecho, ha sido encontrado una alteración en la tinción Nissl en la CCG, CNI y CNE sugiriendo una cromatolisis que podría asociarse con una degeneración neuronal <sup>376</sup>. La A $\beta_{42}$  encontrada en la retina tenía una asociación lineal positiva significativa, especialmente en la corteza entorrinal y en el cortex visual primario <sup>376</sup>. Más interesante aún, fue la demostración de que la deposición de A $\beta$  en la retina precede a la del cerebro (2,5 meses frente a 5 meses) en el modelo experimental de ratón APP/PS1 <sup>375</sup>.

En **pacientes *in vivo*** mediante una técnica modificada de OCT tras la administración oral de cúrcuma se ha demostrado que pueden ser observadas las placas de A $\beta$  en la retina de pacientes con EA, mientras que, tanto en los controles como en los pacientes con demencia vascular el número de depósitos era significativamente menor. En los pacientes con EA la densidad de estas placas era 2,1 veces mayor que la que tenían los controles y no se correlacionaba con la puntuación de MMSE. La mayor densidad de depósitos se encontró en los cuadrantes supero-temporal e ínfero-temporal y en forma de racimos acompañando los vasos sanguíneos al igual que lo encontrado por La Morgia et al. <sup>376</sup>. Un análisis a mayor magnificación de las imágenes de A $\beta$  obtenidas con la OCT

demostraba que tanto el EPR como la membrana de Bruch estaban intactos y los depósitos de  $\beta$ -amiloide-cúrcuma se encontraban justo por encima del EPR en las capas más externas de la retina <sup>376</sup>. Estos depósitos también se han observado situados en la CPE y en capas más internas como la CCG y en la CFNR <sup>377</sup>.

Campbell et al. también consiguieron detectar las placas de  $A\beta$  en la retina humana observando sus propiedades de polarización, postulándolo como un nuevo método diagnóstico <sup>378</sup>.

Con la mayoría de los estudios centrados en la detección del  $A\beta$  en la retina, solo hay unos pocos estudios centrados en la visualización de la patología tau en la retina <sup>327,379</sup> existiendo solo un estudio de imágenes de tau fibrilar *in vivo* en ratones transgénicos que expresan la proteína humana P301S <sup>374</sup>, donde los autores fueron capaces de demostrar un número creciente de células tau-fibrilares positivas, entre las edades de 2 y 5 meses en estos ratones.

#### **2.7.2.4 Angiopatía amiloidea en la retina de la EA**

La angiopatía amiloidea cerebral, presente en el 90% de los pacientes con EA, es una patología vascular en la que los agregados de  $A\beta$  reemplazan una cantidad significativa de la musculatura lisa contráctil de las paredes de las arteriolas <sup>380</sup>. Esta pérdida de células musculares lisas altera el normal funcionamiento de la unidad neurovascular con una regulación del flujo sanguíneo local empeorada debido a una pérdida de la contractibilidad vascular y una oclusión parcial en las arteriolas distales más pequeñas debido a los agregados de  $A\beta$  <sup>381</sup> dando lugar a cambios de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica <sup>382,383</sup>. Estos cambios se han visto asociados a un descenso de la densidad vascular, disminución del espesor vascular y del flujo sanguíneo en el cerebro <sup>384</sup>. En el cerebro, los depósitos vasculares de  $A\beta$  tienen afinidad por las arteriolas cerebrales y por las arterias de mediano y pequeño calibre <sup>383,385-387</sup> y, de hecho, han sido reconocidos como uno de los signos patológicos más tempranos en el desarrollo de la enfermedad <sup>388,389</sup>.

Se ha especulado que los cambios vasculares de la retina comparten mecanismos patogénicos similares a los cambios en los vasos cerebrales de los pacientes con EA <sup>236,293,383,390-392</sup> pudiendo ser usados estos cambios para el estudio y seguimiento de las

enfermedades del SNC debido a las similitudes entre la red vascular cerebral y retiniana<sup>236,393</sup>.

### **2.7.2.5 Vascularización y flujo sanguíneo retiniano en la EA**

Hasta el momento hay pocos estudios que hayan investigado en este campo. En 2007, Berisha et al.<sup>390</sup> estudió la vascularización de la retina y el flujo sanguíneo en los pacientes con EA. Para ello utilizaron un láser Doppler en 9 pacientes con probable EA leve (n=6) y moderada (n=3) y 8 controles pareados por edad, detectándose en los pacientes con EA un estrechamiento significativo del diámetro de las venas de retina y una disminución del flujo sanguíneo con respecto a los controles de edad. Estos resultados concuerdan por los publicados por Feke et al. en 2015 donde al analizar mediante Doppler a 10 pacientes con EA, 21 con DCL y 21 controles encontraron que existía una disminución significativa de la columna sanguínea en los pacientes con EA con respecto a los pacientes con DCL y los controles. Sin embargo, la velocidad de la sangre era significativamente menor tanto en los pacientes con DCL como en los EA respecto a los controles<sup>394</sup>. Encontraron una correlación directa significativa entre el flujo sanguíneo retiniano con el espesor de la CFNR peripapilar, sugiriendo que las anormalidades del flujo sanguíneo podrían preceder a la neurodegeneración en la EA<sup>394</sup>. Estos hallazgos coincidían con los de William et al. donde vieron que los pacientes con EA tenían una red microvascular retiniana más escasa y concluyen que la variación microvascular retiniana puede representar los eventos fisiopatológicos similares que tienen lugar en la microvascularización cerebral de pacientes con EA<sup>392</sup>.

Mroczkowska et al. analizaron la vascularización dinámica de la retina observando que había signos de disfunción de la microvascularización que están correlacionados con el grado de deterioro cognitivo<sup>395</sup>. Sin embargo el estudio publicado de Tsai et al. no encontró una diferencia en la estructura vascular, ni en el calibre de los vasos retinianos de ratones transgénicos de EA comparados con los controles<sup>322</sup>.

Se ha observado también, que la amplitud de las pulsaciones venosas retinianas tiene una correlación negativa con las puntuaciones de A $\beta$  neocorticales (evaluado por imágenes de PET con florbetaben, fluoróforo que se une a las placas neuríticas de A $\beta$  del cerebro), mientras que la amplitud de las pulsaciones arteriales de la retina se correlacionó positivamente con las puntuaciones de A $\beta$  neocorticales en pacientes con EA<sup>293</sup>.

En general, en las retinas de pacientes con EA los estudios han observado vasos enrollados y con forma helicoidal<sup>387</sup>, una dilatación y tortuosidad de las arteriolas<sup>392,396</sup>, un estrechamiento venular<sup>390,397</sup>, un aumento de la tortuosidad venular<sup>387,396</sup>, alteración de la red microvascular<sup>387</sup>, una disminución de la dimensión fractal vascular<sup>391,392</sup> y una disminución del flujo sanguíneo<sup>390</sup> que estaba correlacionado con el avance de la enfermedad<sup>394</sup>.

Curiosamente, un estudio reciente mostró que la angiopatía amiloidea ocurre en la retina antes del cerebro en ratones TgAPP/PS1, sugiriendo que en pacientes con EA, también se pueden detectar depósitos de A $\beta$  en la retina antes que en el cerebro<sup>398</sup>.

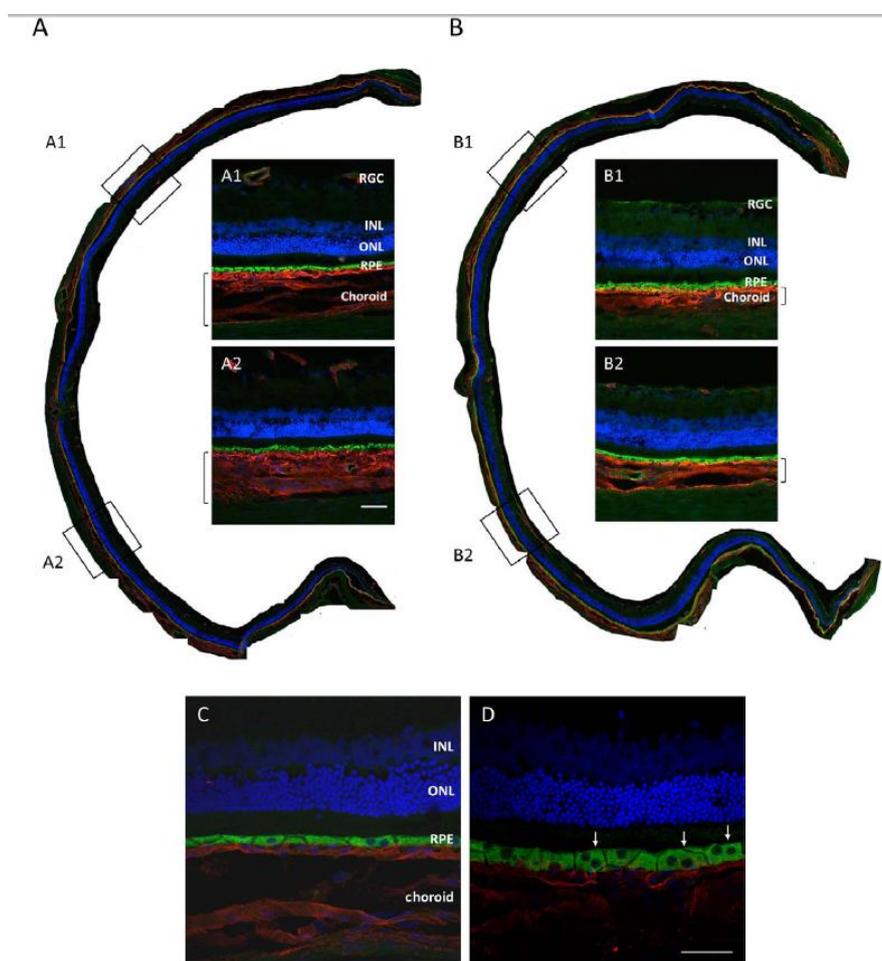
En los últimos años, gracias a las nuevas técnicas de diagnóstico por imagen se han realizado algunos estudios en la medida de la red capilar de la retina *in vivo* mediante OCTA que serán analizados detalladamente en otro capítulo.

### 2.7.3 Coroides en la EA

La fisiopatología de la EA tiene como características principales los depósitos extracelulares de A $\beta$  e intracelulares de proteína tau. Estos depósitos coexisten junto con numerosos cambios estructurales y funcionales de la red capilar. Todos estos cambios de la red vascular, se cree que son los responsables de que no se produzca una correcta limpieza del A $\beta$  del tejido y que conduzca al estrés oxidativo y a la neurotoxicidad, que precede la aparición de la EA<sup>399</sup>.

De acuerdo con los estudios histológicos, el espesor de la coroides subfoveal humana es de aproximadamente 194  $\mu\text{m}$  en el nacimiento y disminuye hasta las 83  $\mu\text{m}$  a la edad de 90 años<sup>71</sup>. Gracias al progreso de la OCT, en los últimos tiempos se ha podido estudiar el espesor de la coroides *in vivo* en pacientes con EA leve-moderada encontrándose en la coroides un adelgazamiento generalizado en el área foveal estadísticamente significativo que es añadido a la disminución fisiológica producida por el envejecimiento<sup>322,400-403</sup> (Figura 30 A y B), encontrándose aún más pronunciado en las regiones temporales de la región submacular<sup>403</sup>. Según los autores, este adelgazamiento de la coroides en EA puede estar asociado con la hipoperfusión y/o cambios atróficos de esta capa vascular. Los mismos autores estudiaron posteriormente a estos pacientes 12 meses después encontrando que el adelgazamiento es más prominente en los pacientes con EA que en

los controles mostrando que no está ligado al proceso natural de envejecimiento <sup>404</sup>. Los autores postulan en este estudio que el adelgazamiento coroideo en los pacientes con EA puede ser debido a los cambios patológicos provocados por los depósitos locales de A $\beta$  similares a los que se pueden encontrar en el sistema vascular cerebral en la EA <sup>404</sup> y remarcan que probablemente estos cambios en la coroides vistos incluso en pacientes con EA leve reflejan la importancia de los factores vasculares en su patogénesis <sup>403</sup>. De hecho, se ha encontrado en animales transgénicos de EA mediante técnicas de inmunohistoquímica una frecuencia mucho mayor de hipertrofia del EPR y de células con doble núcleo, que no fueron vistos en las retinas humanas <sup>322</sup> (Figura 30 C y D).



**Figura 30. Secciones de retina con tinción doble con anticuerpos contra el colágeno tipo IV (rojo) y RPE65 (verde) en ratones controles (A y C) y transgénicos (B y D).** (A y B) Las cajas se corresponden con las imágenes en grande en las cuales se observa una obvia reducción de espesor de la coroides en los ratones transgénicos comparados con los controles. (C y D) Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Se observa la hipertrofia y los núcleos múltiples de las células del EPR (flechas). Barra de escala 50 $\mu$ m. Modificado de Tsai et al, 2014 <sup>322</sup>.

Los cambios en el espesor de la lámina cribosa en la EA también se han investigado con hallazgos que sugieren que los niveles mayores de T-tau y P-tau<sub>181P</sub> en el líquido cefalorraquídeo están asociados significativamente con una disminución del espesor de la lámina cribosa <sup>405</sup>.

#### **2.7.4 Nervio óptico en la EA**

Debido a los resultados expuestos anteriormente de los hallazgos en la retina en los pacientes con EA, se podría apoyar la hipótesis de la implicación del nervio óptico en el Alzheimer. Sin embargo, la verificación histológica de esta hipótesis fue muy complicada.

Hinton et al. <sup>318</sup> describieron una degeneración axonal generalizada de los nervios ópticos de 8 de los 10 pacientes con EA que fueron analizados post-mortem. En un estudio adicional <sup>406</sup> se llevó a cabo el análisis morfométrico del nervio óptico sugiriendo una pérdida predominante de las neuronas magnocelulares que contribuyen con fibras de gran calibre. En un estudio, publicado en 2005 por Syed et al. <sup>407</sup>, se encontró, tiñendo el contorno de los axones con azul de toluidina, diferencias significativas de la densidad axonal tanto en las zonas centrales como en las periféricas del nervio óptico en 12 pacientes con EA frente a 13 controles de edad avanzada. Cabe destacar, que este estudio encontró una disminución de axones de menor tamaño, aquellos que tienen áreas de sección transversal menor de  $1,99 \mu\text{m}^2$ . Debido a que los axones pequeños son más difíciles de identificar e incluir en un análisis morfométrico, la proporción de los axones más pequeños podría haber sido subestimada en alguno de los estudios anteriores, pudiendo explicar los diferentes hallazgos encontrados en los estudios publicados hasta la fecha <sup>277</sup>.

En estudios posteriores en los que se realizaron secciones de nervio óptico se encontró evidencia de neuropatía óptica con diferente grado de pérdida axonal <sup>328</sup>. Esta pérdida axonal se encontraba predominantemente en el cuadrante superior siendo afectadas las fibras más gruesas del nervio óptico y en menor medida los cuadrantes nasal e inferior. El cuadrante más respetado es el temporal que es en el que discurren las fibras más finas <sup>328</sup>.

Estudios realizados mediante RM han observado que existe una disminución en el volumen del nervio óptico estadísticamente significativa en pacientes con EA que sin

embargo no tiene correlación con el volumen cerebral <sup>408</sup>. Sin embargo utilizando *Diffusion-Tensor Imaging* (DTI) se ha demostrado una reducción de la función del nervio óptico y una sospecha de degeneración axonal en los pacientes con EA y objetivando que los cambios son menos severos en los pacientes con DCL, lo que sugiere, un deterioro progresivo con el avance de la enfermedad <sup>409</sup>.

También se han encontrado anillos de proteínas tau en el nervio óptico <sup>410</sup>, aunque esto puede no ser específico para la EA. Cuzzo et al. <sup>411</sup> encontraron una disminución de la expresión de la proteína receptora de lipoproteína de baja densidad en los nervios ópticos de 11 pacientes con EA en comparación con 10 controles, lo que apoyaría la hipótesis de que esta proteína podría jugar un papel en la fisiopatología de la neuropatía óptica en la EA. Además, el mismo grupo de investigación confirmó los hallazgos previos de Hinton et al. <sup>318</sup> observando, con anticuerpos contra los neurofilamentos, degeneración axonal en los nervio óptico de los pacientes con EA. Además en muestras del nervio óptico de pacientes con EA ha sido observada en la microvascularización próxima a los astrocitos, un incremento en la expresión del receptor de productos finales de glicación avanzada <sup>412</sup>.

Diversos estudios también han señalado diferencias en la apariencia de la cabeza del nervio óptico tanto con fotografías anéritras <sup>413-415</sup> como con oftalmoscopia láser de barrido <sup>416</sup>. Sin embargo en otros trabajos usando esta última técnica, no se han encontrado diferencias entre los pacientes con EA y el grupo control <sup>417</sup>. Por otra parte, se ha reportado una progresión más rápida de la neuropatía óptica glaucomatosa en 7 pacientes con glaucoma y EA <sup>418</sup>. Aunque hasta la fecha no hay ningún estudio que revele cambios patológicos en el nervio óptico asociados con la progresión de la EA.

### **2.7.5 Núcleo geniculado lateral en la EA**

En pacientes con EA, Scholtz et al. <sup>419</sup> observó una pérdida de mielina y una disminución del volumen nucleolar en el NGL. También se identificó la presencia de placas de A $\beta$  más abundantes en las capas parvocelulares que en las magnocelulares; así como la presencia de anillos neurofibrilares <sup>420,421</sup>. Un estudio reciente reveló que la patología tau era escasa en el NGL y no presentaba diferencias significativas con pacientes controles pareados por edad <sup>422</sup>. También se ha detectado tanto una reducción en la actividad de la

citocromo oxidasa, marcador para el metabolismo cerebral regional, como una disminución en los niveles enzimáticos <sup>423</sup> en esta estructura de la vía visual.

## **2.7.6 Afectación de otros núcleos cerebrales en la EA**

### **2.7.6.1 Colículo superior**

El colículo superior, a veces referido como el techo óptico, es una estructura pareada, laminada, y organizada retinotópicamente en el cerebro medio, que recibe aproximadamente el 10% de los axones de las CGR estando involucrada en el control de los movimientos oculares. Fueron encontradas numerosas placas amiloides en el colículo superior de pacientes con EA <sup>424</sup>. Además, los estudios neuropatológicos posteriores identificaron abundantes ovillos neurofibrilares en este núcleo <sup>420,422,425</sup>. Estos cambios patológicos en el colículo superior pueden explicar los problemas de la motilidad ocular frecuentemente encontrados en pacientes con EA <sup>265</sup>.

### **2.7.6.2 Núcleo supraquiasmático**

El núcleo supraquiasmático, se trata de una estructura pareada formada por un grupo de neuronas del hipotálamo medial, situada encima del quiasma óptico, que recibe la entrada directamente de las CGR a través de un tracto retino-hipotalámico <sup>426</sup>, siendo un centro primario de regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal. Se ha visto que es posible que haya marcados cambios en el núcleo supraquiasmático en la EA, tales como disminución en el volumen y número de células (incluyendo subpoblaciones neuronales específicas, como las de la vasopresina y las neuronas de neurotensina) y la formación de ovillos neurofibrilares <sup>427-431</sup>. Estos hallazgos neuropatológicos pueden correlacionarse con el desajuste del ritmo circadiano en la EA <sup>286,432,433</sup>.

### **2.7.6.3 Núcleos pulvinares**

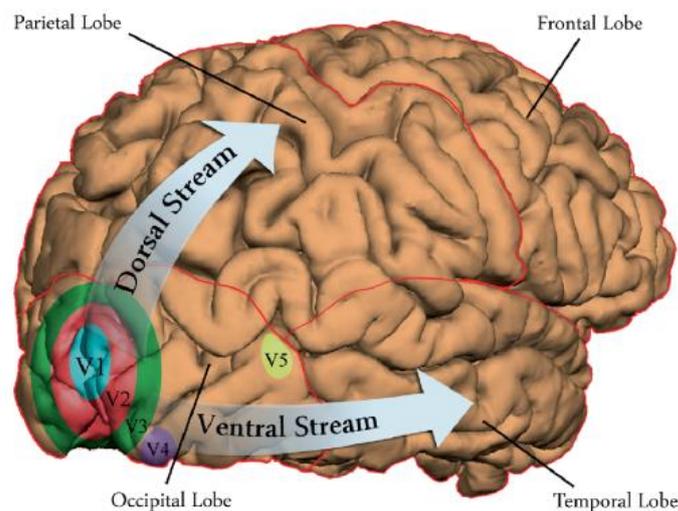
Los núcleos pulvinares son un agregado de varios núcleos que se sitúan en la parte más posterior del tálamo. Tienen conexiones recíprocas con áreas de asociación de la corteza cerebral, tanto de los lóbulos parietal, occipital y temporal. Se componen de varias

divisiones que reciben múltiples aportaciones de las subdivisiones de la corteza visual, desde el colículo superior, y, en un grado limitado, de la retina <sup>434</sup>. Esta zona se ha implicado en la atención visual y en el control de los movimientos del ojo.

Numerosas placas amiloides y algunas placas neuríticas (depósitos extracelulares en la materia gris del cerebro compuesto de amiloide mezclado con las dendritas de las neuronas que mueren) se encontraron a lo largo de las diversas subdivisiones de los núcleos pulvinares en 9 pacientes con EA, en comparación con pacientes más jóvenes y controles pareados por edad <sup>435</sup>. Esto podría explicar el deterioro de la atención visual en pacientes con EA <sup>230</sup>.

### 2.7.7 Corteza visual en la EA

La corteza visual se encuentra en el lóbulo occipital. Consta de la corteza estriada o V1 (corteza visual primaria) y áreas corticales visuales extraestriadas como V2, V3, V4, V5, etc (corteza visual secundaria). En conjunto, las cortezas visuales primaria y secundaria consisten en un mosaico de varias docenas de áreas visuales que ocupa una gran parte de la corteza cerebral, aproximadamente el 20% - 25% en los humanos <sup>436,437</sup> (Figura 31).



**Figura 31. Procesamiento de la información visual.** Desplazamiento desde la corteza visual primaria (V1) a través de las áreas de procesamiento secundario y terciario (V2-V5), cada vez se procesan aspectos más complejos de experiencia visual y las células se sintonizan a campos receptores mayores. La información de color y la forma es procesada por una vía ventral a través de V2, V4, y la corteza temporal inferior. La información de la localización y el movimiento es procesada por una vía dorsal a través de V2 y V3, V5, y corteza parietal posterior. Modificada de Possin et al., 2010 <sup>221</sup>.

Existe un consenso actual de que, probablemente, en la EA, la corteza visual primaria se afecte más tarde, después de la afectación de otras regiones corticales<sup>438-440</sup>, excepto en una variante que se manifiesta con síntomas visuales tempranos<sup>441,442</sup>. Sin embargo, la acumulación de placas, ovillos neurofibrilares, la disminución del número de neuronas y de densidad de capilares así como cierta disminución del nivel de enzimas en V1 están bien documentadas<sup>322,420,423,442,443</sup>. Aunque algunos estudios preliminares afirmaron que son mínimos los ovillos neurofibrilares y las placas tanto en la corteza visual primaria como en la secundaria<sup>444</sup>, sin embargo, estudios posteriores encontraron ovillos neurofibrilares y placas en la corteza visual más abundantes en la corteza visual secundaria (en su mayoría en las zonas extraestriadas 18 y 19 en lugar del área 17, correspondiente a la corteza visual primaria)<sup>445,446</sup>. Asimismo en la corteza visual primaria junto con las placas y ovillos, fue encontrada también astrogliosis en la corteza visual primaria<sup>447</sup>. También se ha observado posible patología dendrítica asociada como: dendritas distróficas, pérdida de ramas dendríticas y alteración patológica de las espinas dendríticas<sup>448,449</sup>. A pesar de la diferencia en la frecuencia de presentación de ovillos neurofibrilares, entre las zonas 17 y 18 (sólo 2% de las neuronas contenía ovillos neurofibrilares en el área 17 vs aproximadamente el 10% en el área 18), la densidad media neuronal se redujo en ambas áreas en un grado similar (~ 30%)<sup>450</sup>. Esto podría implicar que, o bien la pérdida neuronal puede ocurrir sin pasar a través de la degeneración de los ovillos neurofibrilares, o que algunas neuronas puede ser más vulnerables a la presencia de ovillos neurofibrilares que otras<sup>277</sup>.

### 2.7.8 Tomografía de Coherencia Óptica en la EA

La OCT es una técnica de imagen que funciona de forma similar a la ecografía, solo que utiliza las ondas de luz de baja coherencia en lugar de ondas de sonido. Un sistema de OCT, mediante el uso de la información del tiempo de retardo contenida en las ondas de luz, que se han reflejado desde diferentes profundidades dentro de una muestra, puede reconstruir un perfil de profundidad de la estructura de la muestra. Las imágenes tridimensionales pueden pues crearse mediante la exploración del haz de luz lateralmente a través de la superficie de la muestra. Mientras que la resolución lateral se determina por el tamaño de la mancha del haz de luz, la profundidad (o resolución axial) depende principalmente del ancho de banda de la fuente de luz. Por esta razón, los sistemas de

OCT pueden combinar altas resoluciones axiales con grandes profundidades de campo, por lo que entre sus aplicaciones primarias se incluyen imágenes *in vivo* a través de secciones gruesas de los sistemas biológicos, particularmente en el cuerpo humano. La técnica ya se ha establecido como una modalidad de imagen estándar para exámenes oftalmológicos de retina, así como de segmento anterior.

La OCT es una técnica diagnóstica no invasiva, que adquiere imágenes transversales de estructuras retinianas, permitiendo la evaluación de la integridad de la retina. Varios estudios han demostrado que tanto la CFNR peripapilares, como las mediciones del grosor macular evaluadas por OCT, fueron capaces de detectar la pérdida neuronal en la EA <sup>283</sup>. El adelgazamiento de la CFNR se ha encontrado en varias enfermedades neurológicas, entre las que se encuentra la EA <sup>261,318,320,390,413,414,417,451-459</sup>. La pérdida del grosor de la CFNR en la EA está relacionada con la disminución de las CGR y de los axones del nervio óptico <sup>273,390,416,453,460</sup>. Se ha postulado que las alteraciones en la CFNR podría ser el primer signo de EA, incluso antes del daño en la región del hipocampo que afecta la memoria <sup>456</sup>. Además, se ha sugerido una asociación entre estas alteraciones y la gravedad de la enfermedad <sup>414,451</sup>. Existe una gran controversia sobre la reducción del grosor de la CFNR peripapilar medido por la OCT en la EA. Algunos autores han descrito una disminución del grosor de esta capa en todos los cuadrantes peripapilares medidos por la OCT <sup>452,457</sup>, lo que provocaría una disfunción retiniana demostrada por patrones anormales en las respuestas de electroretinograma <sup>457</sup>. Sin embargo, algunos estudios de OCT sobre el grosor peripapilar en EA <sup>390,451,454-456,458,459,461</sup> encontraron que el adelgazamiento de la RNFL se limitaba al cuadrante superior <sup>390,415,458,462,463</sup> o a los cuadrantes superiores e inferiores <sup>261,454,459</sup> en comparación con los sujetos control. Otros autores han sugerido que el cuadrante inferior de la RNFL puede ser un área más específica y sensible que otros cuadrantes de la RNFL en la predicción del deterioro del estado cognitivo reflejando una anomalía retiniana precoz en el curso de la EA <sup>454,462</sup>. La razón de la variabilidad de los resultados entre los diferentes estudios, podría estar relacionada con las puntuaciones del MMSE de los pacientes participantes, ya que en la mayoría de los trabajos los pacientes no tienen MMSE similares entre sí o analizan en el mismo trabajo pacientes con MMSE muy diferentes.

Dado que las CGR y sus axones representan el 30–35% del grosor retiniano total en el área macular, se pueden usar las mediciones del grosor de la macula para cuantificar la pérdida de CGR, como se ha demostrado en el glaucoma y en otras enfermedades

neurodegenerativas<sup>249,464-466</sup>. Sin embargo, son muy escasos los trabajos en los que se analiza el grosor macular en pacientes de EA. Iseri et al., observaron en estos pacientes una reducción del grosor macular y del volumen macular total relacionando esta última reducción con el deterioro cognitivo de los pacientes<sup>452</sup>. Otros autores utilizando la OCT de dominio espectral describen un adelgazamiento de la CFN y de la CFN +CCG en la macula de pacientes con EA comparándolos con los controles<sup>467</sup>. La disminución del grosor macular en la OCT se correlaciona con una pérdida de la actividad eléctrica macular observada en el ERG de pacientes con EA<sup>461</sup>. Finalmente con la OCT los pacientes con EA mostraban una reducción del grosor macular cuantificándose la pérdida de neuronas en las capas internas de la retina en la región macular correlacionándose esta pérdida con el deterioro cognitivo<sup>468</sup>. Sin embargo, los datos deben ser confirmados en estudios adicionales que evalúen la asociación con otros posibles biomarcadores de la enfermedad. Siendo también muy importante el análisis de cómo se comportan los cambios observados en el grosor de la retina a lo largo de la evolución de la enfermedad.

### 2.7.9 OCTA en la EA

Un gran avance en el estudio del sistema vascular de la retina y coroides ha venido de la mano del desarrollo de la **angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA)** permitiendo la visualización de forma no invasiva de los vasos de la retina y la coroides con alta resolución, lo que permite una mayor comprensión de las patologías vasculares de ambas estructuras. Además, la OCTA cuantifica la densidad de los vasos retinianos y coroideos y el flujo sanguíneo.

En 2017, Bulut et al.<sup>393</sup> publicaron un estudio realizado en 26 pacientes con EA (MMSE  $16.92 \pm 7.39$ ) analizando diferentes valores obtenidos mediante OCTA y comparando éstos con 26 controles. Encontraron que había una disminución significativa de la densidad vascular en toda el área macular, foveal y parafoveal en los pacientes con EA. El flujo sanguíneo de la retina externa y de la coroides estaba disminuido sin significación estadística. El área foveal avascular en los pacientes con EA era significativamente mayor que en los controles. Además, en este estudio encontraron que estos parámetros se correlacionaban significativamente con la puntuación de MMSE, siendo la correlación directa con la densidad vascular y el espesor coroideo y, de forma inversa con el área foveal avascular<sup>393</sup>. Los autores explicaron estos resultados por la disminución de la

angiogénesis debido a la unión de VEGF a A $\beta$  y su confinamiento en las placas, sumado a la acumulación de depósitos A $\beta$  en las paredes internas del vaso, lo que conduciría a la oclusión de las estructuras vasculares y la disminución del flujo sanguíneo <sup>390,393,469,470</sup>.

Del mismo modo, Jiang et al. estudiaron la red vascular de la retina en 20 pacientes con EA, 19 con DCL y 21 control encontrando que los pacientes con EA presentaban una disminución significativa de la densidad de la red capilar retiniana, así como una disminución del plexo vascular tanto superficial como profundo en el área periférica a la fovea comparado con los DCL y con los controles. Sin embargo, los pacientes con DCL, solo mostraron una disminución significativa en la densidad del plexo vascular profundo en el cuadrante nasal superior <sup>470</sup>. Estos autores sugieren que la diferencia encontrada en el plexo vascular retiniano entre los pacientes con EA y los pacientes con DCL podrían ser debidos a que el plexo vascular profundo está compuesto principalmente por capilares que pueden afectarse antes que los vasos de mayor calibre que se encuentran en el plexo vascular superficial <sup>470</sup>.

### **2.7.10 Glaucoma y EA**

Como se citó en el capítulo 1.7, el glaucoma también es una enfermedad neurodegenerativa que comparte los mismos mecanismos fisiopatológicos que el resto de las patologías neurodegenerativas. En estudios clínicos en los que se investigó la prevalencia del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) en los pacientes con EA, los resultados mostraron que había un aumento de la incidencia de GPAA en pacientes con EA <sup>418,471,472</sup>. Tamura et al. cuantificó que existía un aumento de la prevalencia del alelo  $\epsilon 4$  de la APOE, en los pacientes con GPAA, al igual que ocurre en los pacientes con EA, lo que hace pensar que existen mecanismos comunes que pueden contribuir a ambas patologías <sup>471</sup>. Cesareo et al. demostraron que existía un aumento de alteraciones de tipo glaucomatoso en los pacientes con EA que no estaba asociado a un aumento de la PIO ni valores anormales de espesor corneal central <sup>473</sup>.

Estudios recientes han encontrado que existen depósitos de A $\beta$  y proteína tau en las retina de los pacientes que sufren glaucoma <sup>297,474,475</sup>. Estos depósitos también se han encontrado al analizar el NGL de monos con glaucoma crónico mediante técnicas de inmunohistoquímica, Western Blot y ELISA. En estos monos también se encontró que se expresaba levemente en la corteza visual el A $\beta$ , mientras que en el hipocampo no se

encontraba ninguno de estos dos marcadores de EA. Así mismo, a microscopía electrónica de transmisión se observaron placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en el NGL en monos con glaucoma crónico<sup>475</sup>. Estos resultados sugieren una asociación entre el glaucoma y la EA.

Existe una teoría mediante la cual, la administración de memantina, fármaco usado en la EA, en el glaucoma ayudaría a disminuir el avance de la neurodegeneración glaucomatosa. Esta teoría se basa en que la apoptosis, mediada por la muerte celular excitotóxica, está implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el glaucoma. Este tipo de excitotoxicidad es causada, al menos en parte, por la activación excesiva de receptores de glutamato de tipo NMDA. Tal actividad excesiva del receptor NMDA provoca una afluencia anormalmente alta de iones de calcio en las células nerviosas que, a su vez, desencadena múltiples vías que conducen a la iniciación de la apoptosis. El bloqueo de la actividad excesiva del receptor de NMDA evitaría la excitotoxicidad relacionada con la apoptosis<sup>476</sup>. Sin embargo el uso del fármaco neuroprotector (memantina) utilizado en el tratamiento de la EA en el tratamiento de pacientes con GPAA, produjo unos resultados desalentadores<sup>477</sup>. Por otra parte más recientemente en un estudio longitudinal de 12.7 años no se encontraba una asociación del glaucoma normotensional con un aumento del riesgo de desarrollo de demencia o EA en comparación con el resto de la población general<sup>478</sup>.

## 2.8 Modelo experimental de ratón 3xTgAD

Para estudiar la patogénesis de la EA en el cerebro, han sido utilizados los ratones transgénicos de EA. Diferentes tipos de ratones transgénicos pueden ser complementarios para el estudio de la enfermedad debido a las desventajas de unos u otros modelos experimentales de EA.

Oddo et al. han llevado a cabo el examen de los cerebros de los ratones triple transgénicos (3xTgAD)<sup>479</sup>. Estos ratones 3xTgAD albergan la mutación de APP<sub>swe</sub>, PS1<sub>M146V</sub>, y TauP<sub>301L</sub> humana<sup>480</sup> y se considera un buen modelo que imita la progresión de la patología de la EA en el humano<sup>480,481</sup>. Estos ratones muestran muchas alteraciones funcionales incluyendo potenciación a largo plazo reducida, memoria espacial alterada y déficits de

memoria a largo plazo <sup>479,480</sup>. Este modelo animal también muestra alguna pérdida neuronal acompañada de pérdida de espinas en dendritas distróficas <sup>482,483</sup>.

El comienzo de la patología ocurre a los 3 meses de edad <sup>484</sup> observándose un deterioro de la potenciación a largo plazo. Las placas y los ovillos se desarrollan progresivamente de una manera dependiente de la edad y la región. Los cambios patológicos también apoyan la hipótesis de la cascada amiloide en la que la patología amiloide precede a la tauopatía mostrada en una prueba de inmunización con anticuerpos anti-A $\beta$  <sup>479</sup>. Además, los estudios encontraron que A $\beta$ , especialmente el A $\beta_{42}$  intracelular, estaba en correlación con los ovillos intracelulares en el cerebro de EA a través de las vías de hiperfosforilación de tau <sup>129,272,485</sup>. El ratón 3xTgAD imita la patología de EA más estrechamente que otros modelos de EA transgénicos <sup>486</sup>.

### 2.8.1 Alteraciones de la glía retiniana en el modelo 3xTgAD

Existen evidencias emergentes que tratan de reforzar el posible vínculo entre la degeneración retiniana y la EA <sup>366</sup>. Hipotéticamente, la sobreexpresión de APP, la producción de A $\beta$  soluble y los depósitos de A $\beta$  conducirían a la formación de placas amiloides que pueden inducir la muerte celular a través de la apoptosis <sup>299</sup>. Además, el A $\beta$  desempeña un papel en la inducción de la hiperfosforilación de tau, que a su vez induce cambios en la integridad de las células de la retina y sus sinapsis en la CNI <sup>487</sup>. Se han observado diferentes cambios que ocurren en la retina de ratones transgénicos de EA; entre estos están la sobreexpresión de los depósitos de APP, A $\beta$  y/o tau, la pérdida de células neuronales, los cambios en las células gliales de la retina y los cambios vasculares <sup>272</sup>.

En el estudio de la macroglía de estos ratones, diversos estudios han observado que las células de Müller estaban reactivas expresando GFAP. En el análisis de los astrocitos se ha observado un aumento aparente en tamaño y número de procesos de estas células <sup>211,483</sup>. Se observaron en todas las retinas de los ratones 3xTgAD varias estructuras opacas densas y de forma anormal envueltas por GFAP que fueron positivas para la A $\beta$ , sugiriendo estos autores que son placas amiloides. Al teñir las retinas controles, se observaron estructuras similares en el 30% de los animales *wild type*, siendo menos numerosas que en los 3xTgAD y no estando asociadas a la activación glial. Los resultados obtenidos por Edwards et al. indican que hay una activación astrogliar en la retina del ratón 3xTgAD <sup>483</sup>.



### **3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**



### 3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La degeneración producida en la retina y en el nervio óptico en la EA, puede originarse por vía retrógrada desde la corteza visual, por vía directa desde la propia retina causada por los acúmulos de A $\beta$  y ovillos neurofibrilares o de forma mixta. Estos cambios anatómicos pueden ser detectados con técnicas de diagnóstico oftalmológicas de última generación, que permiten el análisis de los cambios retinianos y también posibilitan el llevar a cabo un seguimiento de las modificaciones generadas según progresa la neurodegeneración.

El desarrollo de la OCT y OCTA en el campo de la oftalmología ha supuesto un importante avance en las técnicas exploratorias de la retina, al permitir obtener imágenes de alta resolución utilizando como método de exploración la luz. Esta circunstancia posibilita el análisis de la retina y la coroides en las fases más precoces de la EA, permitiendo localizar el área donde la retina comienza a alterarse, así como, la evolución de estos cambios retinianos y coroideos según avanza la enfermedad.

Complementariamente, el estudio de otras pruebas psicofísicas como la AV, la SC, la visión del color y el TDP nos permiten analizar las alteraciones que se generan en la función visual a distintos niveles de procesamiento, como consecuencia de la pérdida neuronal, lo cual, nos da una idea morfo-funcional de los cambios que se están produciendo en la retina desde que debutan los síntomas en los pacientes con EA.

Dada la elevada prevalencia de la EA y su previsible aumento, debido en parte al aumento de la tasa de envejecimiento de la población, es importante la búsqueda de biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico precoz de esta enfermedad, así como su seguimiento.

**En concreto, nuestra hipótesis de trabajo es que la retina podría actuar como un biomarcador de daño neuronal que permitiría el seguimiento y la valoración de la efectividad de los tratamientos actualmente en uso.**



## **4. OBJETIVOS**



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo primario:

Detectar los cambios que se producen en la retina, así como los cambios funcionales que se originan secundariamente, mediante pruebas psicofísicas oftalmológicas no invasivas en dos poblaciones de pacientes con EA diferenciadas por el grado de evolución de la patología; comparando los resultados con una población control semejante en edad.

### 4.2 Objetivos secundarios:

- Analizar el espesor retiniano, tanto en el área macular como en el área peripapilar, en los pacientes con demencia tipo Alzheimer leve y moderada en comparación con un grupo control de edad.
- Analizar el plexo vascular retiniano y coroideo en los pacientes con EA leve y moderada comparados con el grupo control.
- Analizar la AV de los pacientes con EA leve y moderada en comparación con el grupo control pareado por edad.
- Analizar la variación de la SC en las distintas frecuencias espaciales 3, 6, 12, 18 ciclos por grado en la demencia tipo Alzheimer leve y moderada en comparación con un grupo control pareado por edad.
- Analizar la capacidad de discriminación de percepción cromática en los pacientes con EA leve y moderada comparados con los controles pareados por edad.
- Analizar el procesamiento cortical de la función visual mediante el TDP en pacientes con EA leve y moderada comparado con los controles pareados por edad.

- Analizar el nivel de oxígeno de la cabeza del nervio óptico en los pacientes con EA leve y moderada en comparación con el grupo control pareado por edad.
- Analizar en la retina de un modelo experimental de ratón con EA (3xTgAD) la respuesta inflamatoria mediada por el sistema inmune comparando con ratones no transgénicos.

# **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Selección de pacientes y controles

La inclusión de los **pacientes con EA** se realizó en la Unidad de Memoria del Servicio de Geriatría del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, España.

Todos los pacientes fueron diagnosticados por el mismo equipo de neuropsicólogos y geriatras de acuerdo con el *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease* (Jack, Albert et al. 2011) y el *Related Disorders Association and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*.

En el siguiente diagrama se especifica la inclusión de pacientes (Figura 32).

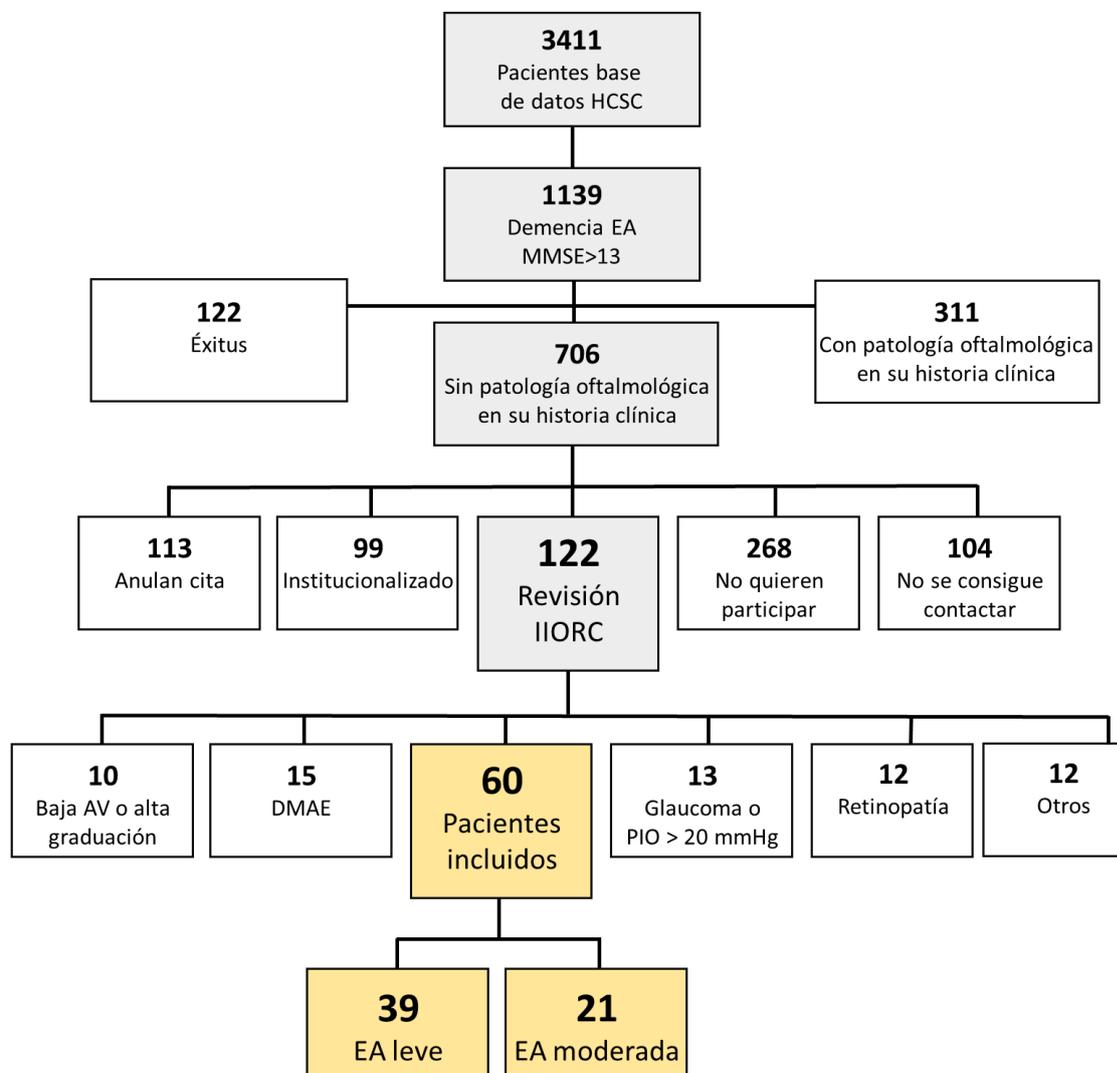


Figura 32. Diagrama de flujo de la inclusión de los pacientes en el estudio.

Todos los pacientes fueron sacados de la base de datos de la Unidad de Memoria que constaba con **3411 pacientes** con diagnóstico de demencia.

La búsqueda de paciente se realizó siguiendo el protocolo que detallamos a continuación al menos una vez cada año durante el periodo que ha durado este estudio.

Primeramente, se seleccionaron solo aquellos pacientes que presentaban puramente una demencia tipo Alzheimer y se excluyeron aquellos que tenían otro tipo de demencia, no tenían pruebas de imagen, trastornos de ánimo o psiquiátrico, alteración de la conducta, déficit sensorial conocido, alcoholismo, componente vascular, variantes de EA, inicio atípico, crisis epilépticas y Parkinsonismo; descartando a 2272 pacientes y siguiendo la inclusión de **1139 pacientes**.

A estos **1139 pacientes** se les solicitó la historia clínica completa y se revisaron las carpetas de las especialidades de Geriátrica, incluyendo la de la Unidad de Memoria, y la carpeta de Oftalmología.

En la historia clínica de Geriátrica se tomó en cuenta el estadio de la patología, fecha de última consulta (nunca mayor a los últimos 6 meses), la puntuación de MMSE, el grado de GDS según la escala *Clinical Dementia Rating* (Morris 1993), movilidad del paciente, teléfono de contacto y el apoyo familiar de los pacientes, ya que era fundamental la implicación por parte de la familia tanto para contactar telefónicamente como para contar con los traslados a la Clínica del Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, situada en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

En la carpeta de Oftalmología se revisó la historia clínica de todos los pacientes, se excluyeron aquellos que tenían previamente diagnosticada una patología oftalmológica que pudieran modificar los valores de alguna de las pruebas realizadas en el protocolo. Se excluyeron todos los pacientes que presentaban AV menor de 0,6 en la escala decimal, refracción esfero-cilíndrica mayor de 5 dioptrías, PIO mayor de 20 mmHg y/o pacientes con patologías de polo anterior como opacidades corneales, cataratas en evolución con AREDS Clinical lens Standard >2, y todas aquellas patologías que afectaran a la transparencia de los medios; también se excluyeron aquellos con patología del polo posterior como glaucoma, DMAE, retinopatía diabética, membrana epirretiniana, drusas, edemas maculares, agujeros maculares, etc, que pudieran interferir en la medida del espesor retiniano medido con la OCT y enfermedades sistémicas que afectaran a la visión.

Tras la revisión de las historias clínicas se seleccionaron **706 pacientes** a los que contactar por teléfono para darles cita en la Clínica del Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo.

Tras esto, no se consiguió contactar con 104 pacientes, 268 declinaron participar ellos o sus familiares, 99 estaban institucionalizados, 113 tras darles cita o la anularon por teléfono o no se presentaron a la consulta y finalmente se realizó toda la batería de pruebas del estudio a **122 pacientes**.

De los 122 pacientes examinados, 62 de ellos fueron excluidos, 10 por baja AV o graduaciones superiores a los criterios de inclusión, 15 por DMAE, 13 por glaucoma o sospecha de glaucoma o PIO > 20 mmHg, 12 por retinopatía, 12 por otras patologías oftalmológicas y finalmente **60** de los pacientes estaban sanos oftalmológicamente.

De estos 60 pacientes, **39** correspondía al grupo de **EA leve** y **21** al grupo de **EA moderada**.

El grupo **control** se seleccionó entre voluntarios sin queja de memoria, muchos de ellos eran los familiares que acompañaban a los pacientes con EA (conyugue o hermanos). De los **60** controles a los que se sometió la revisión completa solo **40** de ellos pudieron ser incluidos, debido a que 20 controles presentaban patologías oftalmológicas que los no conocían.

La evaluación por parte de la Unidad de Memoria para llegar al diagnóstico de EA y su clasificación se hace de acuerdo a todas las pruebas que se indican en la Tabla 3.

**Tabla 3. Batería de pruebas que se realizaron para llegar al diagnóstico de EA de los pacientes incluidos en el estudio**

Historia del paciente	Examen físico	Examen neurológico	Evaluación cognitiva	Evaluación funcional	Evaluación conductual	Técnicas de neuroimagen	Test de laboratorio
Edad y sexo	Signos vitales	Fuerza	MMSE Folstein	Katz	NPI Cummings	CT Scan	Hematología
Motivo de consulta	(temperatura, presión arterial, pulso)	Conciencia	Historias WMS-III	Barthel		MRI	Bioquímica
Historia de la enfermedad actual		Tono muscular	Diseño WMS-III	Lawton			Vitamina B12
Antecedentes médicos	Hidratación	Lenguaje	Dígito Span	Blessed-A			Ácido fólico
Estado de salud actual	Peso	Nervios craneales	Prueba de Stroop				Hormonas tiroideas
	Altura	Reflejos	TMT-A				
Historia psicosocial (estado civil, condiciones de vida, el empleo, historia sexual, acontecimientos significativos de la vida)	Frecuencia respiratoria		TMT-B				
			Boston Naming Test				
			Fluidez verbal				
			Praxias ideomotoras				
Antecedentes familiares			Prueba del Reloj				

MMSE: Mini-Mental State Examination; WMS-III: Wechsler Memory Scale- III; TMT-A: Trail Making Test-A; TMT-B: Trail Making Test B; BADS: Behavioral Assessment of Dysexecutive Syndrome; NPI: Neuropsychiatric Inventory; CT: computed tomography; MRI: Magnetic resonance imaging.

Este trabajo de investigación ha seguido los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos con nº interno 11/372-E (ANEXO 10.1).

A todos los pacientes se les solicitó permiso para ser incluidos en el estudio mediante un consentimiento informado escrito en el que se explicaron las exploraciones a las que iban a ser sometidos. Se informó a los pacientes de la posibilidad de abandonar el estudio en el cualquier momento del mismo, sin perjuicio alguno de cara a la asistencia facultativa que pudieran precisar (ANEXO 10.3).

## 5.2 Criterios de inclusión y exclusión

### 5.2.1 Criterios de inclusión

El grupo demencia tipo EA debía haber sido diagnosticado mediante un estudio neurológico detallado incluyendo pruebas de laboratorio, evaluación de neuro-imagen y test psicométricos. Los pacientes con demencia debían de encontrarse en un estadio leve (GDS 4) o moderado (GDS 4-5).

El grupo control no debía de tener quejas de memoria ni MMSE inferiores a 25.

Como criterios de inclusión se utilizaron los siguientes:

- PIO < 20 mmHg
- Sin patología oftalmológica
- Disponibilidad y colaboración para la realización de las pruebas del examen oftalmológico.
- Capacidad para entender los procedimientos relacionados con el estudio y otorgar consentimiento al mismo por escrito.

### 5.2.2 Criterios de exclusión

- AV corregida inferior al 0,6 de lejos y de cerca.
- Defectos de refracción superiores a 5 dioptrías esferocilíndricas.
- Oftalmoscopia con características patológicas.
- Opacidades de los medios significativas que impidan la correcta adquisición de imágenes en la OCT.
- Atrofia peripapilar.
- Drusas en el área macular.
- Patología psiquiátrica o trastorno del ánimo que pueda dar valores alterados de MMSE.

## 5.3 Protocolo clínico de obtención de datos

La exploración oftalmológica se realizó en las instalaciones de la Clínica del *Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo*, situadas en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Los test se realizaron siguiendo siempre el mismo orden y por el mismo examinador en todos los casos.

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa que incluía:

- **Historia clínica** completa con los antecedentes familiares y personales, antecedentes personales oftalmológicos (traumatismos, cirugías oculares previas, tratamientos oftalmológicos, etc.) y medicación.
- Determinación de la **AV** y **refracción**. La determinación de la AV se realizó con el test Snellen. La refracción objetiva se obtuvo mediante el refractómetro automático y con el retinoscopio de franja Elite de Welch Allyn (*Skaneateles Falls, Nueva York*) y fue ajustada subjetivamente con gafa de pruebas.
- Estudio de la **SC** con el test CSV-1000E (*VectorVision, Greenville, OH*).
- Test de percepción del **color** Farnsworth Roth 28-hue (*Luneau, París*).
- **Test Digital de Percepción (TDP)** (*Rami et al.*)<sup>488</sup>
- **Biomicroscopía** con lámpara de hendidura (*Haag-Streit 900, Bern, Suiza*).
- **Tonometría de aplanación** (*tonómetro de mano Perkins tipo MK2, Clement Clarke International, Essex, Inglaterra*), tras la instilación de fluoresceína sódica 2.5 mg/ml y clorhidrato de oxibuprocaina 4 mg/ml en solución acuosa.
- **OCT 3D OCT-1000** (*Topcon, Japón*) tras dilatación pupilar con tropicamida al 1% (*Alcon Cusí, El Masnou, España*).
- **OCT Spectralis®** (*Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania*) con el módulo OCT2 y el módulo de angiografía.
- **Retinografía** (*Canon Non- Mydriatic Retina Camera CR-DGi, Canon Inc., Tokyo, Japón*).
- **Colorimetría fotográfica** (*Laguna ONhE, Optic Nerve Hemoglobin, España*). Prototipo desarrollado para este proyecto de investigación y cuyas especificaciones técnicas se desarrollan en el apartado Material y Métodos.

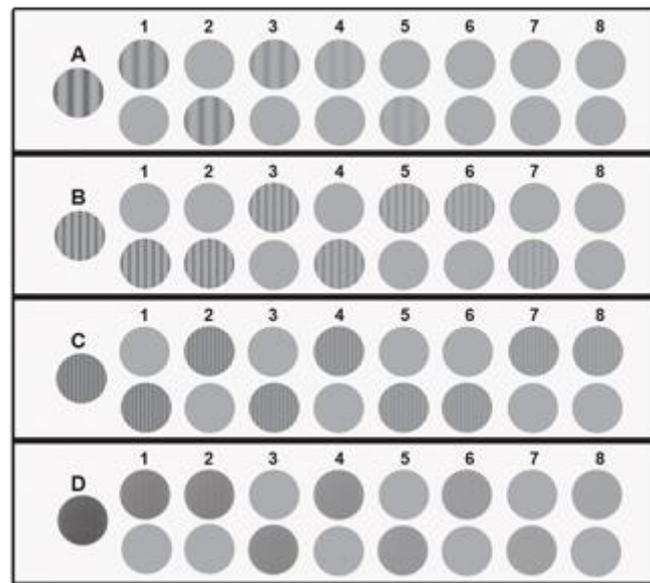
## 5.4 Descripción de las pruebas realizadas

### 5.4.1 Agudeza Visual

Fue determinada la mejor AV corregida usando las cartas de **AV Snellen**. La corrección se obtuvo tras la refracción subjetiva del sujeto, realizada justo antes de la toma de AV. Para conocer la mejor AV, el paciente comenzó a leer cada fila desde la parte superior a la inferior. Se tomó AV umbral cuando no superó el 50% de las letras presentadas en cada fila.

### 5.4.2 Sensibilidad al contraste

La SC fue tomada bajo las mismas condiciones a todos los pacientes utilizando el test **CSV-1000E** (VectorVision, Greenville, OH). El test CSV-1000E tiene una fuente luminosa fluorescente que retro-ilumina un gráfico translúcido y es capaz de controlar y auto-calibrar el nivel de luz a 85 cd/m<sup>2</sup>. El CSV-1000E se realizó a 2,5 m según lo recomendado por el fabricante. El ojo que no estaba siendo examinado fue ocluido. Las cartas translúcidas presentaban cuatro frecuencias espaciales: 3, 6, 12 y 18 cpg. Cada frecuencia espacial está presentada en una fila diferente del test. En cada columna, uno de los círculos presenta una rejilla mientras que el otro está en blanco. Los círculos que presentan la rejilla disminuyen de contraste desde la izquierda a la derecha a lo largo de la fila (Figura 33). El nivel de contraste de la última respuesta correcta es registrado como el umbral de SC en cada fila.



**Figura 33. Test de sensibilidad al contraste CSV-1000E (Vector Vision) utilizado en el estudio.**

Tradicionalmente, los resultados de la SC son recogidos como  $\log SC$ , donde la sensibilidad es la inversa del contraste. Esta conversión tiene como resultado que umbrales de bajo contraste son recogidos como SC alta. El logaritmo en base 10 de conversión se hace porque se sabe que los sistemas sensoriales responden de una manera logarítmica a los cambios en la estimulación sensorial <sup>489</sup>. Esta adaptación en unidades logarítmicas permite convertir en lineales las medidas de SC haciéndolas más apropiadas para el análisis estadístico.

### 5.4.3 Test de percepción del color

Para el análisis de la visión del color se utilizó la prueba de clasificación de tapas, **Farnsworth Roth 28-hue** (Luneau, París), debido a que es una prueba de fácil comprensión, rápida y no requiere de respuesta verbal. Esta prueba fue descrita por primera vez por Roth <sup>490</sup>, se trata de una versión desaturada con colores Munsell de valor 8 y croma 2. La prueba utiliza el equivalente de cada tercera tapa de color de la prueba de Farnsworth Munsell-100 (FM-100) como una prueba desaturada. Los pacientes fueron instruidos para seleccionar la tapa más similar a la tapa de referencia, a continuación, la tapa más similar a la anteriormente elegida, y

así sucesivamente, y para colocarlos en orden secuencial hasta que todas las 27 tapas estaban dispuestas en una secuencia circular (Figura 34).



**Figura 34. Test de percepción del color Farnsworth Rue 28-hue y plantilla de recogida de datos.**

Al paciente se le enseñaba al principio la prueba con las tapas colocadas, seguidamente, las tapas eran extraídas y mezcladas. El tiempo para realizar la prueba no se limitó y al paciente se le permitió hacer correcciones. Cuando fue necesario, la AV del sujeto se corrigió para la visión cercana. Durante la realización de esta prueba la iluminación de la habitación siempre fue con luz natural.

Los resultados del Farnsworth Roth 28-hue se registraron en diagramas, que tenían representadas la dirección de los ejes correspondientes a varios tipos de defectos de color de visión. Estos ejes fueron calculados por Roth para la prueba 28-Hue a partir de experimentos llevados a cabo por Verriest<sup>491</sup> con el FM-100<sup>492</sup>. Los errores clasifican al observador como protanómalo, deuteranómalo o tritanomalo (rojo, verde, o azul-deficiente, respectivamente). Siguiendo las especificaciones del fabricante los errores en el eje azul fueron considerados aquellos que estaban mal colocados desde la tapa 43 a la 64 y los errores en el eje deután fueron los considerados de la tapa 42 a la 85. De esta manera, los errores del eje tritán y deután fueron cuantificados.

#### 5.4.4 Tomografía de coherencia óptica

El espesor de la CFNR peripapilar y macular, así como el espesor y volumen macular fue medido con la OCT Modelo **3D OCT-1000** (Topcon, Japan) tras dilatación pupilar con tropicamida al 1% (Alcon Cusí, El Masnou, Spain).

Las tomas de las imágenes de OCT se tomaron con la habitación en penumbra. Se colocó al paciente apoyado correctamente en la mentonera de la OCT. Se seleccionó el aspa verde como punto de fijación tanto para la toma de medidas maculares como peripapilares. Al paciente se le instruyó en mirar continuamente el punto de fijación situado en el interior de la lente ocular del instrumento. Durante todo el tiempo que dura la adquisición de la OCT se vigiló la fijación del paciente por la pantalla del instrumento.

Las imágenes tomográficas fueron construidas desde una serie de perfiles axiales de reflectancia (A-scan) de 2 mm de profundidad en menos de 1 segundo. El espesor de retina y el espesor de CFNR fueron calculados con el procesamiento de la sección transversal de las imágenes usando algoritmos computerizados que detectan los límites mediante la búsqueda de cada A-scan de las tasas más altas a los cambios en la reflectividad y recentrándolos manualmente para subsanar problemas de segmentación si estos se producían.

El espesor retiniano se determinó por el software como la distancia entre la primera reflexión, en la superficie vítreo-retina, y el límite anterior como la segunda capa reflectiva, que corresponde al límite del epitelio pigmentario de retina y la coriocapilar.

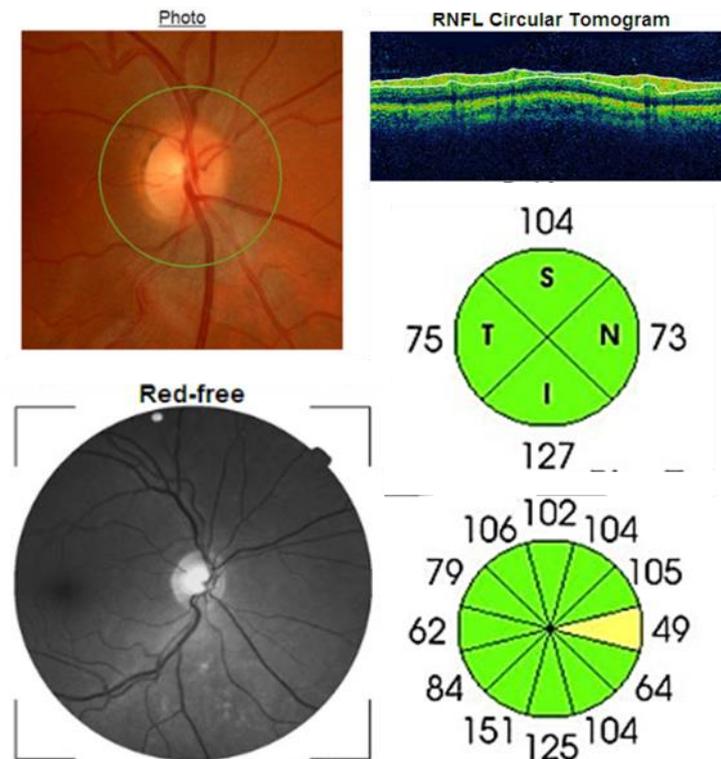
Mientras se produjo el escaneo, el paciente debía mantener el ojo examinado constantemente fijando en un estímulo que presenta el equipo. A cada sujeto se le valoró los protocolos 3D de mácula y peripapilares. Se excluyeron los escáneres de baja calidad y un algoritmo de espesor retinal fallido y se repitieron las mediciones hasta que se logró una buena calidad. Además, las exploraciones con parpadeos durante el proceso de exploración se excluyeron y se repitieron.

El protocolo de escaneo de la CFNR consiste en escaneos consecutivos de 360° consecutivos con un diámetro de 3,4 mm centrado en el disco óptico.

Los parámetros de espesor peripapilar de la CFNR evaluados en este estudio fueron:

- Espesor medio peripapilar ( $\mu\text{m}$ ), correspondiente a la media del espesor de los 360° alrededor de la papila.

- Espesor medio de los cuatro cuadrantes peripapilares ( $\mu\text{m}$ ): cuadrante temporal ( $316^\circ$  a  $45^\circ$ ), cuadrante superior ( $46^\circ$  a  $135^\circ$ ), cuadrante nasal ( $136^\circ$  a  $225^\circ$ ) y cuadrante inferior ( $226^\circ$  a  $315^\circ$ ).
- Espesor medio para cada uno de los 12 cuadrantes correspondientes a los husos horarios ( $\mu\text{m}$ ); situando a las 3 la posición nasal, las 6 en la posición inferior, las 9 como posición temporal y las 12 en superior (Figura 35).



**Figura 35. Informe de OCT del espesor de la CFNR peripapilar.** Arriba izquierda: Retinografía peripapilar con un círculo verde marcando el tejido retiniano considerado para el análisis. Abajo izquierda: Retinografía *red-free* del nervio óptico. Arriba derecha: b-scan de la retina. Medio derecha: Diagrama de los sectores peripapilares analizados: sector temporal ( $316^\circ$  a  $45^\circ$ ), sector superior ( $46^\circ$  a  $135^\circ$ ), sector nasal ( $136^\circ$  a  $225^\circ$ ), sector inferior ( $226^\circ$  a  $315^\circ$ ). Abajo derecha: Análisis peripapilar mediante 12 sectores horarios.

El protocolo 3D de escaneo del área **macular** consiste el análisis centrado en foveola de los 6 mm de la mácula. El programa de análisis de espesor y volumen de retina fue usado para evaluar el escaneo macular.

La mácula se evaluó de dos maneras diferentes: mediante sectores circulares concéntricos y mediante una rejilla cuadrangular de 6x6.

El análisis de grosor macular mediante **sectores circulares concéntricos** se realizó segmentando de la siguiente forma:

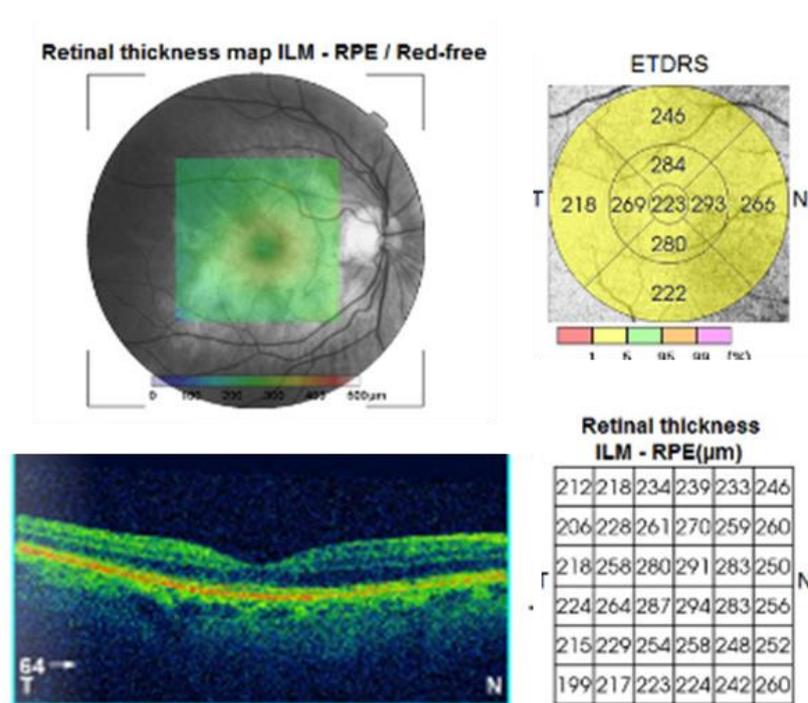
- Espesor medio de los anillos concéntricos centrados en foveola, distribuidos en tres círculos concéntricos ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 36):
  - o Fóvea, con un diámetro de 1 mm centrado en foveola.
  - o Anillo macular interior: con un anillo dispuesto a 3 mm de la foveola.
  - o Anillo macular exterior: con un anillo dispuesto a 6 mm de la foveola.

Los anillos macular interior y exterior a su vez fueron divididos en cuatro cuadrantes (superior, inferior, nasal y temporal).

- Espesor central ( $\mu\text{m}$ ), correspondiente al mínimo espesor encontrado en el análisis macular que corresponde con el espesor foveolar.
- Volumen macular ( $\text{mm}^3$ ), correspondiente al área de los 6 mm analizados en el análisis macular.

El análisis de la mácula mediante una **rejilla de 6x6** se realizó centrando una rejilla de 6x6 mm en la fovea con una densidad de escaneo de 512 x 128 pixels in 3,5s (27.000A scan/s). En total se analizaron 36 cuadrados (de 1 mm por 1 mm cada uno). El centro de la mácula fue definido como el punto más delgado de la depresión foveal. Se tomó para análisis la media de cada cuadrado (Figura 36).

Todos los escaneos fueron recentrados a mano para evitar errores de segmentación por el mismo examinador experimentado.



**Figura 36. OCT macular.** Arriba izquierda: retinografía *red-free* central con un cuadrado verde marcando el tejido retiniano considerado para el análisis. Arriba derecha: Diagrama mostrando los anillos concéntricos y los cuadrantes considerados para al análisis de la mácula y medidas aportadas automáticamente por el software. Abajo izquierda: b-scan de mácula. Abajo derecha: Diagrama mostrando el análisis de la mácula mediante una rejilla cuadrangular de 6x6.

### 5.4.5 OCT Spectralis® para medida del espesor de la mácula segmentada en capas, del espesor de la coroides y de la zona avascular foveal.

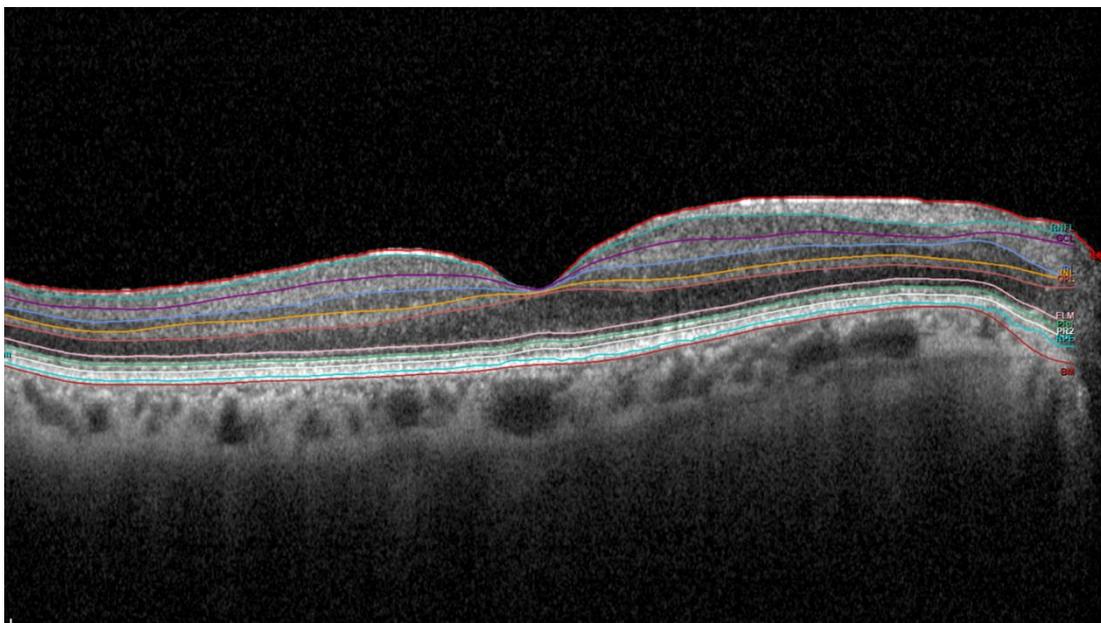
La OCT Spectralis proporciona hasta 40.000 A escáneres/s con una resolución de profundidad de 7 µm en el tejido y una resolución transversal de 14 µm mediante el uso de un diodo de superluminiscencia con 870 nm de ancho de banda. El instrumento combina la tecnología OCT con un oftalmoscopio confocal láser (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania), que proporciona una imagen de fondo de ojo de referencia. Cada OCT B-scan se registra y bloquea en una imagen de referencia. El software OCT puede identificar ubicaciones de exploración anteriores y "guiar" el láser OCT para escanear de nuevo la misma ubicación.

El OCT de Spectralis tiene una función de seguimiento (*follow-up*) para asegurar que la misma ubicación de escaneo sea identificada en las siguientes visitas del programa de seguimiento.

Además, el *eye-tracker* (*TruTrack Active Eye Tracking*; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) y la alta velocidad de exploración reducen los artefactos del movimiento.

La OCT Spectralis proporciona una función automática en tiempo real (ART, del inglés *Automatic Real-Time*) para aumentar la calidad de la imagen. Con la función ART activada, se realizan múltiples escaneos de la misma localización durante el proceso de exploración y se promedian las imágenes para la reducción del ruido. Las exploraciones se adquirieron en el modo de adquisición de alta resolución.

El software de la OCT Spectralis permite la **segmentación** automática de las **capas de la retina** y la cuantificación del espesor de cada una de ellas mediante la misma segmentación que se ha indicado anteriormente de sectores circulares concéntricos. Para el estudio del análisis macular por capas se usó el sistema TruTrack con la función ART activada. Tras la obtención de las imágenes, se comprobó de forma manual que la fovea estuviera bien situada y que la división automática de las capas estuviera bien realizada. En el caso de no fuese así, se realizó la segmentación de capas de forma manual siempre por el mismo examinador experimentado (Figura 37).



**Figura 37.** Imagen de la OCT Spectralis con la segmentación automática de las capas de la retina.

La angiografía OCT (**OCTA**) es una aplicación de la OCT que documenta las diferencias en la reflectividad dentro la retina. A diferencia de la OCT tradicional, la OCTA analiza no sólo

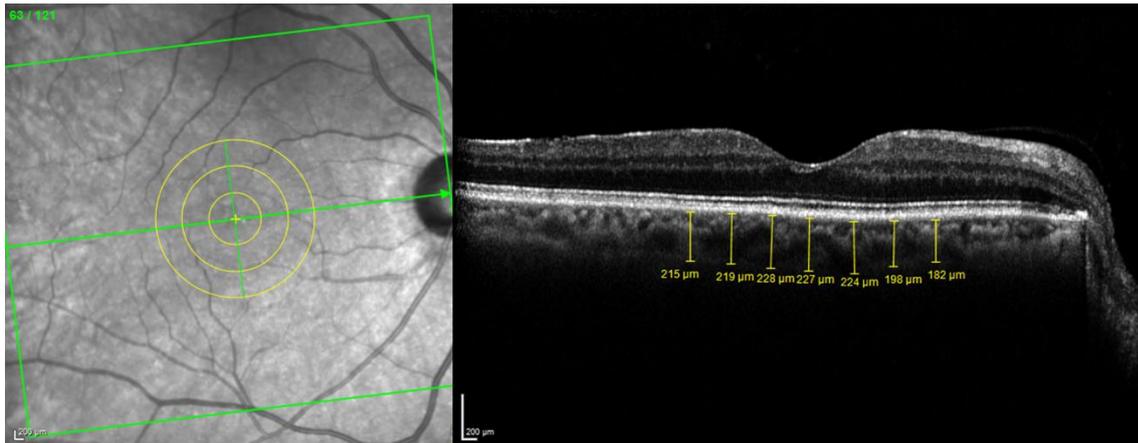
la intensidad de la señal reflejada, sino también los cambios de tiempo en la reflexión causada por las partículas en movimiento, por ejemplo, los eritrocitos que fluyen a través de los vasos. Estos cambios en la señal OCT, medidos mediante la captura repetida de imágenes OCT (B-scans) en cada punto de la retina, permiten la creación de un contraste de imagen entre los vasos perfundidos y los tejidos circundantes, que no muestra ningún cambio de tiempo en la señal OCT debido a la falta de movimiento.

La OCTA hace posible visualizar redes vasculares distintas a diferentes profundidades de la retina y permite divisarlas de forma separada capa por capa.

La OCTA fue realizada con la OCT de Spectralis® con un módulo de angiografía (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) que ofrece imágenes angiográficas OCT de alta resolución con una resolución lateral de 5,7  $\mu\text{m}$  por píxel para la visualización de capilares. Una resolución axial de 3,9 micras por píxel permite la segmentación multicapa precisa y la visualización de los cuatro plexos vasculares de la retina.

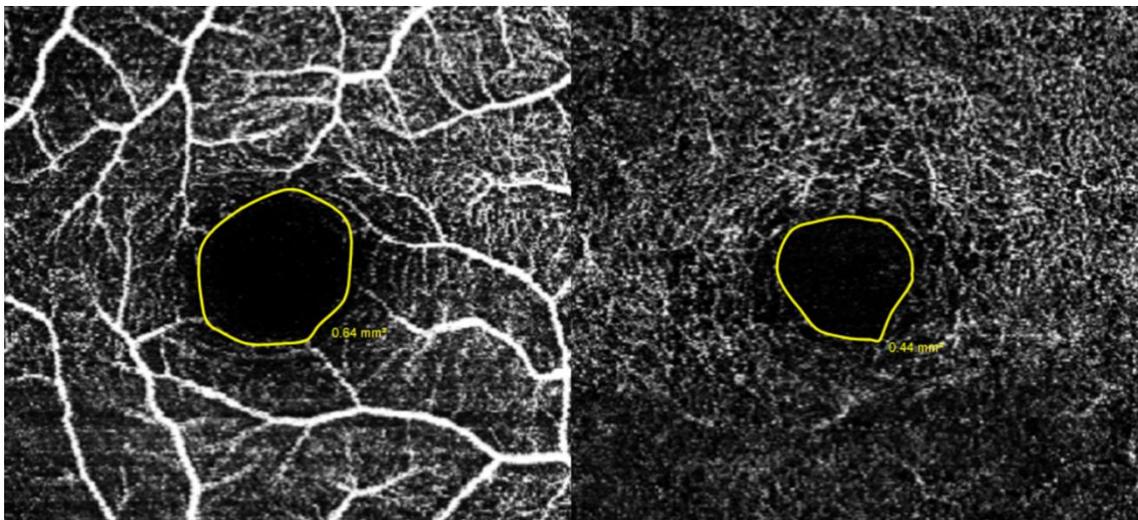
Para las mediciones del **espesor de la coroides** se realizaron escaneos de 20 x 15 grados consistentes en 37 líneas de exploraciones de alta resolución. Se utilizó una luz de fijación interna para centrar el área de exploración en la fovea. Se excluyeron los escáneres de baja calidad y se repitieron las mediciones hasta que se logró una buena calidad. Además, las exploraciones con parpadeos durante el proceso de exploración se excluyeron y se repitieron.

Las medidas coroides se realizaron de forma manual con la función de medida que proporciona el propio software. Para ello, el mismo examinador delimitó el grosor coroidal de forma perpendicular a la retina desde la línea hiperreflectiva externa del EPR hasta la interfase coroidescleral. Se realizaron medidas subfoveales y en los sectores superior, nasal, inferior y temporal. En cada uno de los sectores se realizaron 3 medidas cada una separada 500  $\mu\text{m}$ , por lo que las medidas fueron realizadas a 500  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  y 1500  $\mu\text{m}$  del centro de la fovea. Las medidas fueron dadas en micras (Figura 38).



**Figura 38. Medida del espesor coroideo realizado con OCT Spectralis. Izquierda:** los 10 puntos tomados en cuenta en el análisis. **Derecha:** cuantificación del grosor en micras mediante la herramienta proporcionada por el software.

En el análisis de la **zona avascular foveal (ZAF)** se midieron tanto la zona avascular superficial como profunda de la mácula. Para ello, se tuvo en cuenta la OCTA macular y se realizó una delimitación manual de la zona avascular de cada uno de los plexos con la herramienta de área proporcionada por el software. La medida se realizó en  $\text{mm}^2$  (Figura 39).



**Figura 39. Medida de la zona avascular foveal mediante la OCTA. Izquierda:** delimitación manual del plexo vascular superficial. **Derecha:** delimitación manual del plexo vascular profundo.

### 5.4.6 Retinografía

La retinografía se realizó mediante un retinógrafo no midriático (*Canon Non- Mydriatic Retina Camera CR-DGi, Canon Inc., Tokyo, Japan*). Las imágenes de la papila del nervio óptico obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante el programa Laguna ONhE.

Para poder ser analizadas y procesadas adecuadamente, las fotografías debían cumplir una serie de requisitos técnicos, siendo el color el más importante de los mismos. El estudio de la hemoglobina (Hb) a nivel papilar requirió la obtención de las imágenes con una calidad óptima y cuyas características y distribución cromáticas se debían ajustar a unos parámetros que fueran lo más parecidos a las condiciones fisiológicas.

Es esperable una cierta alteración de los colores originada por el retinógrafo y sus dispositivos al obtener la fotografía: intensidad de la luz, enfoque, intensidad de *flash*, etc. Por lo tanto, las imágenes de la papila obtenidas con el retinógrafo fueron analizadas previamente mediante el programa IMAGE TEST que facilita al explorador la saturación en diversos colores (rojo, verde, azul) de la imagen estudiada. Así mismo, dispone de una serie de filtros y procesadores colorimétricos, previamente calibrados, que en último término determinan si la imagen es adecuada para su posterior procesamiento por el dispositivo de colorimetría fotográfica.

Los parámetros y filtros utilizados en este estudio para validar las imágenes previamente a su análisis colorimétrico fueron:

- Enfoque adecuado.
- Brillo y contraste.
- Intensidad y saturación en los colores rojo, verde y azul: las fotos demasiado saturadas en algún color no superan los límites de calidad necesarios para el análisis mediante colorimetría fotográfica. Cada uno de los colores primarios se codifica con un byte (8bits). Así, la intensidad de cada uno de los componentes se mide según una escala que va del 0 al 255 ( $2^8$ ). En este programa los valores de saturación máxima por colores son:
  - o Máximo valor de rojo permitido = 255
  - o Máximo valor de verde permitido = 181
  - o Máximo valor de azul permitido = 134

Para poder analizar las retinografías, se necesitó un requisito en cuanto a color, que la imagen no se hallara saturada en color rojo. Si se daba esta circunstancia, el dispositivo emitía un mensaje indicando la imposibilidad de procesar la imagen. Para aumentar la fiabilidad en el análisis de la Hb y evitar confusiones con el efecto provocado por la dispersión de luz del cristalino, era recomendable que la imagen dispusiera de cierto componente de color azul, sin llegar a la máxima saturación. No obstante, el dispositivo no emitía ningún mensaje en caso de ausencia completa de azul y llevaba a cabo el análisis de las imágenes, con las limitaciones ya comentadas. Con estas premisas, las imágenes ideales para el estudio de la Hb con Laguna ONhE fueron aquellas con la luminosidad suficiente para aportar una buena visualización y un enfoque de la papila y el nervio óptico y sus vasos sin llegar a tener tanta luz como para saturarse en rojo ni ser tan oscura como para carecer de azul.

Se excluyeron todas las imágenes que no pasaron el control de calidad de este programa o bien aquellas imágenes de mala calidad por opacidad de medios o un enfoque inadecuado.

#### **5.4.6.1 Análisis colorimétrico de la hemoglobina mediante la retinografía papilar**

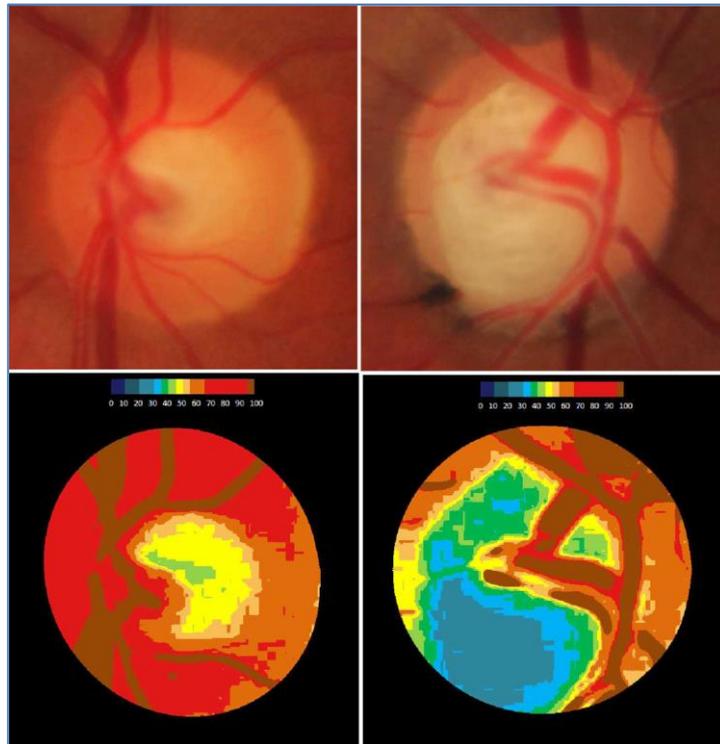
Al contrario que otras regiones del polo posterior del ojo, la cabeza del nervio óptico contiene una cantidad significativa de un solo pigmento, hemoglobina (Hb), la cual es la responsable de su color dependiendo en gran medida de los niveles de Hb que contiene. El color rojo de la Hb se debe a su gran absorción de las longitudes de onda corta del espectro visible.

Similar al ojo humano, el sensor de una cámara fotográfica no lee una única longitud de onda. Por lo general, combina tres sensores de imagen que registran imágenes policromáticas, pero con una absorción preferente por longitudes de onda corta, media, o larga.

Se usó el programa de “**Laguna ONhE**” (Optic Nerve Hemoglobin), diseñado para medir los niveles de Hb de la cabeza del nervio óptico <sup>493</sup>.

Las fotografías del nervio óptico fueron obtenidas con el retinógrafo no midriático Canon Non- Mydriatic Retina Camera CR-DGi (*Canon Inc., Tokyo, Japan*).

El programa de “Laguna ONhE” analizó tres componentes espectrales de las fotografías de la cabeza del nervio óptico: azul (B), verde (G) y rojo (R). Las áreas del nervio óptico con alto contenido de Hb, reflejan principalmente la luz roja. Por el contrario, las zonas con un bajo contenido de Hb reflejan una menor proporción del componente rojo en comparación con la luz verde y azul (Figura 40).



**Figura 40. Representación de una papila normal (columna izquierda) y una glaucomatosa (columna derecha).** Las imágenes superiores corresponden a la retinografía a color del disco óptico, mientras que las imágenes inferiores son sus correspondientes pseudoimágenes representando la cantidad de hemoglobina. Una escala colorimétrica se encuentra en la zona superior de las imágenes inferiores para evaluar la cantidad de Hb. Tomada de de la Rosa et al., 2013 <sup>493</sup>.

Usando diferentes concentraciones o diferentes espesores de varias diluciones de células rojas de la sangre, se estableció experimentalmente que las imágenes fotográficas obtenidas con esta técnica pueden ser usadas para determinar la cantidad de Hb presente en este tejido.

El programa de Laguna ON<sub>h</sub>E utiliza algoritmos matemáticos para la segmentación automática de componentes para llevar a cabo una delimitación semiautomática de la frontera del nervio óptico y para identificar los vasos centrales de la retina. Esto permite al explorador verificar y corregir los resultados obtenidos manualmente. Por lo tanto, se definieron dos áreas de la cabeza del nervio óptico: los vasos centrales de la retina y el propio tejido del nervio óptico.

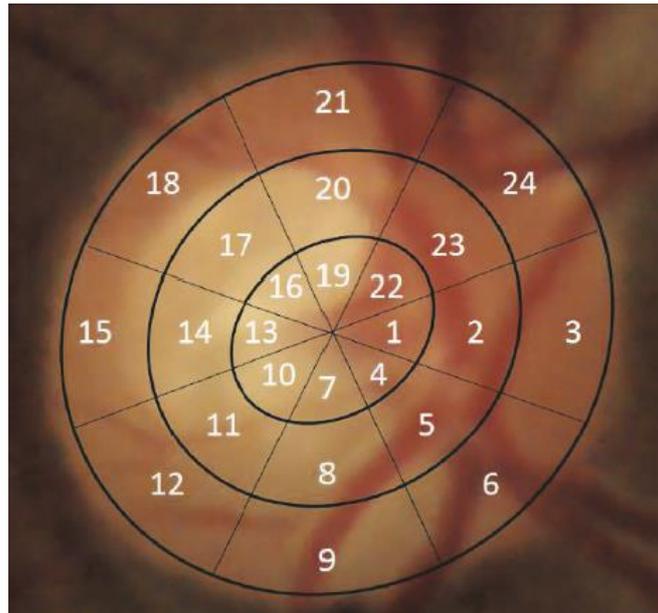
Las fórmulas, a continuación, fueron calculadas en aquellos píxeles correspondientes a los vasos como un todo y para cada píxel aislado de tejido. El resultado obtenido para los vasos se usó como el valor de referencia para el cálculo del contenido de Hb en el tejido. Por ejemplo, para la fórmula R - G, la diferencia R - G se calculó para el tejido, luego se divide por el valor R - G para los vasos y el resultado se multiplica por 100 <sup>494</sup>.

Por último, la influencia del estado del cristalino se compensó mediante el análisis de las diferencias entre los componentes verde y azul antes de calcular los resultados de la cantidad de Hb. Los componentes azules, verdes, y rojos se evaluaron con un programa de análisis de imagen, el Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA) y lenguaje de programación Java (oracle Corporation, Redwook Shores, CA, USA) <sup>493</sup>.

Se calculó la Hb total y por sectores. Para ello se dividió la papila en 24 sectores asimétricos entre sí y dispuestos como se muestra en la Figura 41. Los 24 sectores se encontraban agrupados en grupos de 3 (cada uno de ellos del mismo espesor) formando sectores de 45°. Los 24 sectores se numeraron desde el centro hasta la periferia dentro de cada uno de los sectores de mayor tamaño, comenzando por el grupo de sectores de la zona nasal. Finalmente como se ve en la Figura 41 los sectores quedan distribuidos a modo de tres anillos concéntricos.

La distribución de los grupos de sectores fue la siguiente, considerando 0° en temporal y 90° en superior Figura 41:

- Sector nasal: desde 22,5° a 337,5° pasando por 0°.
- Sector nasal-inferior: desde 337,5° a 292,5°.
- Sector inferior: desde 292,5° a 247,5°.
- Sector temporal-inferior: desde 247,5° a 202,5°.
- Sector temporal: desde 202,5° a 157,5°.
- Sector temporal-superior: desde 157,5° a 112,5°.
- Sector superior: desde 112,5° a 67,5°.
- Sector nasal-superior: desde 67,5° a 22,5°.



**Figura 41. Distribución de la papila óptica por sectores de análisis de Hb del programa Laguna ONhE.** Tomada de Gonzalez-Hernandez et al., 2017 <sup>635</sup>

Se calculó la Hb media total de la papila y de cada uno de los 24 sectores por separado y se representó en una tabla de percentiles, situándolo en el percentil que correspondía.

#### 5.4.7 Test Digital de Percepción

El Test Digital de Percepción (TDP) fue elaborado en el Hospital Clinic de Barcelona en 2007 por Ramí. et al <sup>488</sup>. El **TDP** es un test fácil, rápido y sensible para evaluar los trastornos de la percepción visual en la EA inicial.

El test consta de 15 láminas. En cada lámina se encuentra una misma fotografía en diferentes posiciones del espacio. Las fotografías están distorsionadas mediante la opción de efectos especiales: efecto geométrico (enlosado) y efecto de la trama 24/48 del programa MGI Photo Suite III. Incluye cinco fotografías de paisajes, seis de objetos comunes, dos de personas, un animal y una letra (Figura 42). El objetivo del test es valorar el reconocimiento de situaciones visuales conocidas, enmascaradas por efectos especiales geométricos que dificultan la percepción. La respuesta correcta es la fotografía que está orientada correctamente en el espacio, teniendo en cuenta el contenido de la misma. En la Figura 42 se muestra un ejemplo cuya respuesta correcta sería la cuarta fotografía puesto que se trata de la respuesta lógica de una fotografía de un grupo de personas.



**Figura 42. Test Digital de Percepción.** En la imagen se observa una de las 15 láminas que componen el test. En este test el paciente debe indicar cuál es la imagen que se encuentra en la posición correcta, en este caso sería la imagen 4. Tomada de Rami et al., 2007 <sup>488</sup>.

#### 5.4.8 Mini Mental State Examination

El **MMSE** fue desarrollado por Marshal F. Folstein, Susan Folstein, and Paul R. McHugh en 1975 como un método para establecer el estado cognoscitivo del paciente y poder detectar demencia <sup>149</sup>. Es un método muy utilizado para detectar el deterioro cognitivo y vigilar su evolución en pacientes con alteraciones neurológicas, especialmente en ancianos. Su práctica toma únicamente entre 5 y 10 minutos, por lo que es ideal para aplicarse en forma repetida y rutinaria.

Se utiliza como herramienta de tamizaje, es decir, de evaluación rápida que permite sospechar déficit cognitivo pero que, sin embargo, no permite detallar el dominio alterado ni conocer la causa del padecimiento, por lo que nunca debe utilizarse para reemplazar a una evaluación clínica completa del estado mental.

Consiste en un cuestionario de 11 preguntas donde las características esenciales que se evalúan son: orientación espacio temporal, capacidad de atención, concentración y memoria, capacidad de abstracción (cálculo), capacidad de lenguaje y percepción viso-espacial y capacidad para seguir instrucciones básicas

La prueba se realizó sin limitar el tiempo que el sujeto tarda en responder. La prueba se puntúa de 0 a 30, siendo considerados pacientes con potencial riesgo de deterioro cognitivo si la puntuación era inferior a 25.

## 5.5 Análisis de las retinas de ratones 3xTgAD y controles no transgénicos

Esta parte del trabajo ha sido posible gracias a la **estancia predoctoral** concebida y **becada** por el *Programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad* dentro de los **contratos FPU**, con código **EST16/00024**. Esta estancia tuvo lugar de septiembre a diciembre de 2017 y se realizó tutorizada por el **Prof. António Francisco Rosa Gomes Ambrósio** en el *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI)* en el grupo *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab* de la **Universidad de Coimbra en Portugal**.

En este apartado se han descrito las diferentes estrategias experimentales desarrolladas en este trabajo. Se describe la muestra experimental y su manejo, el instrumental empleado y los protocolos para el procesamiento y análisis de las retinas.

### 5.5.1 Animales de experimentación y anestesia

Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Directiva 2010/63/EU y el RD 53/2013 de 1 de febrero, que establece las normas básicas para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE 8-2-2013) (corrección de errores BOE 26-4-2013). También se siguieron las directrices marcadas por “*Handbook for the Use of Animals in Biomedical Research*” de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para el uso de animales en investigación oftalmológica y del sistema visual, respetando los principios de refinamiento y reducción.

Los animales empleados en este estudio se criaron y mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Coimbra en Portugal.

Los ratones pigmentados usados eran transgénicos de la cepa **3xTgAD** y los controles **C57BL/6** (The Jackson Laboratory), de **16 meses de edad** y con un peso de 40-45 g (Figura 43).



**Figura 43. Muestra experimental.** Ratones 3xTgAD (The Jackson Laboratory)

Los ratones se mantuvieron en jaulas, dentro del animalario, con control de temperatura ambiente (23-24°C), en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad bajo una intensidad luminosa de entre 9-24 luxes. Todos ellos disponían de alimento y agua “*ad libitum*”.

Todas las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo bajo anestesia general, mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (75 mg/Kg Kyolar®. Parke-Davies S.L. Barcelona, España) y medetomidina (1 mg/Kg, Virbac®. Barcelona, España) en 0,1 ml de suero salino al 0,9%.

### **5.5.1.1 Grupos experimentales**

La muestra del estudio contó con un total de **16 animales** de los que se usó **únicamente el ojo izquierdo** de cada animal para el análisis de las retinas.

La muestra estaba dividida en dos grupos:

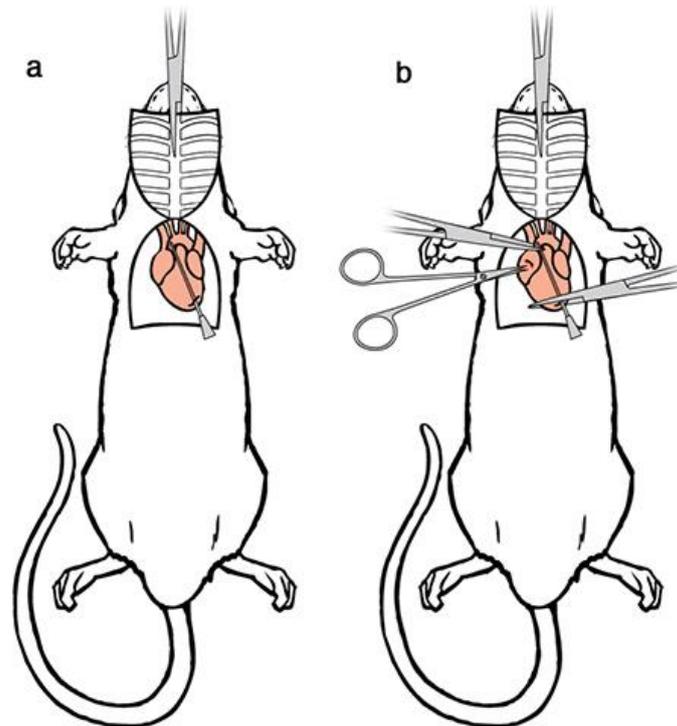
- **Grupo 3xTgAD.** Donde se analizaron las retinas izquierdas de cada uno de los 8 animales de 16 meses de edad.
- **Grupo control de edad.** Donde se analizaron las retinas izquierdas de 8 ratones no transgénicos de 16 meses de edad (*wild-type*).

### 5.5.2 Perfusión y fijación

Los procesos de sacrificio, perfusión y fijación se realizaron todos en la Universidad de Coimbra (Portugal) en el *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab*.

El sacrificio de los animales se realizó bajo anestesia general profunda manteniendo el latido del corazón.

Para realizar la perfusión transcardiaca, se colocó al animal bajo una campana de extracción de gases en posición decúbito supino. Se realizó una esternotomía media, que expuso el corazón y los grandes vasos torácicos. Tras esto, a través del ventrículo izquierdo, se introdujo un catéter de 14G en la aorta ascendente, e inmediatamente después se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y del líquido de perfusión (Figura 44).



**Figura 44. Perfusión y fijación animal. A.** Introducción de la aguja de perfusión a través del ventrículo hacia la aorta ascendente por la que fluye el paraformaldehído. **B.** Incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de sangre y del líquido de perfusión. Tomada de Gage et al., 2012 <sup>495</sup>.

En primer lugar, se perfundió el animal con una solución salina al 0,9% durante unos 5 minutos para eliminar el contenido sanguíneo y a continuación, se perfundió al animal durante 15 minutos con 200 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C para la fijación de los tejidos.

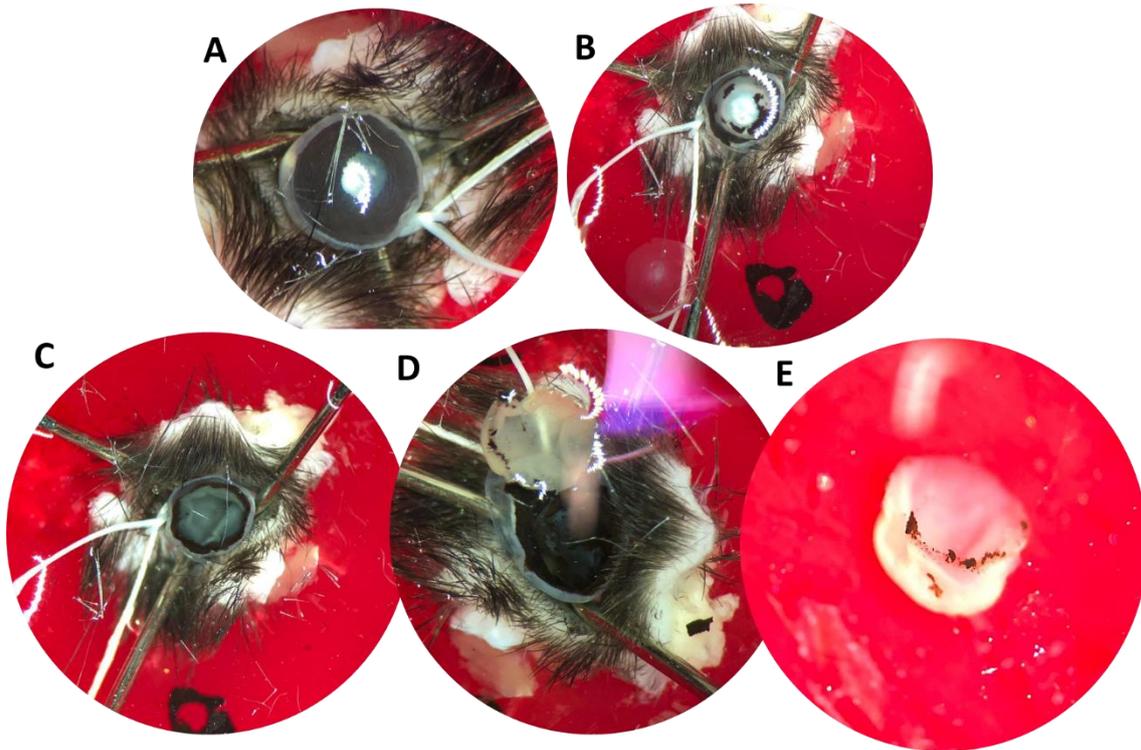
Para poder realizar análisis comparativos detallados de la muestra, la orientación espacial de las retinas es indispensable. Por ello, tras el sacrificio, se dio un punto de sutura en el párpado superior antes de proceder a la enucleación.

Tras esto, los globos oculares se enuclearon, manteniendo parte de los párpados superior e inferior para conocer la orientación del ojo y se postfijaron durante 24 horas a 4°C sumergidos en una solución de paraformaldehído, igual a la empleada durante la perfusión. Por último, los ojos se sumergieron a tampón fosfato salino 0,1M y pH 7,4 y se mantuvieron en la nevera a 4°C hasta su disección.

### **5.5.3 Disección de las retinas para microscopía óptica. Montajes planos de retina**

Una vez fijados y orientadas las muestras, se extrajeron las retinas con un estereoscopio que garantizó la disección fina de los tejidos. Durante la disección todo el tejido estuvo sumergido en tampón fosfato salino 0,1M y pH 7,4 y a baja temperatura mantenida mediante el uso de hielo picado.

Para la extracción de las retinas en primer lugar se realizó una incisión de 360° alrededor del limbo esclerocorneal, permitiendo disecar la córnea. A través de esa abertura, se extrajeron el iris y el cristalino, permitiendo el acceso al polo posterior. Teniendo como referencia el punto dado en el párpado superior, se realizó un amplio corte radial desde la ora serrata hasta las proximidades del nervio óptico. Con la ayuda de un pincel muy fino se disecó la retina separándola de la coroides y se retiró todo el pigmento posible adherido a la zona periférica de la retina. Una vez obtenidas las muestras, estas se mantuvieron en tampón fosfato a 4°C hasta su utilización (Figura 45).

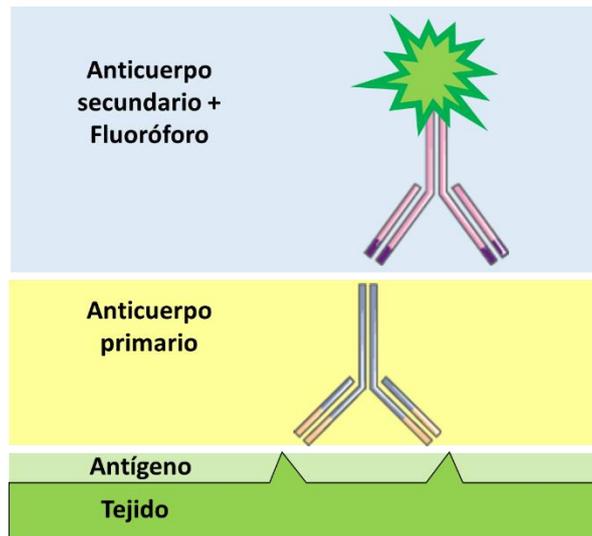


**Figura 45. Disección de la retina.** A: Globo ocular del ratón donde se aprecia el punto dado en la parte superior del párpado. B: Globo ocular tras retirar la córnea y el iris. C: Globo ocular tras la disección del casquete corneal y retirar el cristalino. D: Retina disecada. E: Retina lista para procesar.

#### 5.5.4 Procesamiento histológico de las retinas. Técnicas inmunohistoquímicas

Todas las retinas fueron procesadas en la Universidad de Coimbra como montajes planos y se tiñeron para su estudio inmunohistoquímico con el fin de caracterizar las células microgliales de la muestra.

Este estudio empleó la **técnica de inmunofluorescencia indirecta**. En esta técnica, el anticuerpo primario reconoce el antígeno mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se incorpora un anticuerpo secundario unido químicamente a una sustancia fluorescente, que reconocerá específicamente al anticuerpo primario y revelará mediante fluorescencia la reacción antígeno-anticuerpo (Figura 46).



**Figura 46. Esquema de inmunofluorescencia indirecta.** Los anticuerpos primarios se unen específicamente a los antígenos del tejido. Esta interacción se revela mediante la unión específica del anticuerpo secundario al primario, debido a que lleva unida una molécula fluorescente identificable en el microscopio.

Los **anticuerpos primarios** usados para marcaje inmunohistoquímico de la retina fueron (Tabla 4):

- **Anti-Iba-1**, es un anticuerpo que se une a una proteína de membrana celular del linaje de los monocitos/macrófagos, por lo tanto, de las células dendríticas, macrófagos y microglía. Sin embargo, no se une ni a neuronas ni a astrocitos.
- **Anti-OX-6**, anticuerpo que reconoce las moléculas MHC-II presente en células presentadoras de antígenos como células dendríticas y macrófagos.

Los **anticuerpos secundarios** específicos que se usaron fueron (Tabla 4):

- Alexa Fluor 488 (Iba-1)
- Alexa Fluor 568 (OX-6)

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios a antígenos del tejido, las retinas se incubaron en una solución de bloqueo, que contenía suero del animal en el que estaba desarrollado el anticuerpo secundario.

**Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios usados para el análisis inmunohistoquímico de las retinas.**

	Anticuerpos	Concentración	Host	Referencia no.	Procedencia
<b>AC. Primarios</b>	Iba-1	1:500	Rabbit	019-19741	WAKO
	Ox-6	1:250	Rat	14-5321-82	eBioscience
<b>AC. Secundarios</b>	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:500	Goat	A11008	Invitrogen
	Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rat IgG (H+L)	1:500	Goat	A11077	Invitrogen

Para el marcaje de los núcleos se usó **DAPI**, que es un marcador nuclear que se une a ADN bicatenario siendo su máximo de absorción a la longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión a 461 nm (azul). Este marcador nos permite conocer la posición dentro de la retina en la que se está observando.

El protocolo empleado en el procesamiento de las retinas mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta fue el siguiente:

1. **Lavado del tejido** con PBS (3 x 30 min).
2. **Eliminación del *background***. Las retinas se incubaron durante toda la noche con una solución compuesta por: suero de bloqueo al 10%, TX-100 al 0,2% y PBS.
3. **Incubación con los anticuerpos primarios**. Las retinas se sumergieron durante tres días en una disolución compuesta por: los anticuerpos primarios a la concentración de trabajo, sueros de bloqueo al 1%, TX-100 al 0,2% y PBS.
4. **Lavado del tejido con PBS** (3 x 30 min). Este paso eliminó los restos de anticuerpos primarios que no habían reaccionado con el tejido.
5. **Incubación con los anticuerpos secundarios**. Las retinas se sumergieron durante dos días en una solución de PBS en la que se encontraban disueltos los anticuerpos secundarios a la concentración de trabajo.
6. **Lavado del tejido con PBS** (3 x 30 min). Este paso eliminó los restos de anticuerpos secundarios que no habían reaccionado con el anticuerpo primario y que quedaban libres en el tejido pudiendo generar señales indeseables.

7. **Incubar con 200µl de DAPI (1:1000)** en PBS durante 15 minutos.
8. **Lavado del tejido con PBS (3 x 30 min).**
9. **Montaje del tejido. Montajes planos de retina.** Las retinas se montaron “*in toto*” sin deshidratar, usando para evitar la pérdida de fluorescencia Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, S.L., Burlingame, U.S.A) sin DAPI. La superficie vítrea de la retina se colocó hacia arriba en el portaobjetos, en contacto directo con el cubreobjetos. Una vez cubiertas las retinas, para evitar el escape del medio de montaje, los bordes del cubreobjetos fueron sellados contra el portaobjetos mediante laca de uñas.

En todos los estudios se realizaron controles de rutina para garantizar la especificidad del inmunomarcaje realizado. Para ello, durante la incubación, se procedió a eliminar los:

- **Anticuerpos primarios**, para determinar las posibles uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- **Anticuerpos secundarios**, para determinar la presencia de autofluorescencia del tejido.

Debido a que en el estudio se realizaron técnicas de inmunotinción múltiples (dobles), se añadieron controles adicionales para detectar posibles cruces inespecíficos entre los anticuerpos primarios y secundarios, tal y como queda reflejado de forma esquemática en la Tabla 5.

**Tabla 5. Controles de inmunohistoquímica.**

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
<b>Primario A</b>	+	+	+	-	-	+	-
<b>Primario B</b>	+	+	-	+	-	+	-
<b>Secundario A</b>	+	-	+	+	+	-	-
<b>Secundario B</b>	-	+	+	+	+	-	-

Esquema de los controles de las técnicas inmunohistoquímicas múltiples. El símbolo (+) indica la presencia del anticuerpo y el símbolo (-) la ausencia de ellos.

Tras esto, las muestras **fueron enviadas en transporte urgente refrigerado** al Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en España para su **análisis microscópico**.

### 5.5.5 Estudio de la microglía Iba-1+ de la retina

Los montajes planos de retina marcados con los anticuerpos primarios anti-Iba-1 y anti-OX-6 se utilizaron para el estudio cualitativo y cuantitativo de la microglía. Estos se fotografiaron con un microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss, Alemania) junto con el filtro adecuado (Filter set 10, Filter set 64 y Filter set 49. Carl Zeiss, Alemania) que permitía observar el espectro de emisión de los fluorocromos (488nm, 568nm y 461nm), capturándose las imágenes con la cámara digital de alta resolución AxioCam HRm (Photometrics, EEUU) acoplada a este microscopio (Figura 47, Figura 48 y Figura 49).

Para la visualización de los dobles marcajes Iba-1 y OX-6 se utilizó el dispositivo **ApoTome** incorporado al microscopio Zeiss (Carl Zeiss, Alemania).

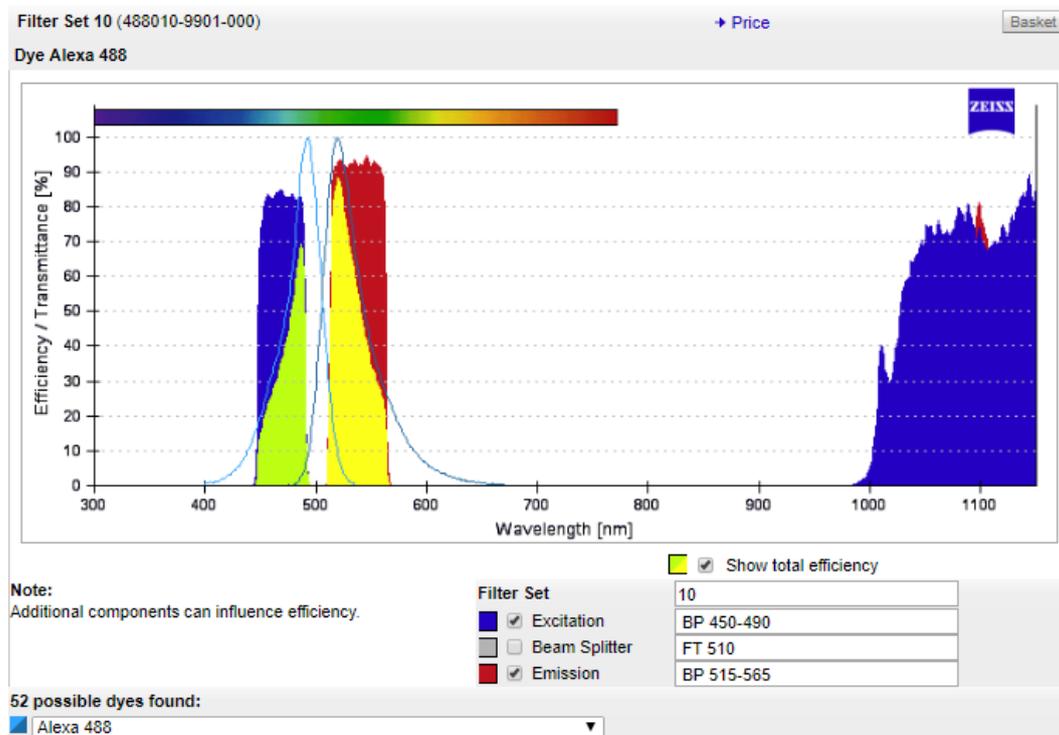


Figura 47. Espectro de absorción y emisión del filtro empleado para la detección del Alexa-488.  
Tomada de <https://www.micro-shop.zeiss.com/>

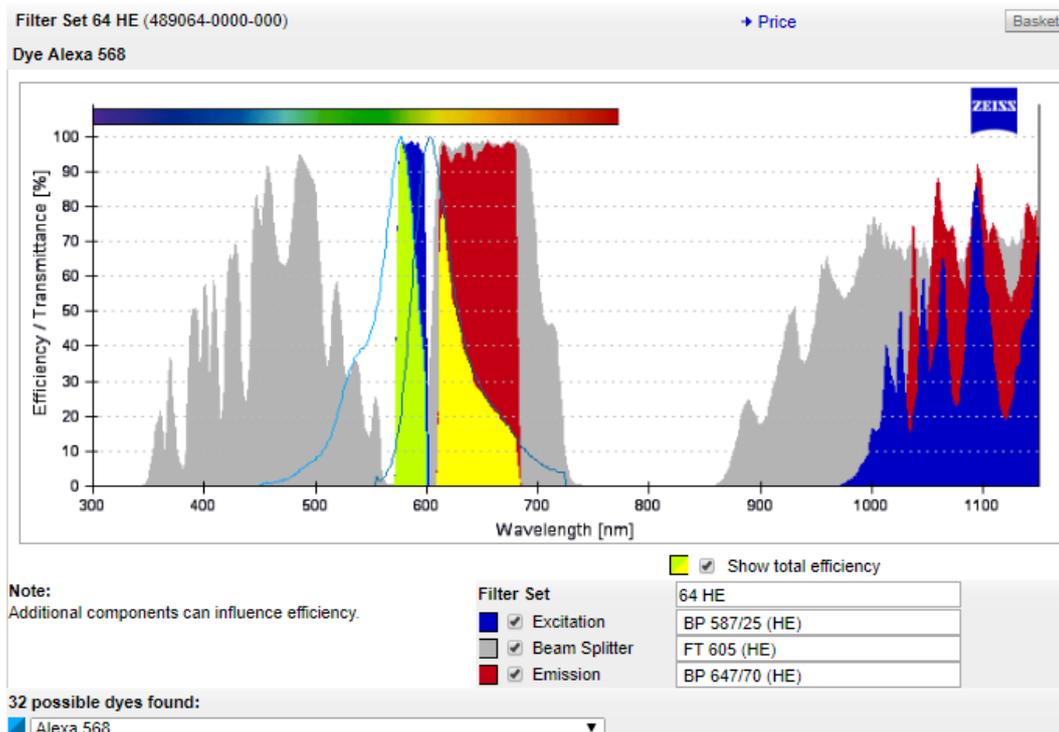


Figura 48. Espectro de absorción y emisión del filtro empleado para la detección del Alexa-568.

Tomada de <https://www.micro-shop.zeiss.com/>

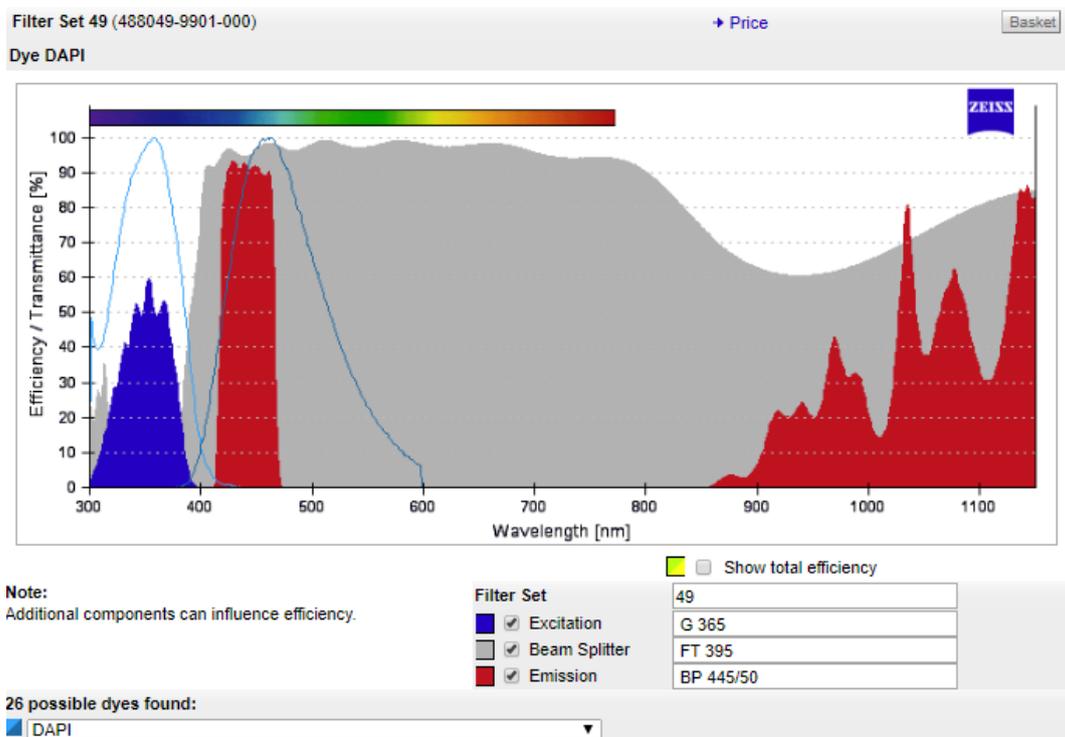


Figura 49. Espectro de absorción y emisión del filtro empleado para la detección del DAPI.

Tomada de <https://www.micro-shop.zeiss.com/>

La utilización de este dispositivo se realizó debido a que la formación de imágenes de muestras gruesas en microscopía de fluorescencia se ve comprometida por la señal que se origina en las regiones que no están en el plano focal. El resultado es que la información de imagen nítida que se origina en el plano focal esta superpuesta con información de imagen borrosa que surge de áreas distales, lo que implica una reducción del contraste y de la resolución de la dimensión axial (eje Z). El ApoTome permite obtener al microscopio de fluorescencia imágenes similares a las obtenidas con un confocal, utilizando la iluminación estructurada (Figura 50).

Esto se consigue usando una rejilla que se inserta en el plano del diafragma de campo en la vía de iluminación del microscopio y se proyecta en la muestra. La imagen de la rejilla proyectada se mueve sobre la muestra utilizando una placa de vidrio paralela a un plano que se inclina hacia adelante y hacia atrás en el eje de la luz. Al menos tres imágenes en bruto de la muestra se adquieren con la estructura de la cuadrícula superpuesta en diferentes posiciones. Estas imágenes se procesan posteriormente en tiempo real utilizando el software del microscopio para crear una sección óptica. El principio subyacente es que la cuadrícula proyectada se hace visible en el plano focal como resultado de las características de la muestra que se excitan con la luz estructurada. En regiones donde la luz no llega a la muestra (en efecto, las líneas de cuadrícula oscuras), no se genera fluorescencia. El software determina el contraste de la cuadrícula en función de la ubicación y elimina la información de la imagen fuera de foco antes de clasificar las tres imágenes en una sección óptica final. La imagen resultante se asemeja a una sección óptica de la muestra en el plano de enfoque. El resultado es una imagen con un contraste y resolución mejorada gracias a la optimización de la relación señal-ruido (Figura 50).



**Figura 50. Microscopía óptica con ApoTome (Zeiss).** Arriba: Proyección de la rejilla de ApoTome sobre la muestra en diferentes posiciones espaciales diferentes en el plano de enfoque. Abajo: Ilustración esquemática de la proyección de la rejilla y resultado final de la muestra. Modificadas de <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/imaging-systems/apotome-2-for-biology.html>

### 5.5.6 Estudio cuantitativo de las células Iba-1+ de la retina

Para llevar a cabo un análisis estadístico más correcto de los tejidos se decidió dividir las poblaciones de las células Iba-1+ analizadas, en dos plexos diferentes el de la **CPE** y el complejo **CPI+CFN-CCG**, que a partir de ahora se denominará **complejo de capas internas de la retina (CCI)**. Esto fue debido a que estas células Iba-1+ se encuentran muy próximas en las capas anteriormente mencionadas haciendo imposible la correcta separación de las mismas.

Para el estudio de la microglía en la retina de estas capas, las imágenes fueron capturadas a **20X**, que proporcionaba un campo de análisis de  $0,1502\text{mm}^2$ , en los ejes retinianos X e Y, tomando como referencia el disco óptico.

Se dividió la retina en **4 campos: superior, nasal, inferior y temporal** y en cada campo se fotografiaron **3 áreas distintas, un área cercana al disco óptico, un área intermedia y un área periférica**. Esta toma de fotografías fue realizada de esta forma para seleccionar zonas representativas del total de la retina.

En cada una de estas áreas se tomaron una serie de imágenes en el eje Z del espesor total de la CPE y del CCI. En las imágenes del eje Z se usó el módulo *Extended Focus* de AxioVision (Zeiss) que lo que permitía era extraer los detalles de foco de imágenes en diferentes planos focales y generar una imagen con una mayor profundidad de foco.

Todas las imágenes seleccionadas se capturaron teniendo en cuenta que no hubiese ausencia o rotura del tejido y que no se solapara con otra imagen.

Por consiguiente, en total se analizaron 12 campos por cada capa, que constituyó a **24 imágenes por retina**. Lo que corresponde a **192 imágenes** en el grupo **3xTgAD** y **192 imágenes** en el grupo **control**. (Figura 51).

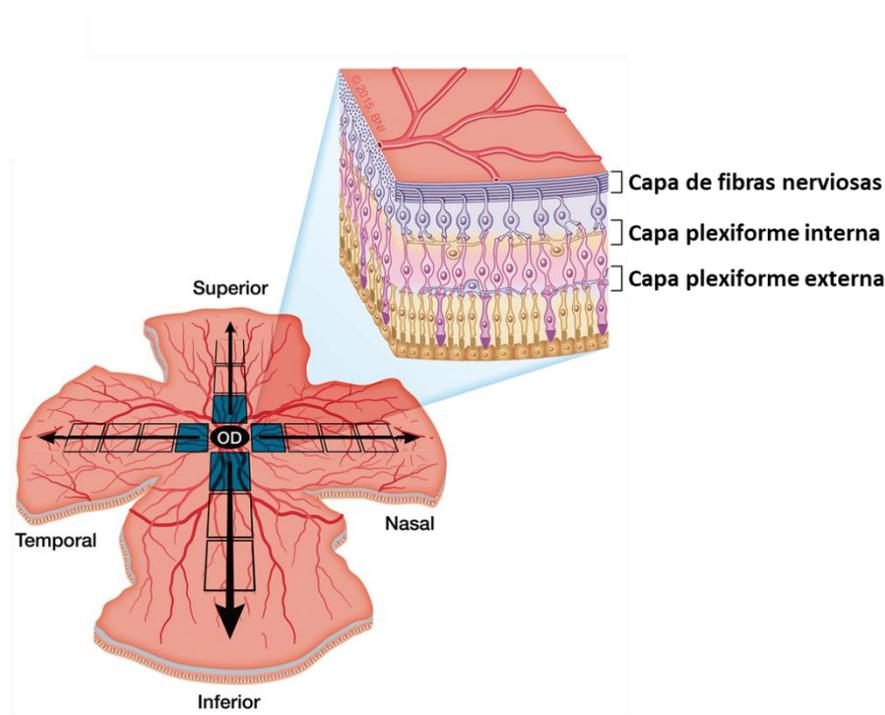


Figura 51. Esquema del montaje plano de retina de las localizaciones de las imágenes tomadas en el eje vertical y horizontal. Modificada de De Gracia et al. 2015 <sup>496</sup>.

#### 5.5.6.1 Estudio del número de células *Iba-1+* de la retina.

Sobre las imágenes previamente obtenidas a 20X, se contabilizó manualmente por cada fotografía el **número de somas** de la microglía *Iba-1+*, usando la herramienta de contaje manual incluida en el software *Interactive Measurement* del programa AxioVision, que está incorporado en el microscopio (Figura 52).

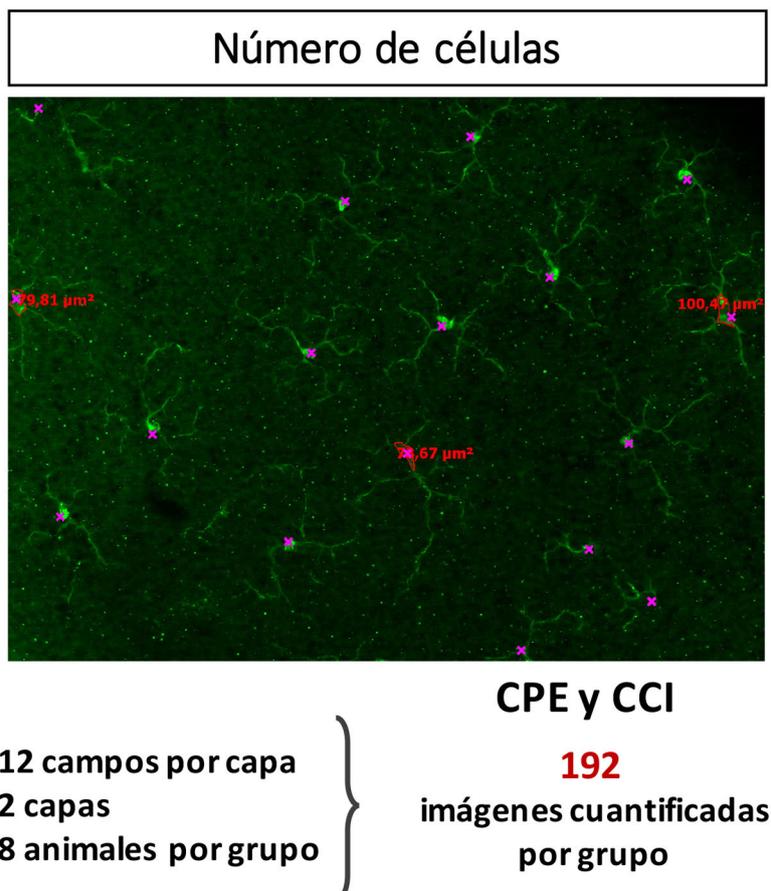


Figura 52. Análisis del número de células Iba-1+ en CPE y CCI.

### 5.5.6.2 Estudio del tamaño del soma de las células Iba-1+ de la retina.

La determinación del tamaño del soma se realizó con las mismas imágenes mediante la herramienta *Interactive Measurement* del programa AxioVision (Figura 53). Esta herramienta permite mediante la delimitación manual del contorno del soma conocer el valor en  $\mu\text{m}^2$ .

Para la medición del tamaño del soma se eligieron 3 microglías en cada imagen a 20X, lo que constituía la medición total de **576 somas de células Iba-1+ en cada grupo a estudio** (Figura 53).

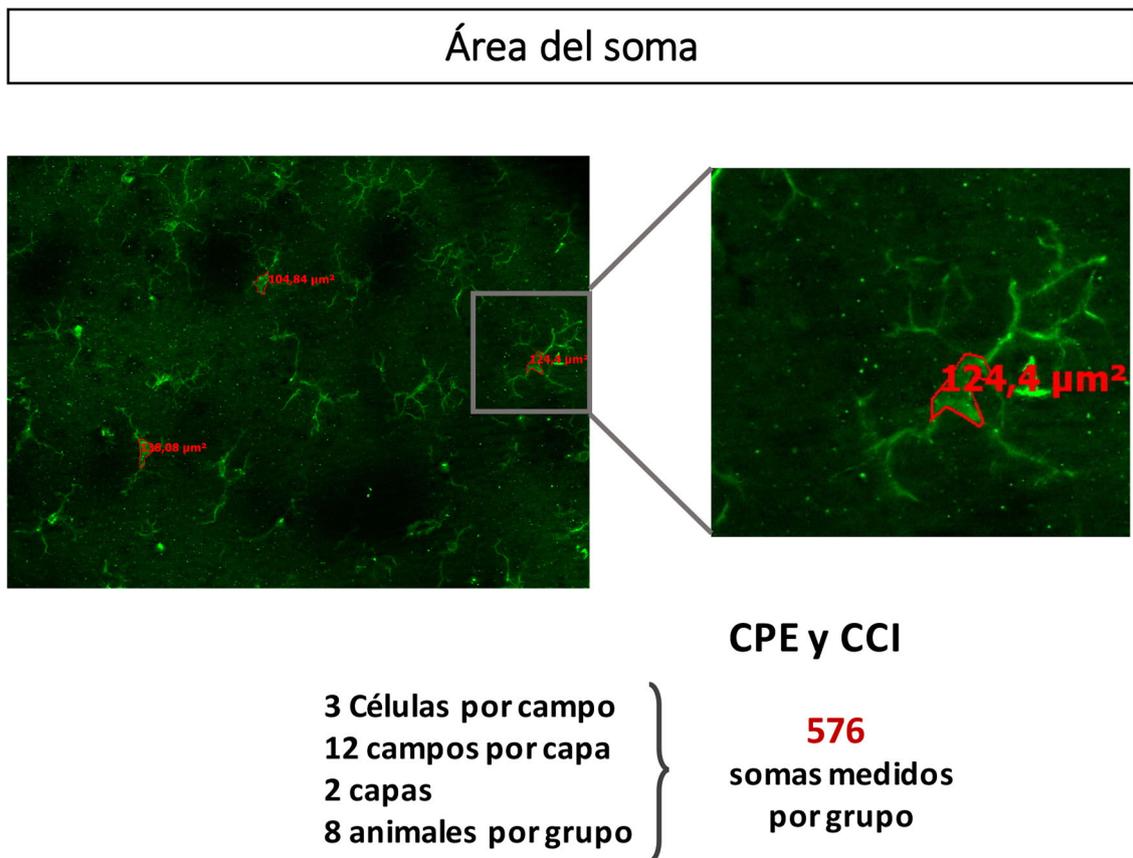


Figura 53. Análisis del soma de las células Iba-1+ en CPE y CCI.

## 5.6 Método estadístico aplicado

El análisis estadístico se realizó usando el software del programa estadístico IBM SPSS Statistics 25 (SPSS©, Inc, Chicago, IL, USA) para Windows.

### 5.6.1 Estadística descriptiva

Se analizaron los datos demográficos (edad, sexo, nivel educativo y MMSE) de los pacientes incluidos en el estudio, así como los parámetros obtenidos en las diferentes pruebas, se utilizaron la media (M) y la desviación estándar (DE).

### 5.6.2 Estadística analítica

A la hora de realizar el estudio estadístico de las diferentes variables se eligió un ojo al azar de cada paciente como muestras independientes.

Para analizar las diferencias entre los grupos para variables continuas se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney.

Se calcularon las curvas de rendimiento diagnóstico ROC (Receiver Operating Characteristic) de todas las pruebas realizadas para los controles y los pacientes con EA leve. Se calcularon los índices de validez: sensibilidad y especificidad. En todos los casos se calculó el intervalo de confianza al 95%.

El estudio de la correlación entre variables se llevó a cabo utilizando el coeficiente de correlación bivariada de Pearson (r).

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un p-valor  $<0,05$ . Dado que durante el análisis de la muestra el p-valor mostró diferentes niveles de significación según acuerdo:

**Tabla 6. Significación estadística.** Equivalencias entre los p-valores y las grafías empleadas en el estudio para diferenciar los distintos niveles de significación estadística.

*	<b>P&lt;0,05</b>
**	<b>P&lt;0,01</b>

## **6. RESULTADOS**



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis descriptivo demográfico

La muestra incluida en el estudio contó con 40 pacientes control, 39 pacientes con EA leve y 21 pacientes con EA moderada.

No en todas las pruebas o en todas las medidas analizadas se incluyeron todos los datos de todos los pacientes. Esto fue debido a que, por las características propias de cada paciente, hubo algunos valores que tuvieron que ser desestimados; ya sea por la poca colaboración por parte del paciente, debido a su estado cognitivo o a la transparencia de sus medios, donde alguno de los parámetros analizados con la OCT no permitían una correcta fiabilidad de las medidas proporcionadas por el software. En cada uno de los apartados se ha indicado el número de sujetos que finalmente se han incluido para cada una de las pruebas.

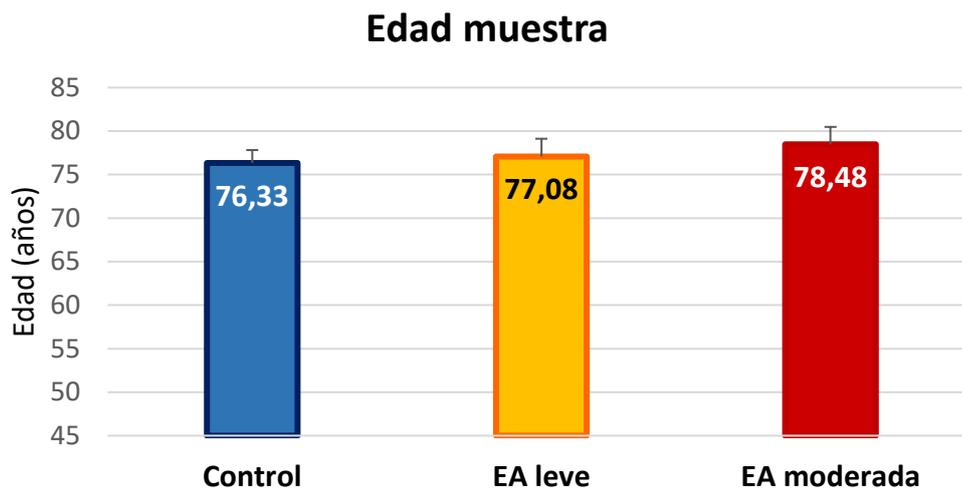
#### 6.1.1 Análisis de la edad de la muestra.

La edad media del estudio fue de  $76,33 \pm 2,97$  en el grupo control,  $77,08 \pm 4,09$  en el grupo de EA leve y  $78,48 \pm 4,01$  en el grupo de EA moderada; sin existir diferencia significativa entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 7, Gráfica 1).

**Tabla 7. Análisis de la edad de los grupos de estudio**

	Control	EA leve	EA moderada	P-valor		
	(n= 40)	(n= 39)	(n= 21)	Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Edad</b>	$76,33 \pm 2,977$	$77,08 \pm 4,09$	$78,48 \pm 4,01$	0,275	0,051	0,409
<b>(rango)</b>	(72-84)	(70-84)	(75-85)			

Media  $\pm$  DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 1. Edad media de los grupos de estudio.**

Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer).

\*\* $p < 0.01$ ; Test de Mann-Whitney.

### 6.1.2 Análisis de sexo y etnia de la muestra.

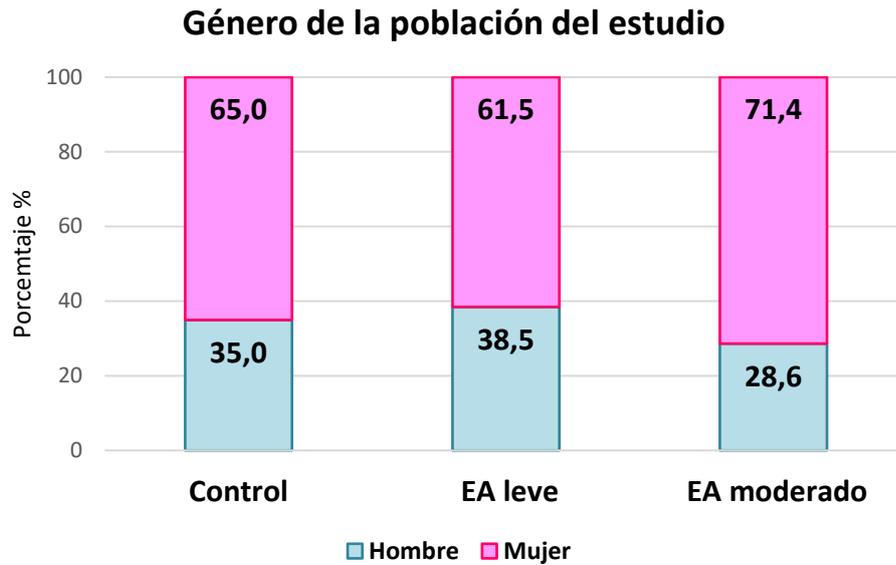
En el estudio los pacientes controles un 65% fueron mujeres, mientras que un 35% fueron hombres. El grupo EA leve, el 61.5% fueron mujeres y el 38.5% fue hombres. En el grupo de EA moderada el 71,4% de los pacientes fueron mujeres y el 28,6% fueron hombres. En todos los grupos hubo una mayor representación de mujeres que no representaba diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ). Todos los participantes fueron de origen caucásico (Tabla 8, Gráfica 2).

**Tabla 8. Análisis demográfico del sexo y etnia de los grupos de estudio**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Género</b>						
Hombre	14	15	6	0,751	0,614	0,447
Mujer	26	24	15			
<b>Raza</b>	Caucásica	Caucásica	Caucásica			

n: tamaño muestral; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus)



**Gráfica 2. Porcentaje del género de los pacientes incluidos en el estudio separados por grupos en función del estado cognitivo (EA: Enfermedad de Alzheimer).**

### 6.1.3 Análisis de MMSE de la muestra.

El test de **MMSE**, el cual valora el estado cognitivo del paciente, siendo la valoración de 0 a 30, donde una puntuación de 30 indica que el paciente ha contestado a todas las preguntas de forma correcta y por debajo de 25 puntos hay una sospecha patológica.

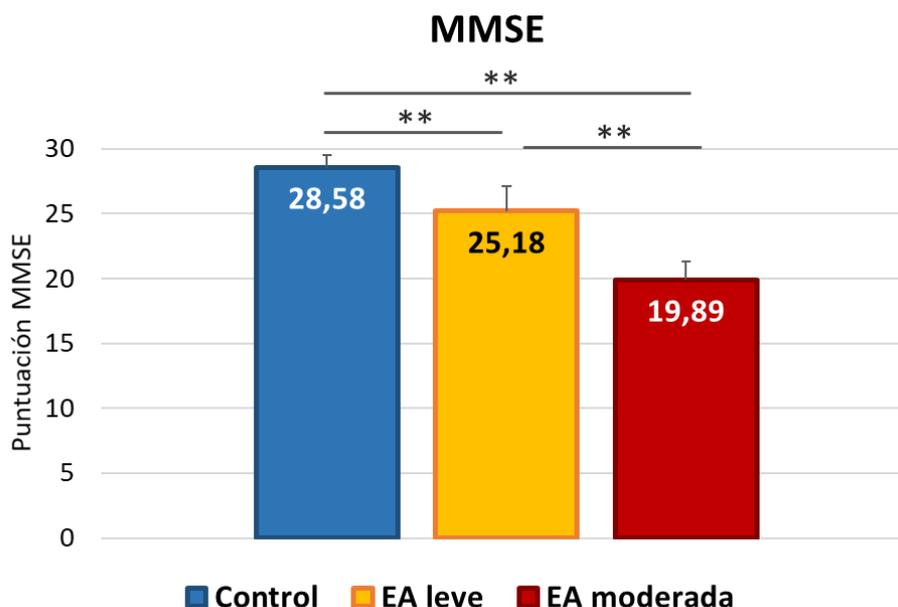
Los valores medios de MMSE fueron de  $28,58 \pm 1,83$  en el grupo control, de  $25,18 \pm 3,80$  en el grupo de EA leve y de  $19,89 \pm 2,76$  en el grupo de EA moderada; existiendo diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio ( $p < 0,01$ , en todos los casos) (Tabla 9, Gráfica 3).

**Tabla 9. Análisis del MMSE de los grupos de estudio**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>MMSE</b>	$28,58 \pm 1,83$	$25,18 \pm 3,80$	$19,89 \pm 2,76$	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; MMSE: Mini Mental State Examination; DE: desviación estándar)



**Gráfica 3. Valores del MMSE de los pacientes de los 3 grupos de estudio.**  
Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer).  
\*\* $p < 0.01$ ; Test de Mann-Whitney.

#### 6.1.4 Análisis de los factores de riesgo cardiovascular de la muestra.

En la muestra se analizaron por separado todos los factores de riesgo cardiovascular en los que el paciente estaba en tratamiento y se compararon su incidencia entre los 3 grupos a estudio.

##### *Hipertensión arterial*

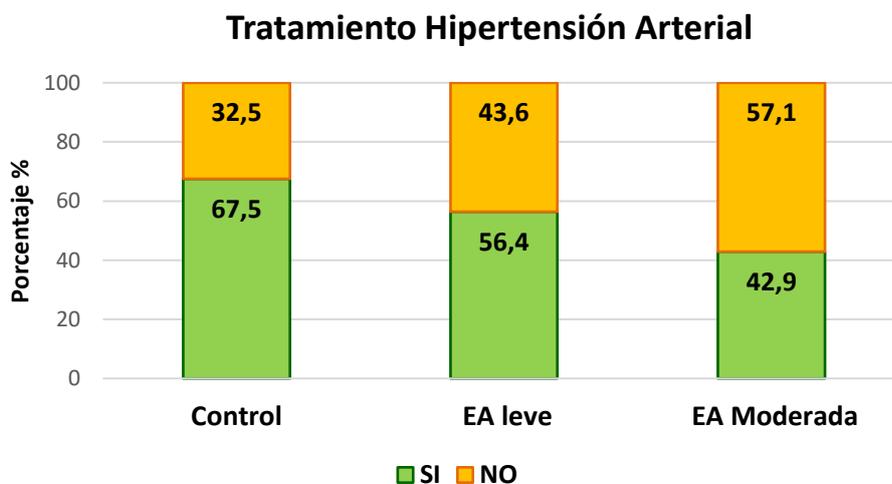
En el grupo **control**, un 67,5% de los pacientes estaba en tratamiento debido a altos valores de tensión arterial, mientras que el grupo **EA leve** el porcentaje de pacientes tratados de hipertensión arterial fue de un 56,4% y de un 42,9% en el grupo de **EA moderada**. Estos porcentajes no mostraban diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ninguno de los tres grupos de estudio (Tabla 10, Gráfica 4).

**Tabla 10. Análisis de la incidencia de hipertensión arterial de los grupos de estudio**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Tto. Hipertensión arterial</b>						
<b>Si</b>	27 (67,5%)	22 (56,4%)	9 (42,9%)	0,313	0,096	0,410
<b>No</b>	13 (32,5%)	17 (43,6%)	12 (57,4%)			

n(%); \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; Tto.: Tratamiento; n: número de pacientes)



**Gráfica 4. Porcentaje de la incidencia de tratamiento de la hipertensión arterial en la muestra de pacientes incluidos en el estudio separados por grupos en función del estado cognitivo (EA: Enfermedad de Alzheimer).**

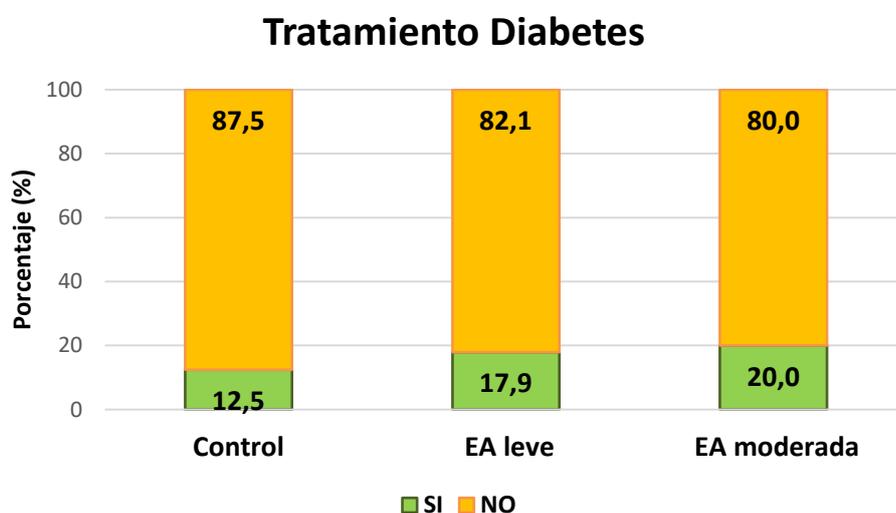
### **Diabetes**

La incidencia de diabetes en el grupo **control** fue de un 12,5%, en el grupo **EA leve** de un 17,9% y en el grupo de **EA moderada** de un 19,0%. En el análisis estadístico entre los tres grupos no se encontró ninguna diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la incidencia de diabetes (Tabla 11, Gráfica 5).

Tabla 11. Análisis de la incidencia de diabetes de los grupos de estudio

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Tto. Diabetes</b>						
<b>Si</b>	5 (12,5%)	7 (17,9%)	4 (19,0%)	0,503	0,447	0,849
<b>No</b>	35 (85,5%)	32 (82,1%)	16 (76,2%)			

n(%); \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; Tto.: Tratamiento; n: número de pacientes)



Gráfica 5. Porcentaje de la incidencia de tratamiento de la diabetes en la muestra de pacientes incluidos en el estudio separados por grupos en función del estado cognitivo (EA: Enfermedad de Alzheimer).

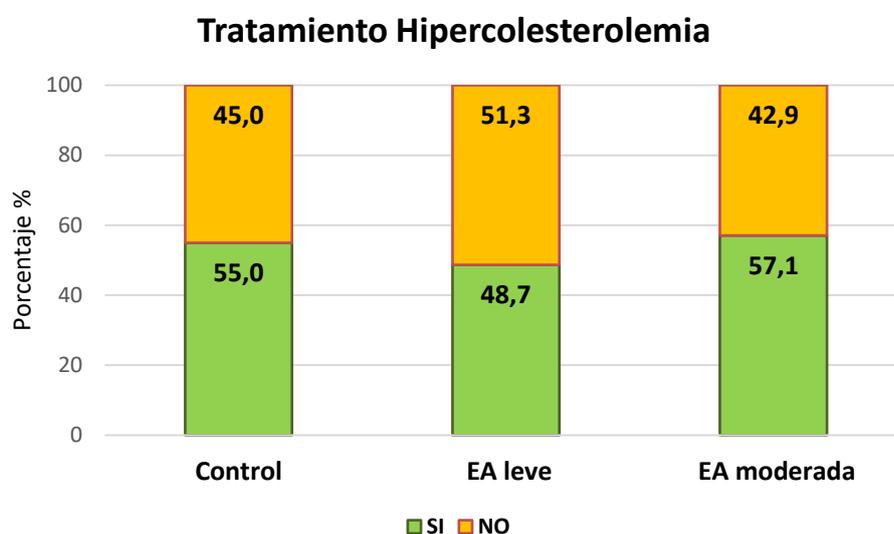
### *Hipercolesterolemia*

El análisis del tratamiento de hipercolesterolemia mostró que en el grupo **control** un 55,0% estaba en tratamiento, en la **EA leve** los pacientes en tratamiento fueron un 48,7% y en el grupo de **EA moderada** un 57,1%. En el análisis estadístico ningún grupo mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el tratamiento de la hipercolesterolemia (Tabla 12, Gráfica 6).

**Tabla 12. Análisis de la incidencia de hipercolesterolemia de los grupos de estudio**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Tto. Hipercolesterolemia</b>						
<b>Si</b>	22 (55,0%)	19 (48,7%)	12 (57,1%)	0,579	0,715	0,415
<b>No</b>	18 (45,0%)	20 (51,3%)	8 (38,1%)			

n(%); \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; Tto.: Tratamiento; n: número de pacientes)



**Gráfica 6. Porcentaje de la incidencia de tratamiento de la hipercolesterolemia en la muestra de pacientes incluidos en el estudio separados por grupos en función del estado cognitivo (EA: Enfermedad de Alzheimer).**

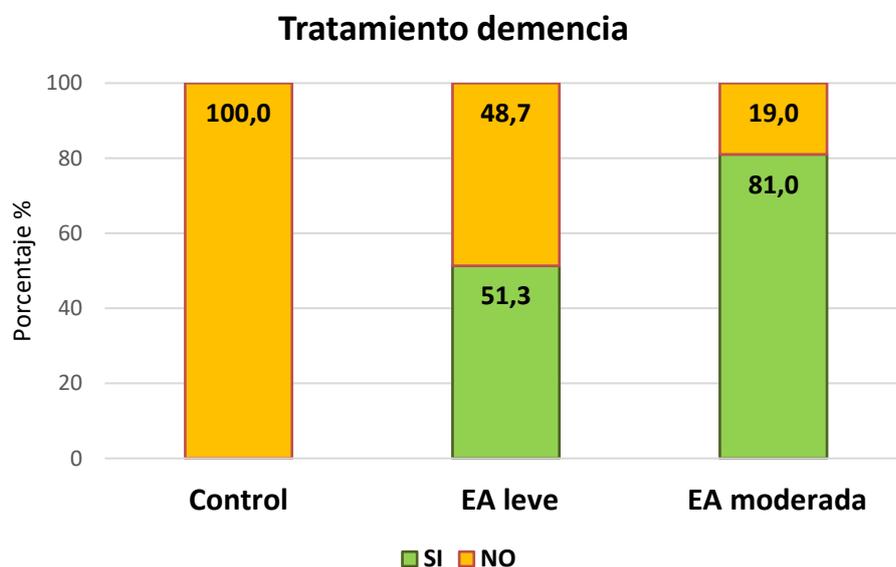
**Demencia**

Los valores de tratamiento de la demencia en el grupo **control** fueron de un 0%, en el grupo de **EA leve** un 51,3% tenían tratamiento para su demencia y en el grupo de **EA moderada** un 81,0%. El grupo de EA leve respecto al control mostraba un aumento significativo de la incidencia de tratamiento ( $p < 0,001$ ). El grupo EA moderada mostraba un aumento significativo en la incidencia de tratamiento tanto con el grupo EA leve ( $p < 0,001$ ) como con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) (Tabla 13, Gráfica 7).

**Tabla 13. Análisis de la incidencia de tratamiento para la demencia de los grupos de estudio**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>Tto. Demencia</b>						
<b>Si</b>	0 (0,0%)	20 (51,3%)	17 (81,0%)	<b>&lt;0,001**</b>	<b>&lt;0,001**</b>	<b>0,012*</b>
<b>No</b>	40 (100,0%)	19 (48,7%)	3 (14,3%)			

n(%); \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney. (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; Tto.: Tratamiento; n: número de pacientes)



**Gráfica 7. Porcentaje de la incidencia de tratamiento para la demencia en la muestra de pacientes incluidos en el estudio separados por grupos en función del estado cognitivo (EA: Enfermedad de Alzheimer).**

### 6.1.5 Análisis de la presión intraocular de la muestra.

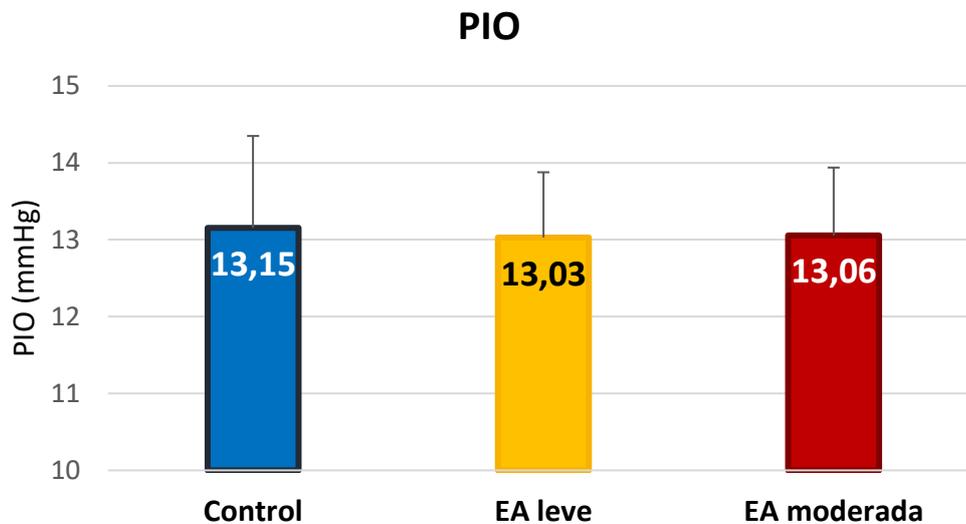
El análisis de la PIO en los controles mostró unos valores de  $13,15 \pm 2,39$  mmHg, en el grupo con EA leve de  $13,03 \pm 1,70$  mmHg y en el grupo de EA moderada de  $13,06 \pm 1,77$  mmHg. En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio ( $p > 0,05$ ) (Tabla 14, Gráfica 8).

**Tabla 14. Análisis PIO de los grupos de estudio.**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 21)	P-valor		
				Control vs EA leve	Control vs EA Moderada	EA moderada vs EA leve
<b>PIO</b>	13,15 ± 2,39	13,03 ± 1,70	13,06 ± 1,77	0,940	0,986	0,822

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; PIO: Presión Intraocular (mmHg); DE: desviación estándar)

**Gráfica 8. Valores de la PIO de los pacientes de los 3 grupos de estudio.**

Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer).

\*\* $p < 0,01$ ; Test de Mann-Whitney.

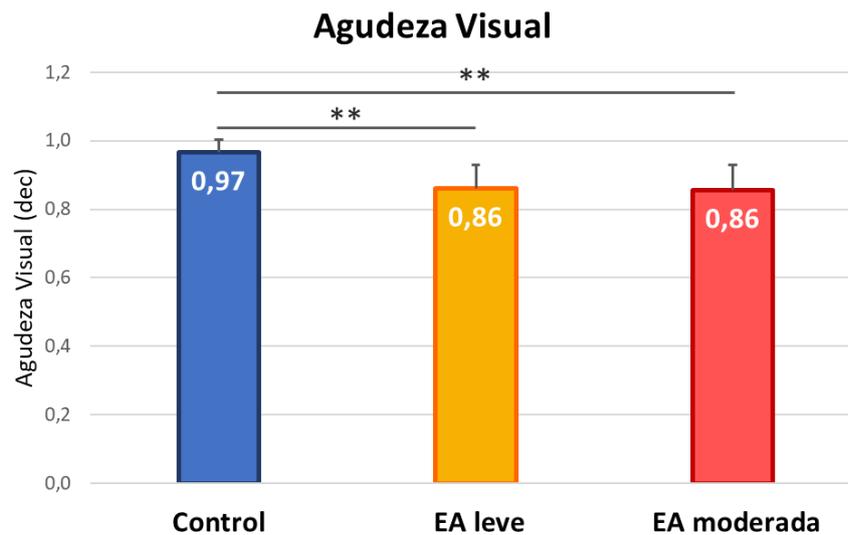
## 6.2 Análisis estadístico test psicofísicos

### 6.2.1 Agudeza Visual.

Los valores medios de la AV en el control fueron de  $0,97 \pm 0,08$ , en los pacientes con EA leve fueron de  $0,86 \pm 0,14$  y en los pacientes con EA moderada los valores medios fueron  $0,86 \pm 0,15$  todos medidos en la escala decimal (Tabla 15, Gráfica 9).

Tanto los pacientes con EA leve, como los pacientes con EA moderada mostraban una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) de la AV respecto al grupo control. Entre el grupo con EA leve y EA moderada no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 15, Gráfica 9).

El descenso de la AV en el grupo con EA leve fue de 10,91% y en el grupo con EA moderada fue de 11,40%, ambos respecto al grupo control. (Tabla 15, Gráfica 9).



**Gráfica 9. Valores de agudeza visual entre los grupos de estudio.**  
Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer; dec: decimal).  
\*\*p<0.01; Test de Mann-Whitney.

**Tabla 15. Agudeza visual de los grupos estudiados**

	Control	EA leve	EA moderada	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
	(n= 40)	(n= 30)	(n= 17)	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Agudeza Visual (dec)</b>	0,97 ± 0,08	0,86 ± 0,14	0,86 ± 0,15	-10,91	<0,001**	-11,40	0,003**	-0,55	0,921

Media ± DE; \*\*P < 0,01 Test de Mann Whitney (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; dec: escala decimal; DE: desviación estándar)

## 6.2.2 Sensibilidad al contraste

Las medidas de SC se realizaron con los valores logarítmicos que provee el fabricante.

El número de pacientes que pudo completar la prueba de SC fueron 39 controles, 39 EA leve y 18 EA moderada.

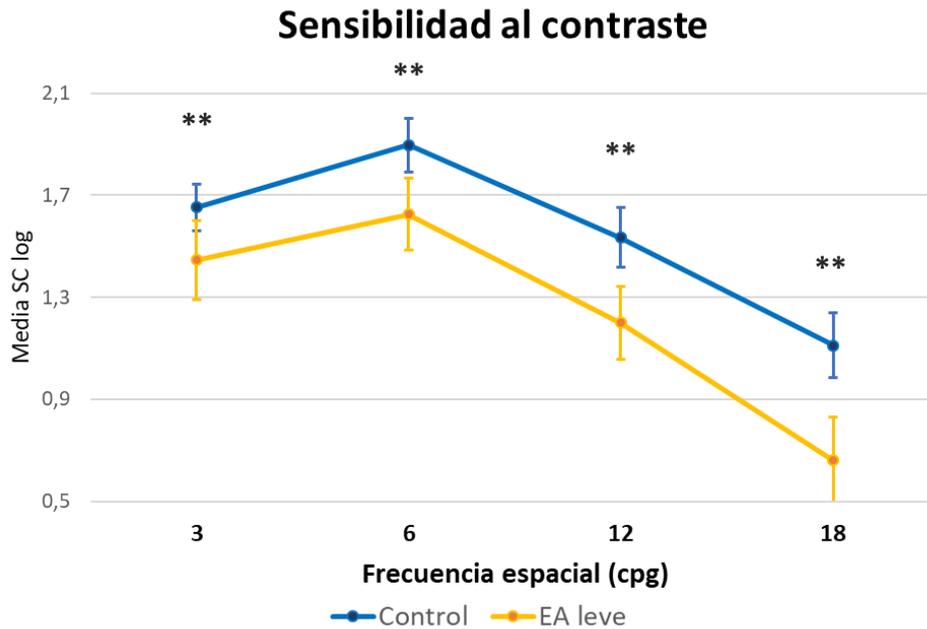
El estudio de la SC en los pacientes con **EA leve respecto a los controles** mostró que había un descenso significativo en todas las frecuencias espaciales (3 cpg ( $1,45 \pm 0,31$ , EA leve vs  $1,65 \pm 0,18$ , control) ( $p < 0,001$ ), 6 cpg ( $1,63 \pm 0,28$ , EA leve vs  $1,90 \pm 0,21$ , control) ( $p < 0,001$ ), 12 cpg ( $1,20 \pm 0,29$ , EA leve vs  $1,53 \pm 0,23$ , control) ( $p < 0,001$ ), y 18 cpg ( $0,66 \pm 0,35$ , EA leve vs  $1,11 \pm 0,25$ , control) ( $p < 0,001$ )). Esta caída significativa en las frecuencias espaciales de los pacientes con EA leve iba en aumento cuánto mayor era la frecuencia espacial; donde la frecuencia de 3 cpg disminuía en un -12,47%, la frecuencia de 6 cpg -14,29%, la frecuencia de 12 cpg -21,75% hasta llegar a la máxima caída que se registró en la frecuencia de 18 cpg con un descenso en los pacientes con EA leve de -40,67% respecto al grupo control (Tabla 16, Gráfica 10).

**Tabla 16. Sensibilidad al contraste de las distintas frecuencias espaciales estudiadas entre el grupo control y el grupo EA leve**

	Control	EA leve	EA leve vs control		
	(n= 39)	(n= 39)	% diferencia	P-valor	
<b>Sensibilidad al contraste (cpg)</b>	<b>3</b>	$1,65 \pm 0,18$	$1,45 \pm 0,31$	-12,47	<0,001**
	<b>6</b>	$1,90 \pm 0,21$	$1,63 \pm 0,28$	-14,29	<0,001**
	<b>12</b>	$1,53 \pm 0,23$	$1,20 \pm 0,29$	-21,75	<0,001**
	<b>18</b>	$1,11 \pm 0,25$	$0,66 \pm 0,35$	-40,67	<0,001**

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; cpg: ciclos por grado; DE: desviación estándar)



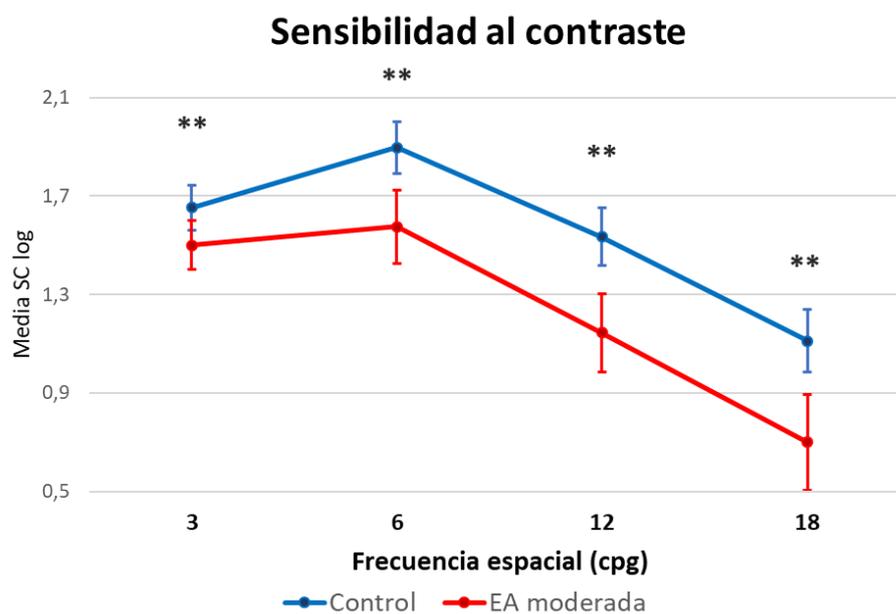
**Gráfica 10. Valores de sensibilidad al contraste entre los grupos control y EA leve para las frecuencias espaciales de 3, 6, 12 y 18 cpg.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer; SC: sensibilidad al contraste; cpg: ciclos por grado). \*\* $p < 0,01$ . Test de Mann-Whitney.

Cuando se analizó el grupo con **EA moderada respecto al grupo control** se observó, al igual que anteriormente, que la SC sufría un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) en todas las frecuencias espaciales analizadas (3 cpg ( $1,50 \pm 0,20$ , EA moderada vs  $1,65 \pm 0,18$ , control) ( $p < 0,001$ ), 6 cpg ( $1,58 \pm 0,30$ , EA moderada vs  $1,90 \pm 0,21$ , control) ( $p < 0,001$ ), 12 cpg ( $1,14 \pm 0,32$ , EA moderada vs  $1,53 \pm 0,23$ , control) ( $p < 0,001$ ), y 18 cpg ( $0,70 \pm 0,39$ , EA moderada vs  $1,11 \pm 0,25$ , control) ( $p < 0,001$ )), donde se repetía el patrón de bajada con un mayor descenso en las frecuencias espaciales mayores. El descenso en el grupo de EA moderada respecto al control en el examen de 3 cpg fue de -9,16%, en 6 cpg fue de -16,94%, en la frecuencia de 12 cpg de -25,41% y el mayor descenso se registró en la frecuencia de 18 cpg con un -36,98% (Tabla 17, Gráfica 11).

**Tabla 17. Sensibilidad al contraste de las distintas frecuencias espaciales estudiadas entre el grupo control y el grupo EA moderada**

	Control (n= 39)	EA moderada (n= 18)	EA moderada vs control		
			% diferencia	P-valor	
<b>Sensibilidad al contraste (cpg)</b>	<b>3</b>	1,65 ± 0,18	1,50 ± 0,20	-9,16	<b>0,009**</b>
	<b>6</b>	1,90 ± 0,21	1,58 ± 0,30	-16,94	<b>&lt;0,001**</b>
	<b>12</b>	1,53 ± 0,23	1,14 ± 0,32	-25,41	<b>&lt;0,001**</b>
	<b>18</b>	1,11 ± 0,25	0,70 ± 0,39	-36,98	<b>&lt;0,001**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; cpg: ciclos por grado; DE: desviación estándar)



**Gráfica 11. Valores de sensibilidad al contraste entre los grupos control y EA moderada para las frecuencias espaciales de 3, 6, 12 y 18 cpg.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer; SC: sensibilidad al contraste; cpg: ciclos por grado). \*\*p<0.01. Test de Mann-Whitney.

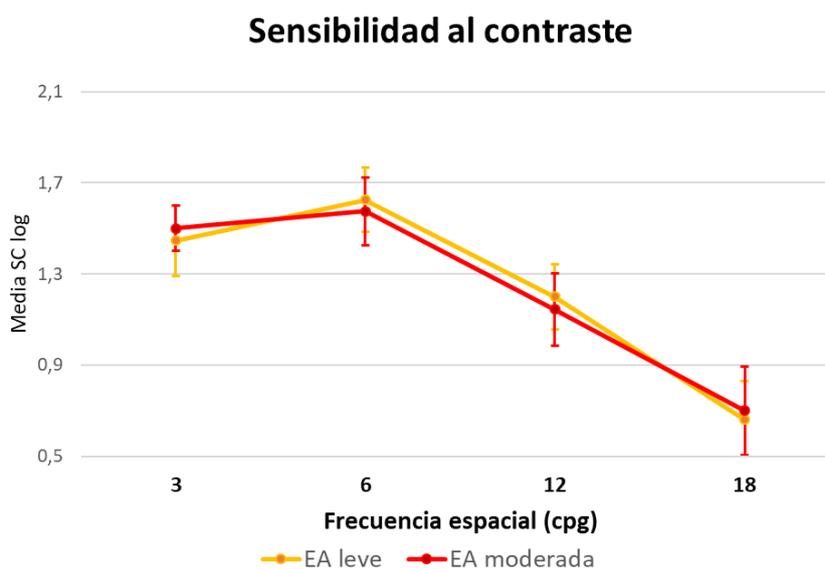
Comparando que ocurría entre los pacientes con **EA moderada respecto a la EA leve** no se encontró ninguna diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en ninguna de las 4 frecuencias espaciales estudiadas (3 cpg ( $1,50 \pm 0,20$ , EA moderada vs  $1,45 \pm 0,31$ , EA leve) ( $p > 0,05$ ), 6 cpg ( $1,58 \pm 0,30$ , EA moderada vs  $1,63 \pm 0,28$ , EA leve) ( $p > 0,05$ ), 12 cpg ( $1,14 \pm 0,32$ , EA moderada vs  $1,20 \pm 0,29$ , EA leve) ( $p > 0,05$ ), y 18 cpg ( $0,70 \pm 0,39$ , EA moderada vs  $0,66 \pm 0,35$ , EA leve) ( $p > 0,05$ )). El porcentaje de variación entre los dos grupos con EA registró valores muy bajos, donde las frecuencias de 3 y 18 cpg mejoraban levemente en el grupo de EA

moderada, mientras que las frecuencias de 6 y 12 cpg empeoraban en el mismo grupo comparándolo con los EA leves (Tabla 18, Gráfica 12).

**Tabla 18. Sensibilidad al contraste de las distintas frecuencias espaciales estudiadas entre el grupo EA leve y el grupo EA moderada**

		EA leve	EA moderada	EA moderada vs EA leve	
		(n= 39)	(n= 18)	% diferencia	P-valor
<b>Sensibilidad al contraste (cpg)</b>	<b>3</b>	1,45 ± 0,31	1,50 ± 0,20	3,78	0,422
	<b>6</b>	1,63 ± 0,28	1,58 ± 0,30	-3,08	0,373
	<b>12</b>	1,20 ± 0,29	1,14 ± 0,32	-4,68	0,599
	<b>18</b>	0,66 ± 0,35	0,70 ± 0,39	6,23	0,781

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; cpg: ciclos por grado; DE: desviación estándar)



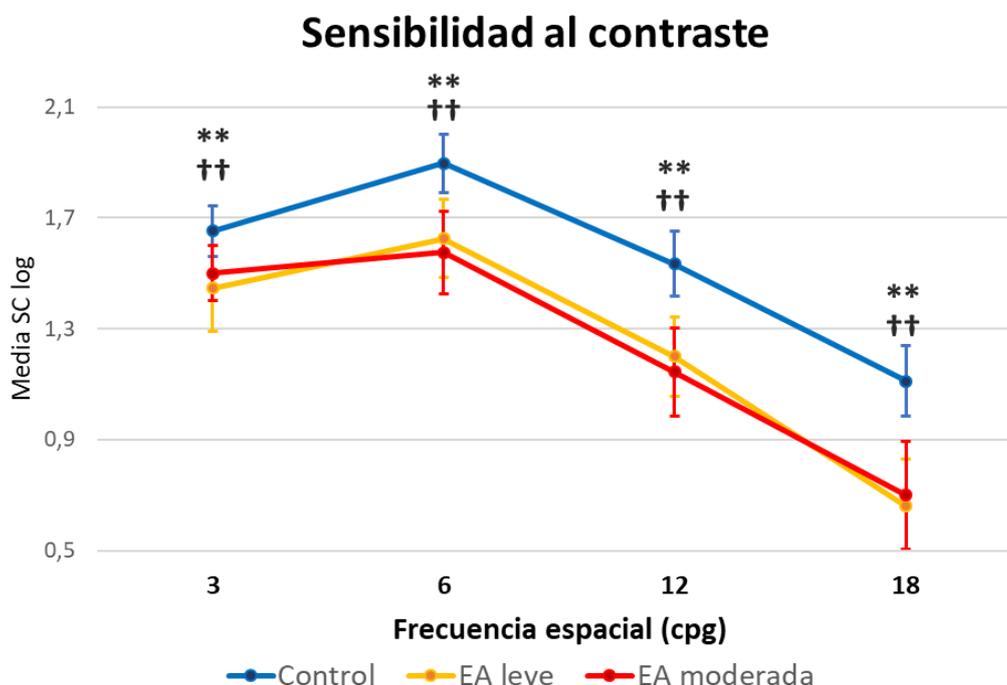
**Gráfica 12. Valores de sensibilidad al contraste entre los grupos EA leve y EA moderada para las frecuencias espaciales de 3, 6, 12 y 18 cpg.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer; SC: sensibilidad al contraste; cpg: ciclos por grado). \*\* $p < 0.01$ . Test de Mann-Whitney.

En la Tabla 19 y en la Gráfica 13 se resumen todos los resultados obtenidos al estudiar las 4 frecuencias espaciales con el test de SC entre los tres grupos de estudio.

**Tabla 19. Sensibilidad al contraste de las distintas frecuencias espaciales estudiadas**

	Control (n= 39)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 18)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve		
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	
<b>Sensibilidad al contraste (cpg)</b>	<b>3</b>	1,65 ± 0,18	1,45 ± 0,31	1,50 ± 0,20	-12,47	<0,001**	-9,16	0,009**	3,78	0,422
	<b>6</b>	1,90 ± 0,21	1,63 ± 0,28	1,58 ± 0,30	-14,29	<0,001**	-16,94	<0,001**	-3,08	0,373
	<b>12</b>	1,53 ± 0,23	1,20 ± 0,29	1,14 ± 0,32	-21,75	<0,001**	-25,41	<0,001**	-4,68	0,599
	<b>18</b>	1,11 ± 0,25	0,66 ± 0,35	0,70 ± 0,39	-40,67	<0,001**	-36,98	<0,001**	6,23	0,781

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney.  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; cpg: ciclos por grado; DE: desviación estándar)



**Gráfica 13. Valores de sensibilidad al contraste entre los grupos de estudio para las frecuencias espaciales de 3, 6, 12 y 18 cpg.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer; SC: sensibilidad al contraste; cpg: ciclos por grado). \*\*p<0.01 control vs EA leve; ††p<0.01 control vs EA moderada; Test de Mann-Whitney.

### 6.2.3 Percepción del color

El número de pacientes que pudo completar el test de Farnsworth fueron 37 controles, 39 EA leve y 20 EA moderada.

*Errores totales.*

El análisis del total de errores inespecíficos en el test de Farnsworth entre el grupo de **EA leve comparado con el grupo control** mostró que los EA leve cometían un mayor número de errores inespecíficos ( $6,5 \pm 3,5$ ) comparados con el grupo control ( $5,0 \pm 3,1$ ). Esta diferencia era significativa con un valor de  $p=0,034$ . El aumento de errores en los EA leve suponía un incremento de fallos de un 30,96% respecto al control (Tabla 20, Gráfica 14).

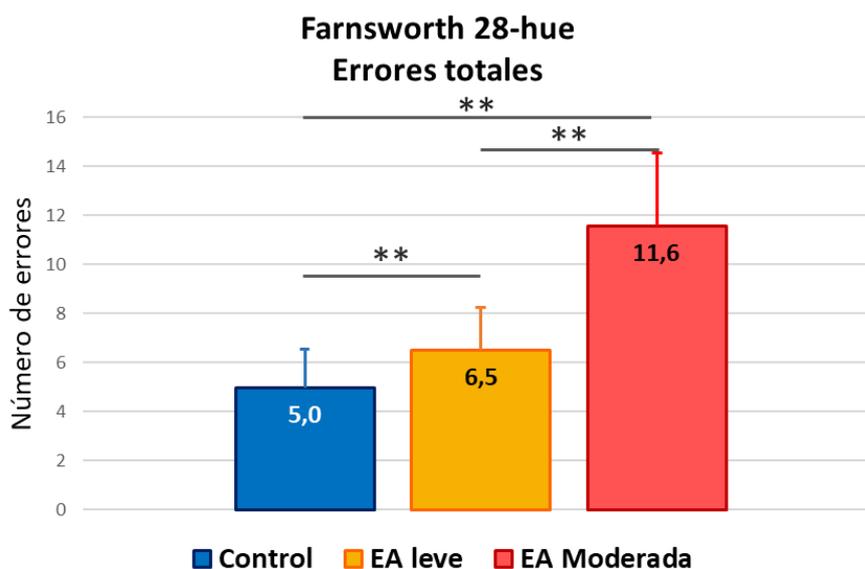
Los pacientes con **EA moderada** tenían un aumento significativo ( $p<0,001$ ) del número de fallos ( $11,6 \pm 6,0$ ) comparados a los **controles** ( $5,0 \pm 3,1$ ). Este incremento de fallos era de un 132,26% sobre el grupo control (Tabla 20, Gráfica 14).

Al comparar entre los dos grupos con EA se encontró que los pacientes con **EA moderada** cometían significativamente ( $p<0,001$ ) más fallos ( $11,6 \pm 6,0$ ) que los pacientes con **EA leve** ( $6,5 \pm 3,5$ ). El incremento de errores de los pacientes con EA moderada era de un 77,34% (Tabla 20, Gráfica 14).

**Tabla 20. Errores totales en el test Farnsworth entre los 3 grupos de estudio.**

	Control	EA leve	EA moderada	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
	(n= 37)	(n= 39)	(n= 20)	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Errores totales</b>	$5,0 \pm 3,1$	$6,5 \pm 3,5$	$11,6 \pm 6,0$	30,96	<b>0,034*</b>	132,26	<b>&lt;0,001**</b>	77,34	<b>0,001**</b>

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 14. Percepción del color en los pacientes del estudio.** Análisis de los errores totales. Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; Test de Mann-Whitney

**Errores región del tritán.**

El análisis de pacientes con **EA leve respecto a controles** mostró un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el número de errores en la región del azul, con valores de  $3,6 \pm 1,9$  en los EA leve mientras que los controles cometían  $2,2 \pm 1,7$  fallos en esta región. Este incremento de fallos en los EA leve fue de un 63,98% respecto al grupo control (Tabla 21, Gráfica 15).

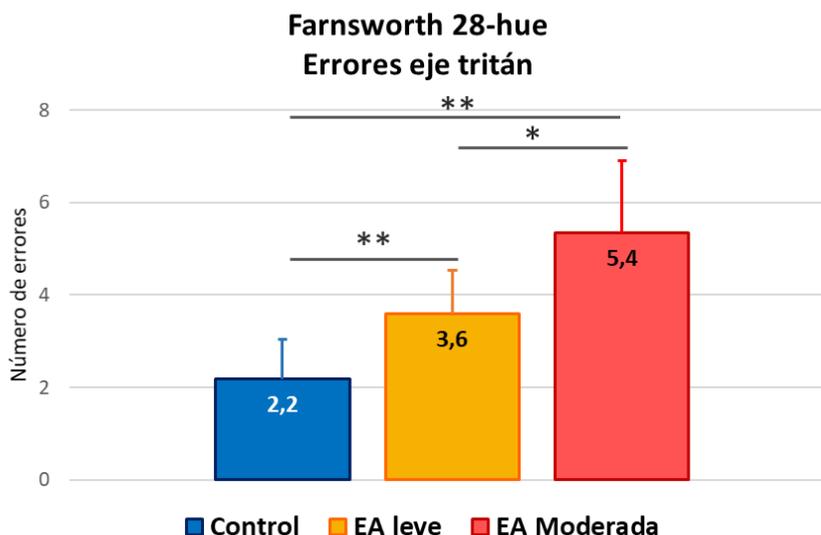
Al comparar el grupo de **EA moderada respecto al control** el aumento también fue significativo ( $p > 0,001$ ) donde los pacientes con EA moderada tenían valores de  $5,4 \pm 3,1$ , mientras que los controles  $2,2 \pm 1,7$ . Este incremento de fallos suponía un aumento del 144,38% comparado con el control (Tabla 21, Gráfica 15).

Los valores analizados **entre los dos grupos de EA** mostraron que los pacientes con EA moderada presentaban significativamente más número de fallos ( $5,4 \pm 3,1$ ) respecto a los EA leve ( $3,6 \pm 1,9$ ) ( $p < 0,001$ ). Este incremento del número de fallos correspondía a un 49,04% respecto a los controles (Tabla 21, Gráfica 15).

**Tabla 21. Errores inespecíficos en el eje del tritán en el test Farnsworth entre los 3 grupos de estudio.**

	Control (n= 37)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 20)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Errores tritán</b>	$2,2 \pm 1,7$	$3,6 \pm 1,9$	$5,4 \pm 3,1$	63,98	<b>0,002**</b>	144,38	<b>&lt;0,001**</b>	49,04	<b>0,017*</b>

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 15. Percepción del color en los pacientes del estudio.** Análisis de los errores inespecíficos en la región del tritán. Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; Test de Mann-Whitney

#### *Errores región del deután.*

El análisis de los errores inespecíficos del eje rojo-verde mostró que los pacientes con **EA leve** ( $3,2 \pm 1,7$ ) tenían un aumento significativo del número de errores respecto a los **controles** ( $2,0 \pm 2,0$ ), donde el p-valor era de 0,003. Este aumento correspondía a un 59,89% más de fallos respecto a los controles (Tabla 22, Gráfica 16).

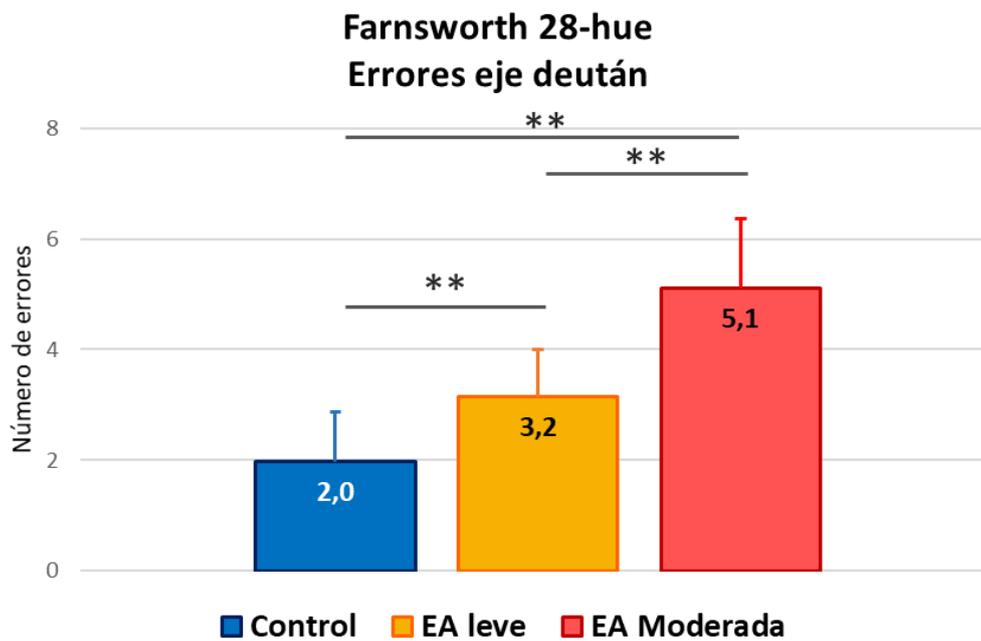
Comparando el grupo de **EA moderada respecto a los controles** este incremento era significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) donde los pacientes con EA moderada tenían una media de errores de  $5,1 \pm 2,5$  y los controles de  $2,0 \pm 2,0$ ; constituyendo un incremento de un 158,49% el número de fallos (Tabla 22, Gráfica 16).

Por último, al comparar lo ocurrido **entre los dos grupos** con EA se encontró que el grupo con EA moderada ( $5,1 \pm 2,5$ ) tenía significativamente más fallos que los EA leve ( $3,2 \pm 1,7$ ). El incremento de fallos en el grupo de EA moderada correspondía a un 61,71% (Tabla 22, Gráfica 16).

**Tabla 22. Errores inespecíficos en el eje del deután en el test Farnsworth entre los 3 grupos de estudio**

	Control (n= 37)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 20)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Errores deután</b>	2,0 ± 2,0	3,2 ± 1,7	5,1 ± 2,5	59,85	<b>0,003**</b>	158,49	<b>&lt;0,001**</b>	61,71	<b>0,002**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 16. Percepción del color en los pacientes del estudio.** Análisis de los errores inespecíficos en la región del deután.

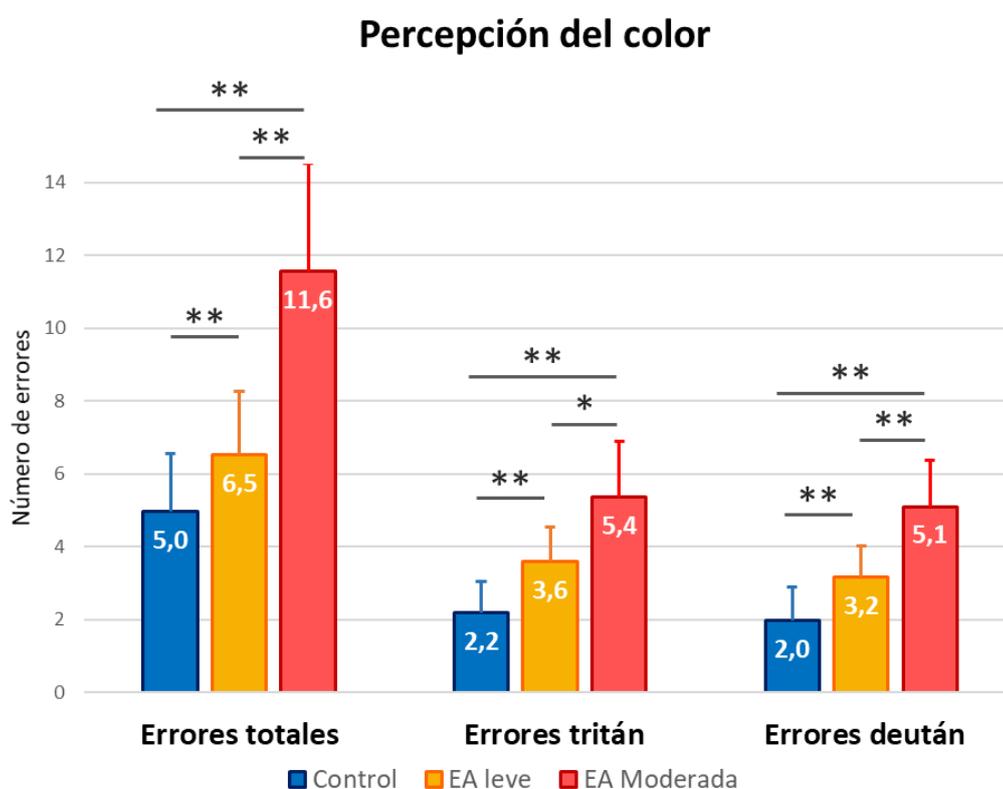
Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \*p<0.05; \*\*p<0.01; Test de Mann-Whitney

En la Tabla 23 y Gráfica 17 se resumen los resultados de la exploración de la visión cromática: errores totales, errores inespecíficos de la región del tritán y del deután y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.

Tabla 23. Percepción del color entre los grupos estudiados

	Control (n= 37)	EA leve (n= 39)	EA moderada (n= 20)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Errores</b>									
<b>Totales</b>	5,0 ± 3,1	6,5 ± 3,5	11,6 ± 6,0	30,96	<b>0,034*</b>	132,26	<b>&lt;0,001**</b>	77,34	<b>0,001**</b>
<b>Tritán</b>	2,2 ± 1,7	3,6 ± 1,9	5,4 ± 3,1	63,98	<b>0,002**</b>	144,38	<b>&lt;0,001**</b>	49,04	<b>0,017*</b>
<b>Deután</b>	2,0 ± 2,0	3,2 ± 1,7	5,1 ± 2,5	59,85	<b>0,003**</b>	158,49	<b>&lt;0,001**</b>	61,71	<b>0,002**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 17. Percepción del color en los pacientes del estudio.** Análisis de los errores totales, los defectos inespecíficos en el eje del tritán y los defectos inespecíficos en el eje del deután. Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \*p<0.05; \*\*p<0.01; Test de Mann-Whitney

## 6.2.4 Test Digital de Percepción

El TDP lo pudieron realizar correctamente un total de 40 pacientes controles, 38 pacientes con EA leve y 20 con EA moderada.

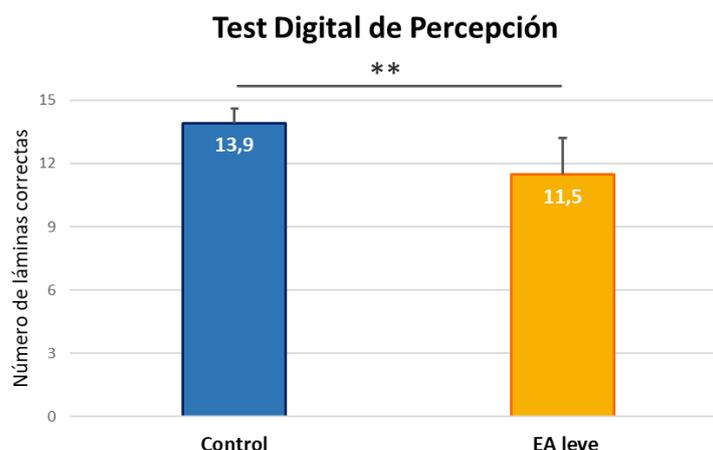
Los valores del TDP presentan un rango de 0 a 15, donde cada lámina contestada correctamente otorga un punto; por lo tanto, a mayor puntuación mejor realizado el test.

Al analizar las puntuaciones de los pacientes con **EA leve respecto a los controles** se observó que los pacientes con EA leve ( $11,47 \pm 3,45$ ) presentaban una puntuación menor significativamente ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo control ( $13,92 \pm 1,33$ ). Donde en los pacientes con EA leve mostraban una puntuación un -17,59% más baja respecto a los controles (Tabla 24, Gráfica 18).

**Tabla 24. Análisis del Test Digital de Percepción entre los grupos EA leve y control**

	Control (n= 39)	EA leve (n= 38)	EA leve vs control	
			% diferencia	P-valor
<b>TDP</b>	13,92 ± 1,33	11,47 ± 3,45	-17,59	<b>&lt;0,001**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; TDP: Test digital de percepción; DE: desviación estándar)



**Gráfica 18. Test de percepción digital en los pacientes control y EA leve.**

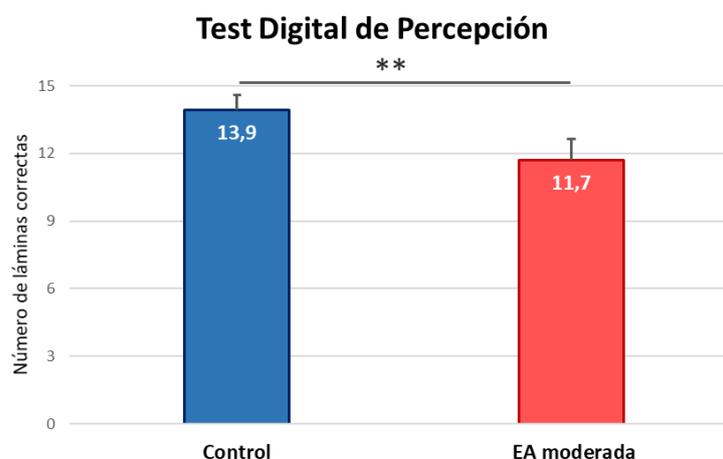
Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \*\*p<0,01; Test de Mann-Whitney

Esta diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se mantenía al comparar el grupo **EA moderada respecto al control**. El grupo EA moderada tenía puntuaciones de  $11,70 \pm 1,89$ ; mientras que los controles eran de  $13,92 \pm 1,33$ ; siendo este descenso de un -15,97% (Tabla 25, Gráfica 19).

**Tabla 25. Análisis del Test Digital de Percepción entre el grupo EA moderada y control.**

	Control (n= 39)	EA moderada (n= 20)	EA moderada vs control	
			% diferencia	P-valor
<b>TDP</b>	13,92 ± 1,33	11,70 ± 1,89	-15,97	<b>&lt;0,001**</b>

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; TDP: Test digital de percepción; DE: desviación estándar)

**Gráfica 19. Test de percepción digital en los pacientes control y EA moderada.**

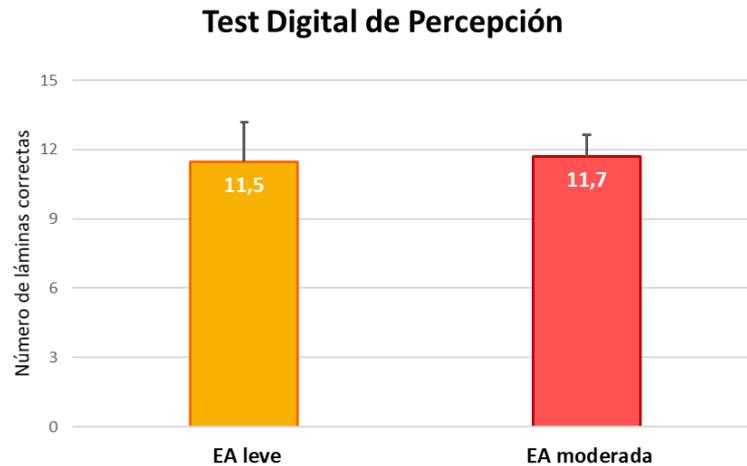
Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \*\* $p < 0,01$ ; Test de Mann-Whitney

Sin embargo, al comparar los pacientes con **EA moderada respecto al grupo con EA leve** no había una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con un leve incremento de puntuación en el grupo EA moderada de un 1,97% (Tabla 26, Gráfica 20).

**Tabla 26. Análisis del Test Digital de Percepción entre los grupos EA moderada y EA leve.**

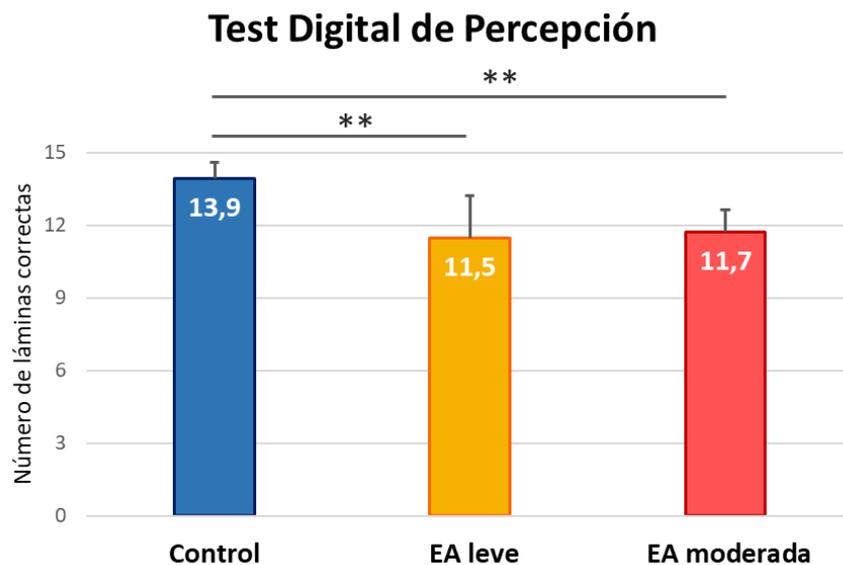
	EA leve (n= 38)	EA moderada (n= 20)	EA moderada vs EA leve	
			% diferencia	P-valor
<b>TDP</b>	11,47 ± 3,45	11,70 ± 1,89	1,97	0,650

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; TDP: Test digital de percepción; DE: desviación estándar)



**Gráfica 20. Test de percepción digital en los pacientes con EA leve y EA moderada.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). Test de Mann-Whitney

En la Gráfica 21 y Tabla 27 se resumen los resultados de la exploración del test TDP y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.



**Gráfica 21. Test de percepción digital en los pacientes del estudio.** Valores medios y desviación estándar (EA: Enfermedad de Alzheimer). \*\* $p < 0,01$ ; Test de Mann-Whitney

**Tabla 27. Análisis del Test Digital de Percepción entre los grupos estudiados**

	Control (n= 40)	EA leve (n= 38)	EA moderada (n= 20)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>TDP</b>	13,92 ± 1,33	11,47 ± 3,45	11,70 ± 1,89	-17,59	<b>&lt;0,001**</b>	-15,97	<b>&lt;0,001**</b>	1,97	0,650

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; TDP: Test digital de percepción; DE: desviación estándar)

## 6.3 Análisis estadístico de las pruebas estructurales de retina.

### 6.3.1 Estudio del espesor total de la mácula mediante OCT.

#### *Análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos.*

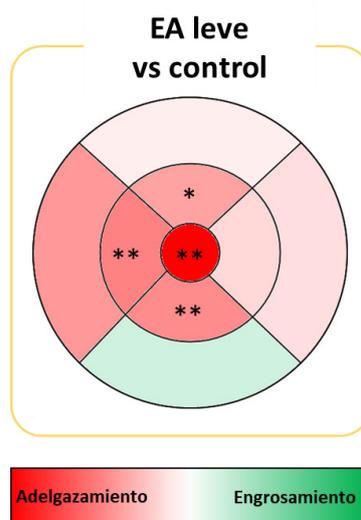
El análisis de OCT de la mácula lo pudieron realizar correctamente un total de 34 pacientes controles, 36 pacientes con EA leve y 13 con EA moderada. Ninguno de estos pacientes incluidos presentó durante el examen ninguna refijación, alteración en la retina u opacidad que pudiera dar lugar a medidas erróneas en el análisis de OCT.

Al analizar los resultados obtenidos en la OCT macular mediante sectores circulares concéntricos se observó en los pacientes con **EA leve respecto a los controles** que había un descenso significativo de espesor en la fovea ( $228,28 \pm 19,64$ , EA leve vs  $247,65 \pm 23,98$ , control) ( $p < 0,001$ ), y en el anillo macular interior en los sectores superior ( $291,42 \pm 17,45$ , EA leve vs  $299,94 \pm 15,43$ , control) ( $p < 0,05$ ), inferior ( $287,58 \pm 17,26$ , EA leve vs  $298,06 \pm 15,76$ , control) ( $p < 0,01$ ) y temporal ( $279,19 \pm 17,72$ , EA leve vs  $290,32 \pm 15,86$ , control) ( $p < 0,01$ ). El mayor descenso significativo se encontró en la fovea (-7,8%), seguido por el anillo macular temporal (-3,8%), el inferior (-3,5%) y el superior (-2,8%). Todos los parámetros analizados, a pesar de que algunos no son significativos, muestran un descenso de espesor respecto al control excepto en el anillo macular exterior el sector inferior, donde existe un leve incremento de un 1,4% en el grupo EA leve respecto al control (Tabla 28, Gráfica 22). En la Gráfica 22 se encuentra una representación colorimétrica de las variaciones porcentuales entre los dos grupos pudiendo observarse una prevalencia de los colores rojos indicando adelgazamiento.

**Tabla 28. Análisis del espesor macular circular entre los grupos EA leve y control**

	Control (n= 34)	EA leve (n= 36)	EA leve vs control		
			% diferencia	P-valor	
<b>Fóvea</b>	247,65 ± 23,98	228,28 ± 19,64	-7,8	<b>0,001**</b>	
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	299,94 ± 15,43	291,42 ± 17,45	-2,8	<b>0,014*</b>
	Nasal	297,74 ± 24,43	294,26 ± 19,57	-1,2	0,158
	Inferior	298,06 ± 15,76	287,58 ± 17,26	-3,5	<b>0,006**</b>
	Temporal	290,32 ± 15,86	279,19 ± 17,72	-3,8	<b>0,005**</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	255,21 ± 13,58	253,89 ± 14,16	-0,5	0,687
	Nasal	271,18 ± 14,39	268,46 ± 15,36	-1,0	0,264
	Inferior	248,67 ± 16,64	252,03 ± 16,14	1,4	0,404
	Temporal	248,47 ± 24,73	240,67 ± 24,02	-3,1	0,321
<b>Espesor central</b>	208,88 ± 26,46	197,67 ± 22,94	-5,4	0,137	
<b>Espesor medio</b>	263,87 ± 14,16	260,10 ± 14,67	-1,4	0,173	
<b>Volumen macular</b>	7,46 ± 0,40	7,35 ± 0,41	-1,4	0,197	

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 22. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA leve vs control en el análisis de sectores de la mácula mediante sectores circulares concéntricos.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01.

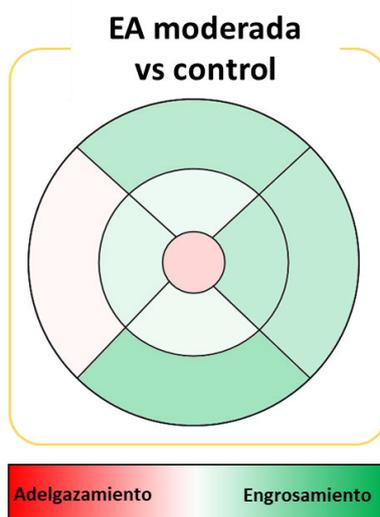
En el análisis de los pacientes con **EA moderada respecto a los controles** ninguno de los valores maculares medidos mediante el análisis de círculos concéntricos tuvo significación estadística (p>0,05), mostrando el grupo de EA moderada valores maculares muy parecidos a los controles, donde la variación porcentual iba desde -1,3% en el espesor central hasta un 2,6% en el sector inferior del anillo macular exterior (Tabla 29, Gráfica 23). En la Gráfica 23 la representación colorimétrica de los cambios muestra una gama de tonos verdes

indicando un incremento de grosor en los pacientes con EA moderada respecto a los controles a excepción la fovea con tonalidades de la región del rojo mostrando un leve adelgazamiento.

**Tabla 29. Análisis del espesor macular circular entre los grupos EA moderada y control.**

		Control (n= 34)	EA moderada (n= 13)	EA moderada vs control	
				% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>		247,65 ± 23,98	244,53 ± 21,50	-1,3	0,849
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	299,94 ± 15,43	301,46 ± 16,48	0,5	0,651
	Nasal	297,74 ± 24,43	303,00 ± 16,32	1,8	0,584
	Inferior	298,06 ± 15,76	299,54 ± 15,05	0,5	0,730
	Temporal	290,32 ± 15,86	292,62 ± 16,77	0,8	0,576
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	255,21 ± 13,58	260,23 ± 12,06	2,0	0,284
	Nasal	271,18 ± 14,39	275,92 ± 11,84	1,7	0,323
	Inferior	248,67 ± 16,64	255,15 ± 16,60	2,6	0,236
	Temporal	248,47 ± 24,73	247,83 ± 13,41	-0,3	0,670
<b>Espesor central</b>		208,88 ± 26,46	206,08 ± 14,46	-1,3	0,940
<b>Espesor medio</b>		263,87 ± 14,16	264,61 ± 9,10	0,3	0,779
<b>Volumen macular</b>		7,46 ± 0,40	7,58 ± 0,34	1,7	0,355

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 23. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA moderada vs control en el análisis de sectores de la mácula mediante sectores circulares concéntricos.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01.

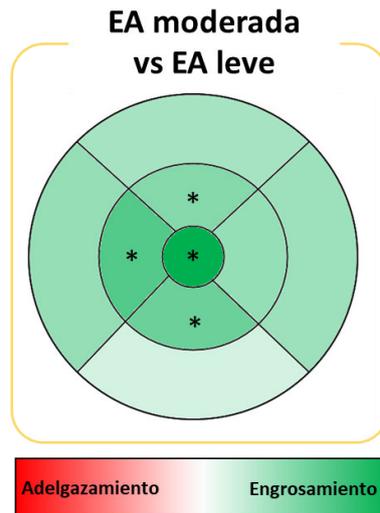
Cuando comparábamos a los pacientes con **EA moderada respecto al grupo de EA leve** se encontró que había un incremento significativo (p<0,05) de los grosores de retina en el grupo

de EA moderada en algunos de los sectores analizados. Estos incrementos se vieron en la fovea ( $244,53 \pm 21,50$ , EA moderada vs  $228,28 \pm 19,64$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ) y anillo macular interior en los sectores superior ( $301,46 \pm 16,48$ , EA moderada vs  $291,42 \pm 17,45$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ), inferior ( $299,54 \pm 15,05$ , EA moderada vs  $287,58 \pm 17,26$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ), temporal ( $292,62 \pm 17,77$ , EA moderada vs  $279,19 \pm 17,72$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ). Estos incrementos significativos de los espesores totales de la retina en el análisis macular en los pacientes con EA moderada presentaban un máximo de 7,1% en la fovea, seguidos por los sectores temporal (4,8%), inferior (4,2%) y superior (3,4%) del anillo macular interior (Tabla 30, Gráfica 24). El resto de parámetros maculares analizados a pesar de no presentar significación estadística también mostraba un incremento del espesor en todas las medidas analizadas en el grupo EA moderada respecto al grupo EA leve (Tabla 30, Gráfica 24). En la representación colorimétrica de la Gráfica 24 los tonos prevalentes son los verdes mostrando zonas con un claro engrosamiento en los pacientes con EA moderada respecto a aquellos en estadio leve.

**Tabla 30. Análisis del espesor macular circular entre los grupos EA moderada y EA leve.**

		EA leve	EA moderada	EA moderada vs EA leve	
		(n= 36)	(n= 13)	% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>		228,28 ± 19,64	244,53 ± 21,50	7,1	<b>0,023*</b>
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	291,42 ± 17,45	301,46 ± 16,48	3,4	<b>0,040*</b>
	Nasal	294,26 ± 19,57	303,00 ± 16,32	3,0	0,131
	Inferior	287,58 ± 17,26	299,54 ± 15,05	4,2	<b>0,025*</b>
	Temporal	279,19 ± 17,72	292,62 ± 16,77	4,8	<b>0,015*</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	253,89 ± 14,16	260,23 ± 12,06	2,5	0,131
	Nasal	268,46 ± 15,36	275,92 ± 11,84	2,8	0,059
	Inferior	252,03 ± 16,14	255,15 ± 16,60	1,2	0,548
	Temporal	240,67 ± 24,02	247,83 ± 13,41	3,0	0,224
<b>Espesor central</b>		197,67 ± 22,94	206,08 ± 14,46	4,3	0,376
<b>Espesor medio</b>		260,1 ± 14,67	264,61 ± 9,10	1,7	0,174
<b>Volumen macular</b>		7,35 ± 0,41	7,58 ± 0,34	3,1	0,059

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



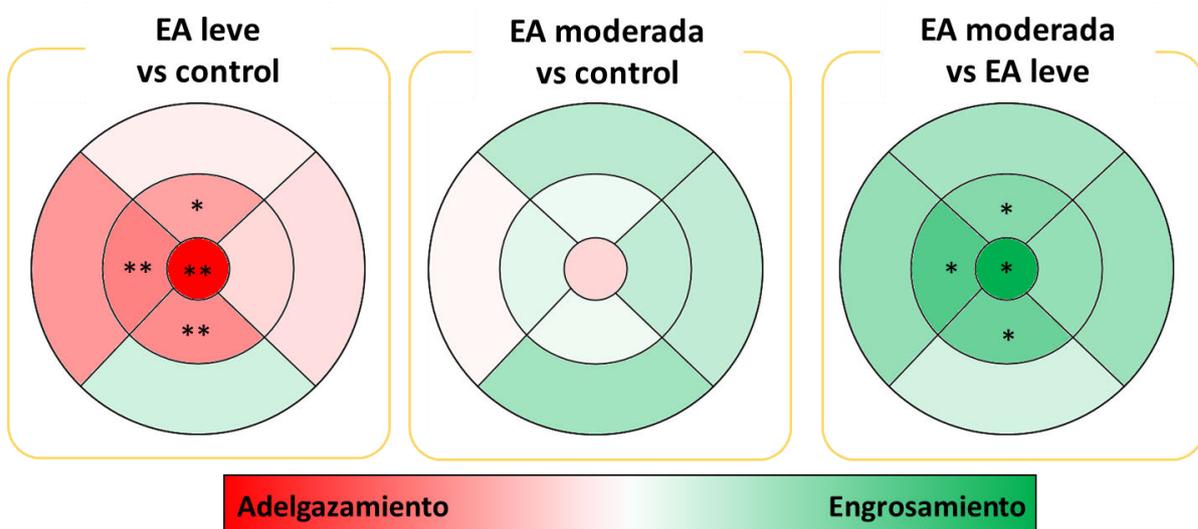
**Gráfica 24. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA moderada vs EA leve en el análisis de sectores de la mácula mediante sectores circulares concéntricos.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En la Tabla 31 y Gráfica 25 se resumen los resultados del análisis de OCT de la mácula mediante sectores circulares concéntricos y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.

**Tabla 31. Análisis del espesor macular circular entre los grupos estudiados**

	Control (n= 34)	EA leve (n= 36)	EA moderada (n= 13)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve		
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	
<b>Fóvea</b>	247,65 ± 23,98	228,28 ± 19,64	244,53 ± 21,50	-7,8	<b>0,001*</b>	-1,3	0,849	7,1	<b>0,023*</b>	
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	299,94 ± 15,43	291,42 ± 17,45	301,46 ± 16,48	-2,8	<b>0,014*</b>	0,5	0,651	3,4	<b>0,040*</b>
	Nasal	297,74 ± 24,43	294,26 ± 19,57	303,00 ± 16,32	-1,2	0,158	1,8	0,584	3,0	0,131
	Inferior	298,06 ± 15,76	287,58 ± 17,26	299,54 ± 15,05	-3,5	<b>0,006*</b>	0,5	0,730	4,2	<b>0,025*</b>
	Temporal	290,32 ± 15,86	279,19 ± 17,72	292,62 ± 16,77	-3,8	<b>0,005*</b>	0,8	0,576	4,8	<b>0,015*</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	255,21 ± 13,58	253,89 ± 14,16	260,23 ± 12,06	-0,5	0,687	2,0	0,284	2,5	0,131
	Nasal	271,18 ± 14,39	268,46 ± 15,36	275,92 ± 11,84	-1,0	0,264	1,7	0,323	2,8	0,059
	Inferior	248,67 ± 16,64	252,03 ± 16,14	255,15 ± 16,60	1,4	0,404	2,6	0,236	1,2	0,548
	Temporal	248,47 ± 24,73	240,67 ± 24,02	247,83 ± 13,41	-3,1	0,321	-0,3	0,670	3,0	0,224
<b>Espesor central</b>	208,88 ± 26,46	197,67 ± 22,94	206,08 ± 14,46	-5,4	0,137	-1,3	0,940	4,3	0,376	
<b>Espesor medio</b>	263,87 ± 14,16	260,10 ± 14,67	264,61 ± 9,10	-1,4	0,173	0,3	0,779	1,7	0,174	
<b>Volumen macular</b>	7,46 ± 0,40	7,35 ± 0,41	7,58 ± 0,34	-1,4	0,197	1,7	0,355	3,1	0,059	

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 25. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre los 3 grupos estudiados en el análisis de sectores de la mácula mediante sectores circulares concéntricos. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01.**

### *Análisis de la mácula mediante una rejilla cuadrangular de 6x6.*

El análisis de OCT de la mácula mediante una rejilla cuadrangular de 6x6 lo pudieron realizar correctamente un total de 34 pacientes controles, 36 pacientes con EA leve y 11 con EA moderada. Ninguno de estos pacientes incluidos presentó durante el examen ninguna refijación, alteración en la retina u opacidad que pudiera dar lugar a medidas erróneas en el análisis de OCT.

El análisis mediante la rejilla cuadrangular entre los pacientes con **EA leve y controles** muestra que hay un descenso significativo de espesor de la retina en los cuadrados 6 ( $258,85 \pm 17,03$ , EA leve vs  $272,12 \pm 22,94$ , control) ( $p < 0,05$ ), 12 ( $259,56 \pm 14,02$ , EA leve vs  $267,09 \pm 16,98$ , control) ( $p < 0,05$ ), 15 ( $272,03 \pm 18,04$ , EA leve vs  $284,18 \pm 17,64$ , control) ( $p < 0,01$ ), 21 ( $268,34 \pm 18,5$ , EA leve vs  $284 \pm 18,8$ , control) ( $p < 0,01$ ) y 22 ( $276,51 \pm 19,06$ , EA leve vs  $289,44 \pm 17,7$ , control) ( $p < 0,01$ ) (Tabla 32, Gráfica 26). El mayor adelgazamiento en el grupo de EA leve se ha visto que es en el cuadrado 21 con un  $-5,5\%$ , seguido con el cuadrado 6 ( $-4,9\%$ ), el 22 ( $-4,5\%$ ), el 15 ( $-4,3\%$ ) y el 12 ( $-2,8\%$ ) (Tabla 32, Gráfica 26). El resto de variaciones entre el grupo EA leve y control está representado en la Gráfica 26 como un mapa de representación colorimétrica. Donde se puede observar que prevalecen los colores rojos que corresponden a adelgazamientos en los diferentes cuadrados analizados. En la región inferior temporal se observa una gama de color verde marcando un engrosamiento leve en esa área macular de la retina en los pacientes en estadio leve Gráfica 26.

**Tabla 32. Análisis del espesor macular cuadrado 6x6 entre los grupos EA leve y control.**

Cuadrícula		Control	EA leve	EA leve vs control	
		(n= 34)	(n= 36)	% diferencia	P-valor
1		209,08 ± 20,40	209,00 ± 10,49	0,0	0,437
2		226,14 ± 17,99	224,23 ± 12,01	-0,8	0,338
3		242,64 ± 14,36	242,59 ± 13,76	0,0	0,854
4		251,23 ± 14,21	250,17 ± 14,4	-0,4	0,500
5		254,12 ± 15,24	249,53 ± 13,98	-1,8	0,187
6		272,12 ± 22,94	258,85 ± 17,03	-4,9	<b>0,016*</b>
7		221,59 ± 14,89	221,30 ± 12,69	-0,1	0,749
8		249,09 ± 17,96	248,50 ± 14,25	-0,2	0,624
9		279,12 ± 17,27	277,88 ± 16,10	-0,4	0,440
10		285,59 ± 15,14	284,73 ± 16,68	-0,3	0,581
11		272,56 ± 14,25	270,20 ± 13,87	-0,9	0,458
12		267,09 ± 16,98	259,56 ± 14,02	-2,8	<b>0,041*</b>
13		232,18 ± 16,23	229,23 ± 19,77	-1,3	0,371
14		272,62 ± 19,14	269,43 ± 17,26	-1,2	0,173
15		284,18 ± 17,64	272,03 ± 18,04	-4,3	<b>0,004**</b>
16		288,15 ± 19,66	278,43 ± 20,49	-3,4	0,052
17		295,00 ± 16,47	290,54 ± 16,55	-1,5	0,087
18		263,00 ± 15,37	259,12 ± 15,57	-1,5	0,163
19		232,94 ± 17,70	233,35 ± 17,42	0,2	0,659
20		274,32 ± 20,99	272,34 ± 18,12	-0,7	0,191
21		284,00 ± 18,8	268,34 ± 18,50	-5,5	<b>0,001**</b>
22		289,44 ± 17,7	276,51 ± 19,06	-4,5	<b>0,005**</b>
23		293,23 ± 15,56	291,2 ± 17,74	-0,7	0,358
24		266,88 ± 14,92	261,91 ± 17,32	-1,9	0,107
25		220,91 ± 21,03	224,94 ± 14,33	1,8	0,590
26		249 ± 22,07	253,02 ± 18,77	1,6	0,492
27		274,53 ± 21,15	278,8 ± 19,22	1,6	0,556
28		276,97 ± 17,92	282,37 ± 20,11	1,9	0,471
29		262,88 ± 14,89	266,82 ± 18,74	1,5	0,572
30		264,15 ± 17,84	260,18 ± 15,74	-1,5	0,322
31		202,91 ± 26,53	207,76 ± 11,01	2,4	0,768
32		221,12 ± 17,81	223,56 ± 13,02	1,1	0,397
33		233 ± 17,28	237,66 ± 16,79	2,0	0,369
34		238,97 ± 18	242,71 ± 16,75	1,6	0,414
35		245,75 ± 20,56	243,68 ± 15,99	-0,8	0,513
36		264,34 ± 23,88	261,15 ± 18,36	-1,2	0,427

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 26. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA leve y control en el análisis de la rejilla de 6x6.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. En negrita aquellos resultados con diferencias significativas  $p < 0,05$ .

Tras analizar las diferencias entre el grupo de **EA moderada respecto al control** no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de espesor de retina en ninguno de los cuadrados analizados de 6x6 macular (Tabla 33, Gráfica 27). Los análisis porcentuales de los cambios de grosor entre los grupos van desde una disminución de grosor de -5,82% en el cuadrado 31 a el máximo incremento de grosor en el cuadrado 34 de 3,05% (Tabla 33, Gráfica 27). En la representación colorimétrica de la Gráfica 27 se observa en la región central perifoveal tonos rojizos que marcan un leve adelgazamiento en los pacientes con EA moderada y un anillo rodeando esta de color verde mostrando engrosamientos parafoveales.

**Tabla 33. Análisis del espesor macular cuadrado 6x6 entre los grupos EA moderada y control.**

		Control	EA moderada	EA moderada vs control	
		(n= 34)	(n= 13)	% diferencia	P-valor
Cuadrícula	1	209,08 ± 20,40	204,70 ± 21,08	-2,1	0,664
	2	226,14 ± 17,99	224,55 ± 9,63	-0,7	0,561
	3	242,64 ± 14,36	241,73 ± 11,07	-0,4	0,916
	4	251,23 ± 14,21	250,09 ± 10,85	-0,5	0,741
	5	254,12 ± 15,24	256,36 ± 10,31	0,9	0,443
	6	272,12 ± 22,94	272,30 ± 11,78	0,1	0,726
	7	221,59 ± 14,89	221,80 ± 14,39	0,1	0,823
	8	249,09 ± 17,96	252,81 ± 13,64	1,5	0,653
	9	279,12 ± 17,27	284,18 ± 10,72	1,8	0,405
	10	285,59 ± 15,14	291,45 ± 9,40	2,1	0,229
	11	272,56 ± 14,25	278,72 ± 8,79	2,3	0,116
	12	267,09 ± 16,98	265,50 ± 12,77	-0,6	0,705
	13	232,18 ± 16,23	232,40 ± 7,49	0,1	0,812
	14	272,62 ± 19,14	274,72 ± 11,26	0,8	0,937
	15	284,18 ± 17,64	281,91 ± 20,03	-0,8	0,853
	16	288,15 ± 19,66	281,45 ± 20,96	-2,3	0,535
	17	295,00 ± 16,47	297,45 ± 10,86	0,8	0,653
	18	263,00 ± 15,37	264,20 ± 10,85	0,5	0,779
	19	232,94 ± 17,70	232,10 ± 10,42	-0,4	0,664
	20	274,32 ± 20,99	274,91 ± 12,36	0,2	0,731
	21	284,00 ± 18,80	282,18 ± 19,57	-0,6	0,771
	22	289,44 ± 17,70	284,73 ± 16,84	-1,6	0,535
	23	293,23 ± 15,56	295,70 ± 11,44	0,8	0,737
	24	266,88 ± 14,92	263,60 ± 9,62	-1,2	0,595
	25	220,91 ± 21,03	223,80 ± 10,57	1,3	0,929
	26	249,00 ± 22,07	252,73 ± 12,83	1,5	0,560
	27	274,53 ± 21,15	281,09 ± 12,28	2,4	0,376
	28	276,97 ± 17,92	284,73 ± 13,65	2,8	0,245
	29	262,88 ± 14,89	269,30 ± 11,77	2,4	0,141
	30	264,15 ± 17,84	261,40 ± 7,78	-1,0	0,676
	31	202,91 ± 26,53	191,10 ± 35,83	-5,8	0,506
	32	221,12 ± 17,81	217,45 ± 27,68	-1,7	0,911
	33	233,00 ± 17,28	238,82 ± 26,03	2,5	0,531
	34	238,97 ± 18,00	246,27 ± 23,69	3,1	0,512
	35	245,75 ± 20,56	246,70 ± 17,18	0,4	0,679
	36	264,34 ± 23,88	256,70 ± 10,87	-2,9	0,288

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



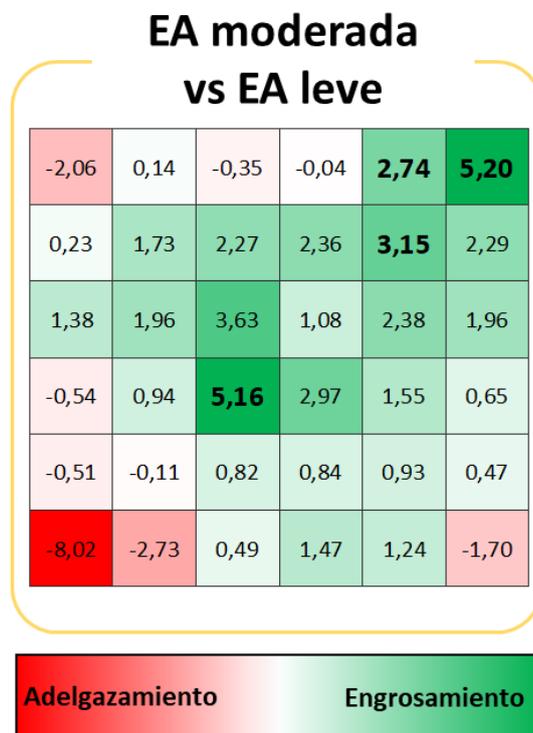
**Gráfica 27. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA moderada y control en el análisis de la rejilla de 6x6.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. En negrita aquellos resultados con diferencias significativas  $p < 0,05$ .

En el estudio de los pacientes con **EA moderada respecto a la EA leve** se encontró que había un incremento significativo de espesor de retina en los EA moderada en los cuadrados 5 ( $256,36 \pm 10,31$ , EA moderada vs  $249,53 \pm 13,98$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ), 6 ( $272,3 \pm 11,78$ , EA moderada vs  $258,85 \pm 17,03$ , EA leve) ( $p < 0,01$ ), 11 ( $278,72 \pm 8,79$ , EA moderada vs  $270,2 \pm 13,87$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ), y 21 ( $282,18 \pm 19,57$ , EA moderada vs  $268,34 \pm 18,5$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 34, Gráfica 28). Entre los cuadrados con diferencias significativas el mayor incremento se encontró en el cuadrado 6 y 21 donde en ambos casos el incremento era de un 5,2%, seguidos por el cuadrado 11 (3,2%) y el 5 (2,7%) (Tabla 34, Gráfica 28). El análisis colorimétrico del cambio de espesores muestra una cuadrícula con predominancia de los verdes, donde en la zona macular temporal y el extremo nasal la coloración es fuerte marcando un engrosamiento. Por otro lado, en la región temporal inferior, se encuentran tonos rojizos marcando un adelgazamiento (Gráfica 28).

**Tabla 34. Análisis del espesor macular cuadrado 6x6 entre los grupos EA moderada y EA leve.**

Cuadrícula		EA leve	EA moderada	EA moderada vs EA leve	
		(n= 36)	(n= 13)	% diferencia	P-valor
1		209,00 ± 10,49	204,70 ± 21,08	-2,1	0,977
2		224,23 ± 12,01	224,55 ± 9,63	0,1	0,843
3		242,59 ± 13,76	241,73 ± 11,07	-0,4	0,979
4		250,17 ± 14,40	250,09 ± 10,85	0,0	0,702
5		249,53 ± 13,98	256,36 ± 10,31	2,7	<b>0,043*</b>
6		258,85 ± 17,03	272,30 ± 11,78	5,2	<b>0,009**</b>
7		221,30 ± 12,69	221,80 ± 14,39	0,2	0,595
8		248,50 ± 14,25	252,81 ± 13,64	1,7	0,475
9		277,88 ± 16,10	284,18 ± 10,72	2,3	0,116
10		284,73 ± 16,68	291,45 ± 9,40	2,4	0,125
11		270,20 ± 13,87	278,72 ± 8,79	3,2	<b>0,033*</b>
12		259,56 ± 14,02	265,50 ± 12,77	2,3	0,193
13		229,23 ± 19,77	232,40 ± 7,49	1,4	0,312
14		269,43 ± 17,26	274,72 ± 11,26	2,0	0,149
15		272,03 ± 18,04	281,91 ± 20,03	3,6	0,099
16		278,43 ± 20,49	281,45 ± 20,96	1,1	0,471
17		290,54 ± 16,55	297,45 ± 10,86	2,4	0,065
18		259,12 ± 15,57	264,20 ± 10,85	2,0	0,197
19		233,35 ± 17,42	232,10 ± 10,42	-0,5	0,812
20		272,34 ± 18,12	274,91 ± 12,36	0,9	0,402
21		268,34 ± 18,50	282,18 ± 19,57	5,2	<b>0,035*</b>
22		276,51 ± 19,06	284,73 ± 16,84	3,0	0,164
23		291,20 ± 17,74	295,70 ± 11,44	1,5	0,235
24		261,91 ± 17,32	263,60 ± 9,62	0,6	0,441
25		224,94 ± 14,33	223,80 ± 10,57	-0,5	0,863
26		253,02 ± 18,77	252,73 ± 12,83	-0,1	0,807
27		278,80 ± 19,22	281,09 ± 12,28	0,8	0,478
28		282,37 ± 20,11	284,73 ± 13,65	0,8	0,486
29		266,82 ± 18,74	269,30 ± 11,77	0,9	0,362
30		260,18 ± 15,74	261,40 ± 7,78	0,5	0,585
31		207,76 ± 11,01	191,10 ± 35,83	-8,0	0,615
32		223,56 ± 13,02	217,45 ± 27,68	-2,7	0,895
33		237,66 ± 16,79	238,82 ± 26,03	0,5	0,817
34		242,71 ± 16,75	246,27 ± 23,69	1,5	0,689
35		243,68 ± 15,99	246,70 ± 17,18	1,2	0,556
36		261,15 ± 18,36	256,70 ± 10,87	-1,7	0,508

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



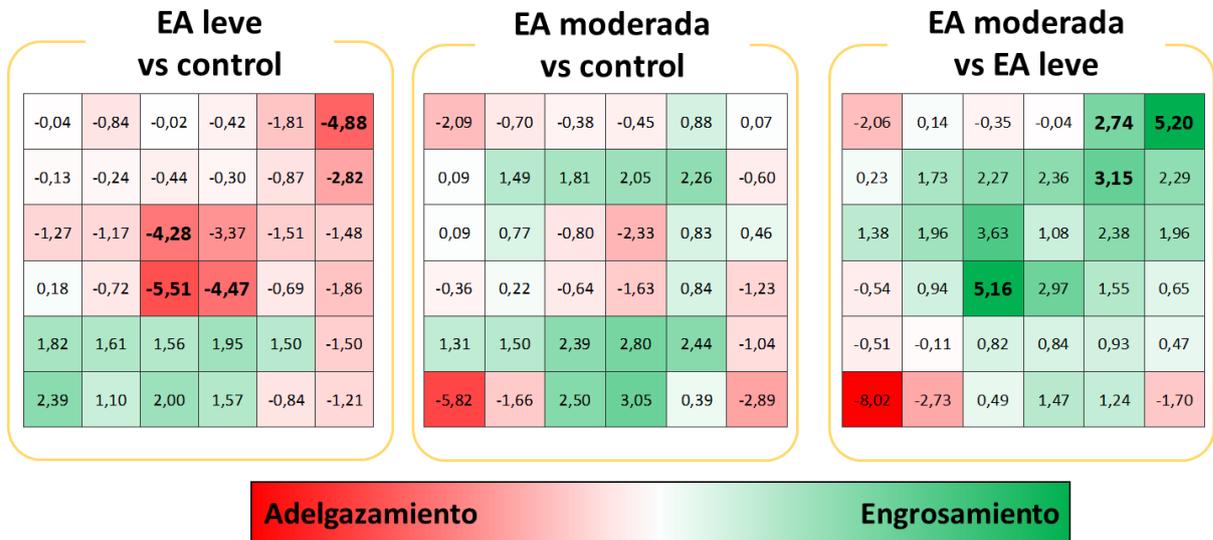
**Gráfica 28. Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre el grupo EA moderada y EA leve en el análisis de la rejilla de 6x6. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. En negrita aquellos resultados con diferencias significativas  $p < 0,05$ .**

En la Tabla 35 y en la Gráfica 29 se resumen los resultados del análisis de OCT de la mácula mediante sectores circulares concéntricos y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.

Tabla 35. Análisis del espesor macular cuadrado 6x6 entre los grupos estudiados.

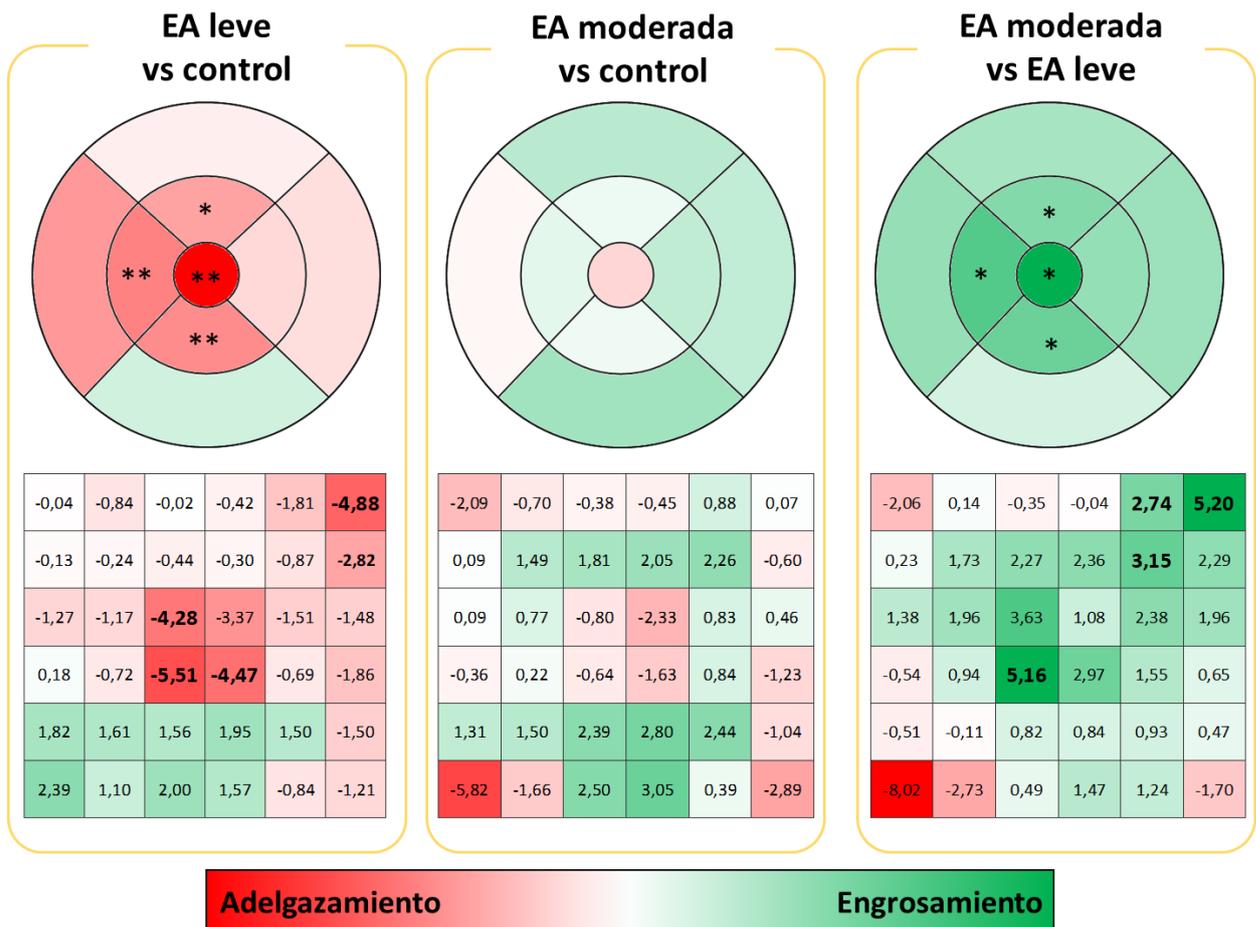
	Control (n= 34)	EA leve (n= 36)	EA moderada (n= 13)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
<b>Cuadrícula</b>									
1	209,08 ± 20,40	209,00 ± 10,49	204,70 ± 21,08	0.0	0.437	-2.1	0.664	-2.1	0.977
2	226,14 ± 17,99	224,23 ± 12,01	224,55 ± 9,63	-0.8	0.338	-0.7	0.561	0.1	0.843
3	242,64 ± 14,36	242,59 ± 13,76	241,73 ± 11,07	0.0	0.854	-0.4	0.916	-0.4	0.979
4	251,23 ± 14,21	250,178 ± 14,40	250,09 ± 10,85	-0.4	0.500	-0.5	0.741	0.0	0.702
5	254,12 ± 15,24	249,53 ± 13,98	256,36 ± 10,31	-1.8	0.187	0.9	0.443	2.7	<b>0,043*</b>
6	272,12 ± 22,94	258,85 ± 17,03	272,30 ± 11,78	-4.9	<b>0,016*</b>	0.1	0.726	5.2	<b>0,009**</b>
7	221,59 ± 14,89	221,30 ± 12,69	221,80 ± 14,39	-0.1	0.749	0.1	0.823	0.2	0.595
8	249,09 ± 17,96	248,50 ± 14,25	252,81 ± 13,64	-0.2	0.624	1.5	0.653	1.7	0.475
9	279,12 ± 17,27	277,88 ± 16,1	284,18 ± 10,72	-0.4	0.440	1.8	0.405	2.3	0.116
10	285,59 ± 15,14	284,73 ± 16,68	291,45 ± 9,40	-0.3	0.581	2.1	0.229	2.4	0.125
11	272,56 ± 14,25	270,20 ± 13,87	278,72 ± 8,79	-0.9	0.458	2.3	0.116	3.2	<b>0,033*</b>
12	267,09 ± 16,98	259,56 ± 14,02	265,50 ± 12,77	-2.8	<b>0,041*</b>	-0.6	0.705	2.3	0.193
13	232,18 ± 16,23	229,23 ± 19,77	232,40 ± 7,49	-1.3	0.371	0.1	0.812	1.4	0.312
14	272,62 ± 19,14	269,43 ± 17,26	274,72 ± 11,26	-1.2	0.173	0.8	0.937	2.0	0.149
15	284,18 ± 17,64	272,03 ± 18,04	281,91 ± 20,03	-4.3	<b>0,004**</b>	-0.8	0.853	3.6	0.099
16	288,15 ± 19,66	278,43 ± 20,49	281,45 ± 20,96	-3.4	0.052	-2.3	0.535	1.1	0.471
17	295,00 ± 16,47	290,54 ± 16,55	297,45 ± 10,86	-1.5	0.087	0.8	0.653	2.4	0.065
18	263,00 ± 15,37	259,12 ± 15,57	264,20 ± 10,85	-1.5	0.163	0.5	0.779	2.0	0.197
19	232,94 ± 17,70	233,35 ± 17,42	232,10 ± 10,42	0.2	0.659	-0.4	0.664	-0.5	0.812
20	274,32 ± 20,99	272,34 ± 18,12	274,91 ± 12,36	-0.7	0.191	0.2	0.731	0.9	0.402
21	284,00 ± 18,80	268,34 ± 18,50	282,18 ± 19,57	-5.5	<b>0,001**</b>	-0.6	0.771	5.2	<b>0,035*</b>
22	289,44 ± 17,70	276,51 ± 19,06	284,73 ± 16,84	-4.5	<b>0,005**</b>	-1.6	0.535	3.0	0.164
23	293,23 ± 15,56	291,20 ± 17,740	295,70 ± 11,44	-0.7	0.358	0.8	0.737	1.5	0.235
24	266,88 ± 14,92	261,91 ± 17,32	263,60 ± 9,62	-1.9	0.107	-1.2	0.595	0.6	0.441
25	220,91 ± 21,03	224,94 ± 14,33	223,80 ± 10,57	1.8	0.590	1.3	0.929	-0.5	0.863
26	249,00 ± 22,07	253,02 ± 18,77	252,73 ± 12,83	1.6	0.492	1.5	0.560	-0.1	0.807
27	274,53 ± 21,15	278,80 ± 19,22	281,09 ± 12,28	1.6	0.556	2.4	0.376	0.8	0.478
28	276,97 ± 17,92	282,37 ± 20,11	284,73 ± 13,65	1.9	0.471	2.8	0.245	0.8	0.486
29	262,88 ± 14,89	266,82 ± 18,74	269,30 ± 11,77	1.5	0.572	2.4	0.141	0.9	0.362
30	264,15 ± 17,84	260,18 ± 15,74	261,40 ± 7,78	-1.5	0.322	-1.0	0.676	0.5	0.585
31	202,91 ± 26,53	207,76 ± 11,01	191,1 ± 35,83	2.4	0.768	-5.8	0.506	-8.0	0.615
32	221,12 ± 17,81	223,56 ± 13,02	217,45 ± 27,68	1.1	0.397	-1.7	0.911	-2.7	0.895
33	233 ± 17,28	237,66 ± 16,79	238,82 ± 26,03	2.0	0.369	2.5	0.531	0.5	0.817
34	238,97 ± 18	242,71 ± 16,75	246,27 ± 23,69	1.6	0.414	3.1	0.512	1.5	0.689
35	245,75 ± 20,56	243,68 ± 15,99	246,70 ± 17,18	-0.8	0.513	0.4	0.679	1.2	0.556
36	264,34 ± 23,88	261,15 ± 18,36	256,70 ± 10,87	-1.2	0.427	-2.9	0.288	-1.7	0.508

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 29.** Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre los 3 grupos estudiados en el análisis de la mácula mediante la rejilla de 6x6. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. En negrita aquellos resultados con diferencias significativas  $p < 0,05$ .

En la Gráfica 30 se representa la comparación mediante escala colorimétrica de las diferencias de espesor entre los grupos tanto en el análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos como en el análisis mediante la rejilla de 6x6.



**Gráfica 30.** Representación colorimétrica de los cambios obtenidos entre los grupos tanto en el análisis de sectores de la mácula como en el análisis de la rejilla de 6x6. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01. En negrita aquellos resultados con diferencias significativas.

### 6.3.2 Estudio del espesor por capas de la mácula mediante OCT Spectralis.

Se realizó el análisis por capas de la retina macular mediante la OCT Spectralis, cuyo software permitía la segmentación automática.

Para este análisis se contó con 17 pacientes con EA leve con MMSE de 24,00 ± 5,22 y 8 controles con puntuaciones de MMSE de 29,56 ± 1,03.

#### *Espesor de la capa de fibras de la retina macular.*

Los pacientes con EA leve respecto a los **controles** mostraron un adelgazamiento significativo de la CFNR en el anillo macular interior en el sector nasal (20,63 ± 2,60, EA

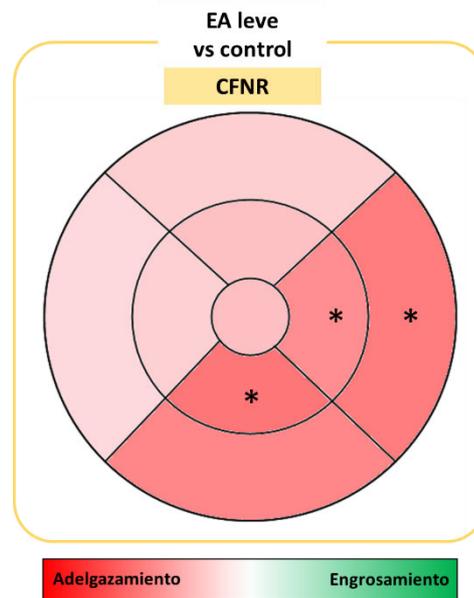
leve vs  $24,00 \pm 4,21$ , control) ( $p < 0,05$ ) e inferior ( $24,56 \pm 3,56$ , EA leve vs  $29,63 \pm 6,65$ , control) ( $p < 0,05$ ) y en el anillo macular exterior en el sector nasal ( $45,75 \pm 9,46$ , EA leve vs  $54,63 \pm 10,93$ , control) ( $p < 0,05$ ). En la CFNR se observa en todos los sectores un descenso del espesor en los pacientes con EA leve respecto a los controles. El mayor descenso de espesor de la CFNR se dio en el anillo macular interior en el sector inferior (-17,09%), seguido por el anillo macular exterior (-16,25%) (Tabla 36, Gráfica 31).

**Tabla 36. Análisis del espesor de la capa de fibras de la retina de los grupos EA leve y control.**

		Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
				% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>		12,13 ± 2,03	11,19 ± 2,37	-7,73	0,354
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	26,00 ± 4,00	24,06 ± 4,45	-7,45	0,184
	Nasal	24,00 ± 4,21	20,63 ± 2,60	-14,06	<b>0,037*</b>
	Inferior	29,63 ± 6,65	24,56 ± 3,56	-17,09	<b>0,045*</b>
	Temporal	19,25 ± 2,05	18,19 ± 1,28	-5,52	0,127
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	39,13 ± 4,58	36,88 ± 6,13	-5,75	0,219
	Nasal	54,63 ± 10,93	45,75 ± 9,46	-16,25	<b>0,050*</b>
	Inferior	43,50 ± 7,98	37,00 ± 8,47	-14,94	0,097
	Temporal	20,75 ± 1,28	19,81 ± 1,97	-4,52	0,126
<b>Volumen total</b>		1,00 ± 0,14	0,88 ± 0,14	-11,51	0,066

Media ± DE; \*P < 0,05, Test de Mann-Whitney

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 31. Representación colorimétrica de los cambios de la capa de fibras nerviosas de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### *Espesor de la capa de células ganglionares de la retina macular.*

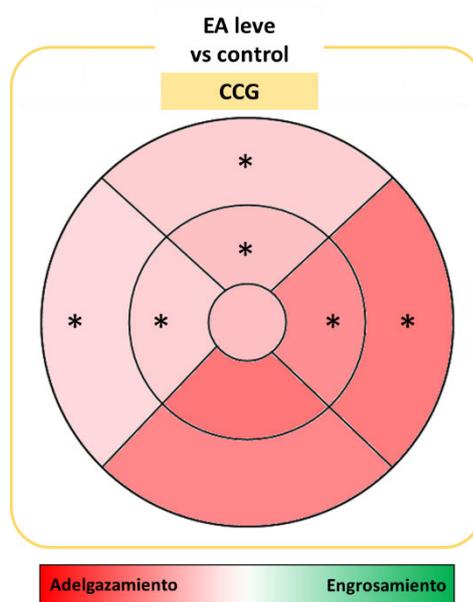
El análisis de la CCG de la retina entre los pacientes con **EA leve respecto a los controles** que había una reducción significativa del espesor en el anillo macular interior en el sector superior ( $47,88 \pm 7,74$ , EA leve vs  $53,63 \pm 3,16$ , control) ( $p < 0,05$ ), en sector nasal ( $45,81 \pm 7,72$ , EA leve vs  $53,00 \pm 4,38$ , control) ( $p < 0,05$ ), y en el sector temporal ( $42,94 \pm 6,61$ , EA leve vs  $48,88 \pm 4,39$ , control) ( $p < 0,05$ ); y en el anillo macular exterior en el sector superior ( $31,56 \pm 3,33$ , EA leve vs  $34,25 \pm 2,82$ , control) ( $p < 0,05$ ), nasal ( $34,06 \pm 5,07$ , EA leve vs  $37,75 \pm 2,05$ , control) ( $p < 0,05$ ) y temporal ( $32,63 \pm 5,46$ , EA leve vs  $38,00 \pm 5,29$ , control) ( $p < 0,05$ ). También se encontró una reducción significativa en el volumen total de la CCG ( $0,98 \pm 0,14$ , EA leve vs  $1,09 \pm 0,06$ , control) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 37, Gráfica 32).

**Tabla 37. Análisis del espesor de la capa de células ganglionares de la retina de los grupos EA leve y control.**

	Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control		
			% diferencia	P-valor	
<b>Fóvea</b>	15,50 ± 3,89	13,56 ± 3,46	-12,50	0,295	
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	53,63 ± 3,16	47,88 ± 7,74	-10,72	<b>0,025*</b>
	Nasal	53,00 ± 4,38	45,81 ± 7,72	-13,56	<b>0,020*</b>
	Inferior	53,00 ± 3,46	48,00 ± 6,01	-9,43	0,056
	Temporal	48,88 ± 4,39	42,94 ± 6,61	-12,15	<b>0,013*</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	34,25 ± 2,82	31,56 ± 3,33	-7,85	<b>0,039*</b>
	Nasal	37,75 ± 2,05	34,06 ± 5,07	-9,77	<b>0,033*</b>
	Inferior	32,50 ± 2,45	30,44 ± 5,19	-6,35	0,267
	Temporal	38,00 ± 5,29	32,63 ± 5,46	-14,14	<b>0,040*</b>
<b>Volumen total</b>	1,09 ± 0,06	0,98 ± 0,14	-9,61	<b>0,020*</b>	

Media ± DE; \*P &lt; 0,05, Test de Mann-Whitney

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)

**Gráfica 32. Representación colorimétrica de los cambios de la capa de células ganglionares de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CCG: capa de células ganglionares de la retina; \*p<0,05; \*\*p<0,01.**

**Espesor de la capa de plexiforme interna de la retina macular.**

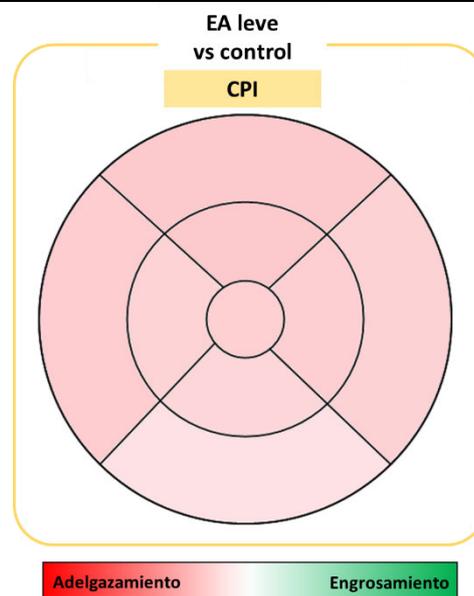
El análisis de la CPI de la retina entre pacientes con **EA leve respecto a los controles** a pesar de no mostrar diferencias significativas en ninguno de los sectores analizados si se encuentra un leve adelgazamiento generalizado de esta capa a nivel macular (Tabla 38, Gráfica 33).

**Tabla 38. Análisis del espesor de la capa plexiforme interna de la retina de los grupos EA leve y control.**

	Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control		
			% diferencia	P-valor	
<b>Fóvea</b>	20,00 ± 3,51	18,88 ± 3,38	-5,63	0,599	
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	40,75 ± 4,17	38,13 ± 4,83	-6,44	0,167
	Nasal	40,75 ± 6,43	38,44 ± 4,68	-5,67	0,186
	Inferior	39,88 ± 4,67	38,00 ± 3,92	-4,70	0,197
	Temporal	40,63 ± 3,11	38,50 ± 4,23	-5,23	0,217
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	27,75 ± 3,41	26,00 ± 2,92	-6,31	0,173
	Nasal	28,50 ± 4,11	27,00 ± 3,20	-5,26	0,267
	Inferior	26,13 ± 3,00	25,25 ± 3,51	-3,35	0,537
	Temporal	32,63 ± 3,34	30,69 ± 3,26	-5,94	0,216
<b>Volumen total</b>	0,877 ± 0,09	0,83 ± 0,08	-5,20	0,257	

Media ± DE; \*P < 0,05, Test de Mann-Whitney

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 33. Representación colorimétrica de los cambios de la capa de plexiforme interna de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CPI: capa plexiforme interna; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

***Espesor de la capa nuclear interna de la retina macular.***

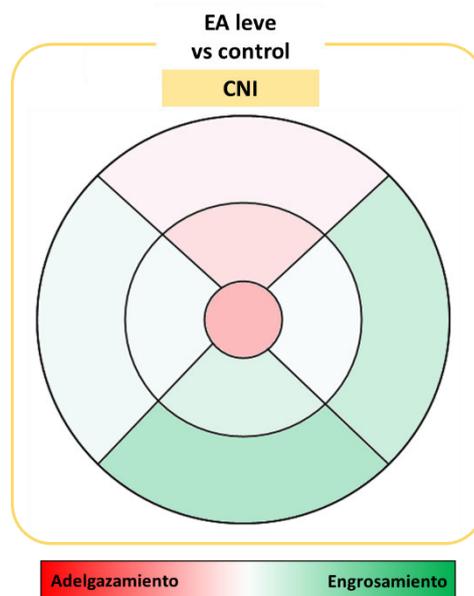
En el análisis de la CNI entre los pacientes con EA leve y los controles no se encontraron diferencias significativas. En el análisis colorimétrico de la diferencia de espesores se aprecia que en la fovea y en los sectores superiores hay un ligero descenso de espesor (tonos rojizos), mientras que en el resto de los sectores predomina un leve incremento de grosor (tonos verdosos). El mayor descenso se encuentra en la fovea (-8,38%), mientras que el mayor incremento está en el anillo macular exterior en el sector inferior (6,93%) (Tabla 39, Gráfica 34).

**Tabla 39. Análisis del espesor de la capa nuclear interna de la retina de los grupos EA leve y control.**

	Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control		
			% diferencia	P-valor	
<b>Fóvea</b>	21,63 ± 4,30	19,81 ± 3,92	-8,38	0,218	
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	42,13 ± 4,94	40,56 ± 4,05	-3,71	0,498
	Nasal	40,63 ± 5,15	40,81 ± 3,62	0,46	0,734
	Inferior	40,50 ± 3,34	41,63 ± 3,86	2,78	0,517
	Temporal	37,50 ± 3,34	37,81 ± 2,88	0,83	0,902
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	31,00 ± 2,62	30,63 ± 1,50	-1,21	0,573
	Nasal	32,25 ± 4,30	33,69 ± 3,00	4,46	0,389
	Inferior	29,75 ± 3,20	31,81 ± 4,37	6,93	0,369
	Temporal	32,00 ± 2,33	32,38 ± 1,78	1,17	0,595
<b>Volumen total</b>	0,93 ± 0,08	0,95 ± 0,05	2,15	0,499	

Media ± DE; \*P < 0,05, Test de Mann-Whitney

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 34. Representación colorimétrica de los cambios de la capa de nuclear interna de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CNI: capa nuclear interna; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

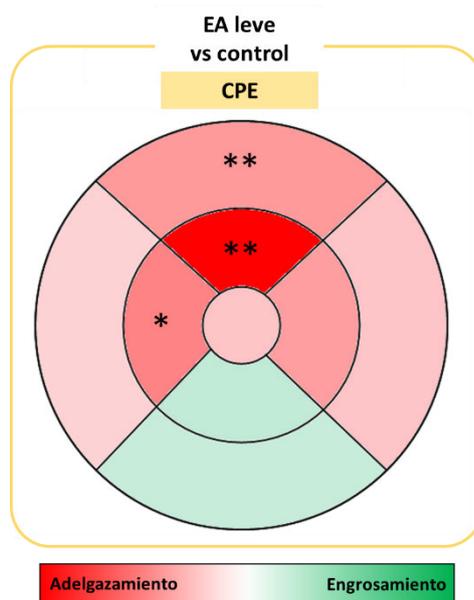
#### *Espesor de la capa plexiforme externa de la retina macular.*

En el análisis de la CPE entre los pacientes con EA leve y controles se encontró que había descensos significativos de los espesores en el anillo macular interior en el sector superior ( $30,88 \pm 4,13$ , EA leve vs  $45,63 \pm 10,28$ , control) ( $p < 0,01$ ) y en el sector temporal ( $30,44 \pm 3,85$ , EA leve vs  $36,00 \pm 4,69$ , control) ( $p < 0,05$ ); en el anillo macular exterior en el sector superior ( $26,13 \pm 1,45$ , EA leve vs  $29,88 \pm 3,40$ , control) ( $p < 0,01$ ) y en el volumen total de la CPE ( $0,81 \pm 0,06$ , EA leve vs  $0,88 \pm 0,07$ , control) ( $p < 0,05$ ). En el análisis colorimétrico de las diferencias de espesores se aprecia en el sector inferior un leve incremento (tonos verdes), mientras que en el resto de los sectores hay un descenso (tonos rojizos) donde el máximo adelgazamiento de la CPE en los pacientes con EA leve se observa en el anillo macular interno en el sector superior con un descenso del  $-32,33\%$  de la CPI (Tabla 40, Gráfica 48).

**Tabla 40. Análisis del espesor de la capa plexiforme externa de la retina de los grupos EA leve y control.**

		Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
				% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>		27,13 ± 4,05	25,19 ± 5,09	-7,14	0,443
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	45,63 ± 10,28	30,88 ± 4,13	-32,33	<b>0,002**</b>
	Nasal	37,13 ± 6,62	32,69 ± 5,77	-11,95	0,053
	Inferior	35,25 ± 7,30	37,19 ± 10,25	5,50	0,735
	Temporal	36,00 ± 4,69	30,44 ± 3,85	-15,45	<b>0,015*</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	29,88 ± 3,40	26,13 ± 1,45	-12,55	<b>0,006**</b>
	Nasal	31,00 ± 5,21	28,81 ± 3,33	-7,06	0,385
	Inferior	26,88 ± 2,17	28,19 ± 3,33	4,88	0,438
	Temporal	29,00 ± 2,45	27,44 ± 1,82	-5,39	0,161
<b>Volumen total</b>		0,88 ± 0,07	0,81 ± 0,06	-7,87	<b>0,018*</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P<0,01; Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 35. Representación colorimétrica de los cambios de la capa plexiforme externa de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CPE: capa plexiforme externa; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### *Espesor de la capa nuclear externa de la retina macular.*

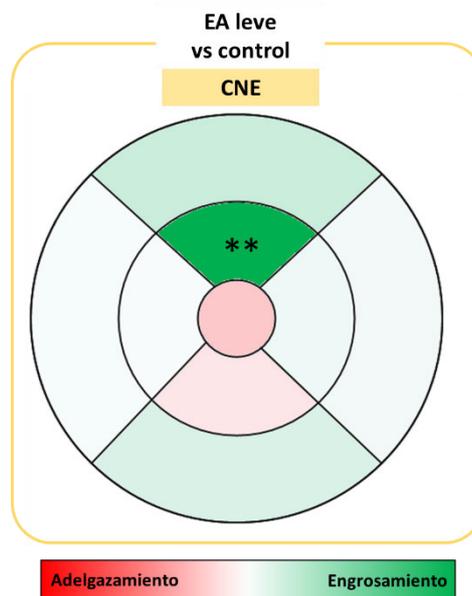
El espesor de la CNE entre los pacientes con **EA leve** y **los controles** mostró una diferencia significativa en el anillo macular interior en el sector superior ( $71,25 \pm 6,90$ , EA leve vs  $57,88 \pm 13,27$ , control) ( $p < 0,01$ ) donde el grosor de la CNE en los pacientes con EA leve

estaba incrementado un 23,11% respecto a los controles (Tabla 41, Gráfica 36). En el análisis colorimétrico hay una predominancia del engrosamiento (tonos verdes), excepto en la fóvea y en anillo macular interior inferior, donde hay un leve adelgazamiento (tonos rojizos) (Gráfica 36).

**Tabla 41. Análisis del espesor de la capa nuclear externa de la retina de los grupos EA leve y control.**

		Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
				% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>		96,63 ± 11,89	90,19 ± 9,91	-6,66	0,111
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	57,88 ± 13,27	71,25 ± 6,90	23,11	<b>0,005**</b>
	Nasal	71,00 ± 15,66	71,94 ± 8,45	1,32	0,951
	Inferior	65,25 ± 15,89	63,38 ± 10,07	-2,87	0,624
	Temporal	73,63 ± 7,71	74,00 ± 4,76	0,51	0,758
<b>Anillo macular exterior</b>	Superior	55,25 ± 12,85	57,81 ± 3,56	4,64	0,296
	Nasal	53,75 ± 12,85	54,31 ± 4,92	1,05	0,806
	Inferior	49,75 ± 10,96	51,38 ± 5,07	3,27	0,560
	Temporal	56,75 ± 8,97	57,06 ± 4,37	0,55	0,854
<b>Volumen total</b>		1,64 ± 0,30	1,68 ± 0,09	2,13	0,602

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P<0,01; Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 36. Representación colorimétrica de los cambios de la capa nuclear externa de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CNE: capa nuclear externa; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

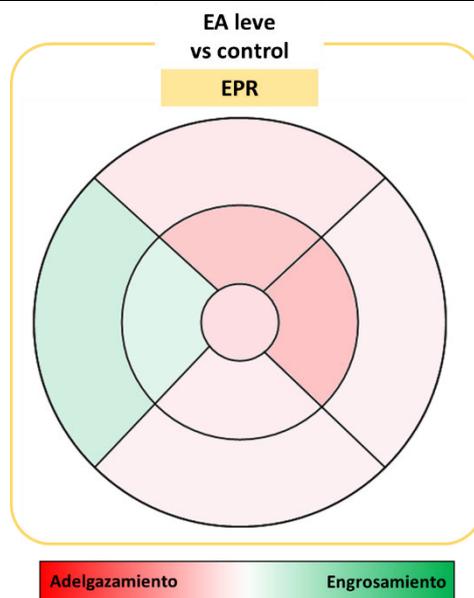
### *Espesor de la capa del epitelio pigmentario de la retina macular.*

En el análisis de la capa del EPR no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los sectores analizados ( $p > 0,05$ ). En el análisis colorimétrico se observa una prevalencia del adelgazamiento (tonos rojos) excepto en los sectores temporales donde se observa un leve engrosamiento (tonos verdes) (Tabla 42, Gráfica 37).

**Tabla 42. Análisis del espesor de la capa del epitelio pigmentario de la retina de los grupos EA leve y control.**

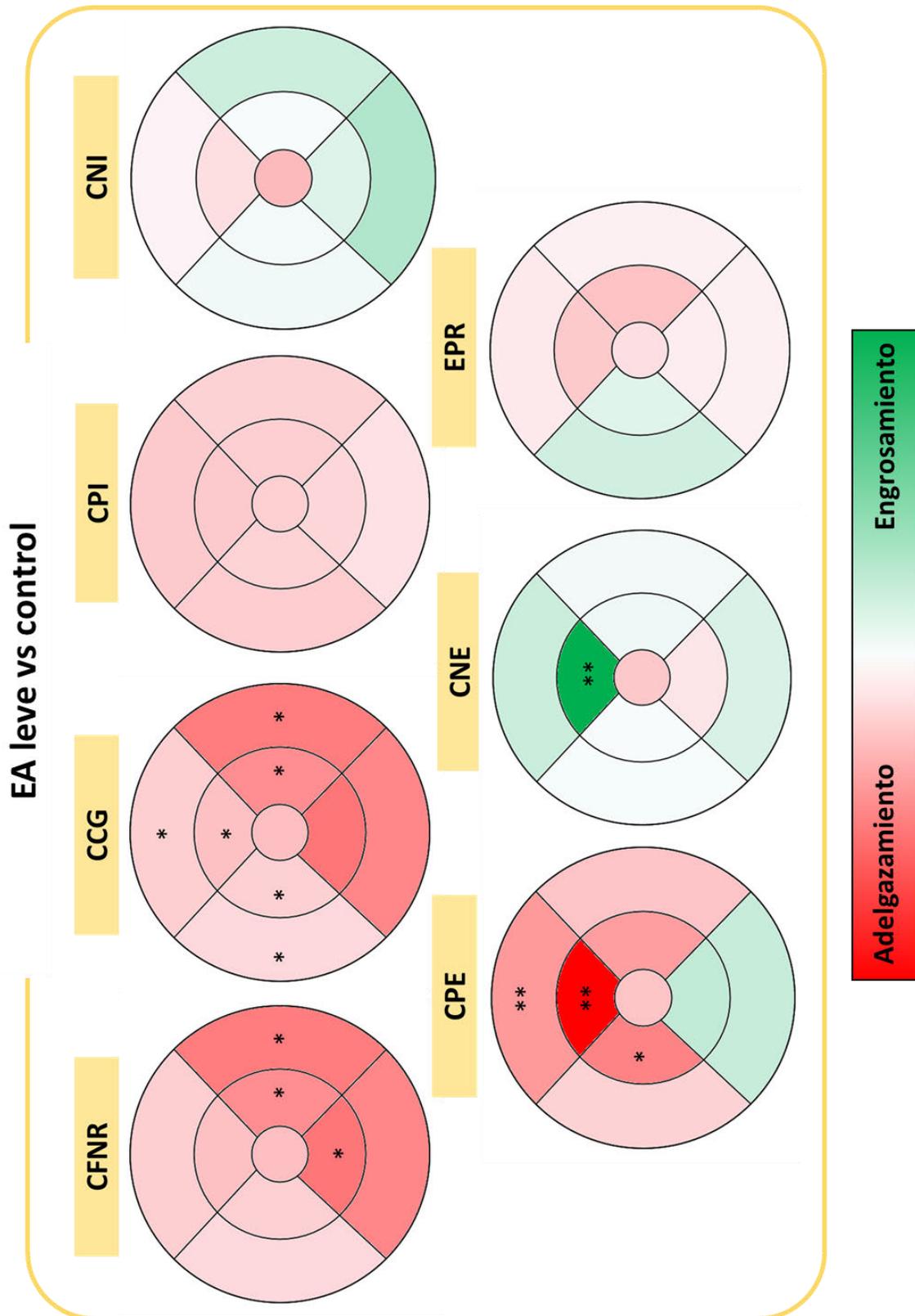
	Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
			% diferencia	P-valor
<b>Fóvea</b>	15,63 ± 1,41	15,06 ± 1,44	-3,60	0,471
<b>Anillo macular interior</b>	Superior	15,63 ± 1,41	-6,40	0,057
	Nasal	15,50 ± 1,60	-7,26	0,117
	Inferior	13,75 ± 1,16	13,50 ± 1,03	-1,82
<b>Anillo macular exterior</b>	Temporal	14,25 ± 1,04	2,63	0,539
	Superior	13,38 ± 0,74	-2,34	0,322
	Nasal	13,00 ± 1,69	12,81 ± 0,75	-1,44
<b>Anillo macular exterior</b>	Inferior	12,25 ± 1,04	-1,53	0,662
	Temporal	12,25 ± 1,04	12,75 ± 1,48	4,08
<b>Volumen total</b>	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,02	-1,00	0,852

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01; Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 37. Representación colorimétrica de los cambios de la capa del epitelio pigmentario de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; EPR: epitelio pigmentario de la retina; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En la Gráfica 38 se representan las variaciones de todas las capas de la retina mediante colorimetría.



**Gráfica 38. Representación colorimétrica de los cambios de las capas de la retina entre el grupo EA leve y control mediante OCT Spectralis.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas. EA: Enfermedad de Alzheimer; CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; EPR: epitelio pigmentario de la retina; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 6.3.3 Estudio de la papila mediante OCT.

El análisis de OCT de la papila lo pudieron realizar correctamente un total de 35 pacientes controles, 36 pacientes con EA leve y 11 con EA moderada. Ninguno de estos pacientes incluidos presentó durante el examen ninguna refijación, alteración en la retina u opacidad que pudiera dar lugar a medidas erróneas en el análisis de OCT.

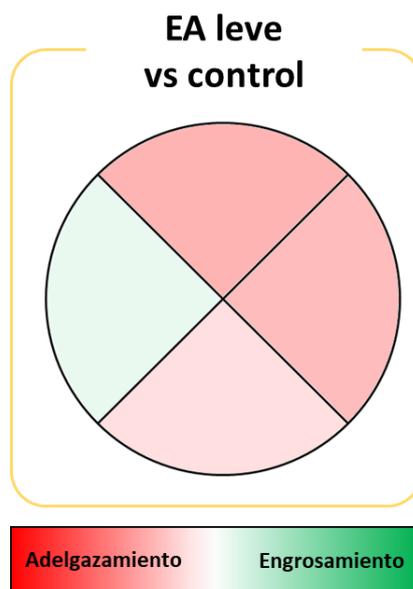
#### *Análisis de la papila en 4 sectores.*

El estudio de los pacientes con **EA leve respecto al grupo control** no encontró ninguna diferencia significativa entre los parámetros peripapilares analizados ( $p > 0,05$ ) (Tabla 43). A pesar de esto todos los valores analizados mostraban una leve disminución del espesor de la retina (sector superior -4,4%, nasal -3,9%, inferior -1,8%, espesor promedio peripapilar -2,8%) a excepción del sector peripapilar temporal donde se encontró un incremento no significativo de 1,3% (Tabla 43, Gráfica 39). Al observar la representación colorimétrica de los cambios de espesor peripapilares en la Gráfica 39 se observan tonos pasteles con predominancia de rojos indicando un leve adelgazamiento en el conjunto de la papila a excepción del área temporal donde el tono es un leve verde.

**Tabla 43. Análisis del espesor peripapilar en 4 sectores de los grupos control y EA leve.**

		Control	EA leve	EA leve vs control	
		(n= 34)	(n= 36)	% diferencia	P-valor
<b>Sector peripapilar</b>	<b>Superior</b>	104,37 ± 13,52	99,80 ± 21,25	-4,4	0,510
	<b>Nasal</b>	72,50 ± 11,03	69,68 ± 12,02	-3,9	0,272
	<b>Inferior</b>	112,82 ± 12,10	110,74 ± 18,06	-1,8	0,764
	<b>Temporal</b>	69,08 ± 11,52	69,97 ± 14,36	1,3	0,985
<b>Espesor promedio peripapilar</b>		90,32 ± 7,87	87,76 ± 15,89	-2,8	0,641

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



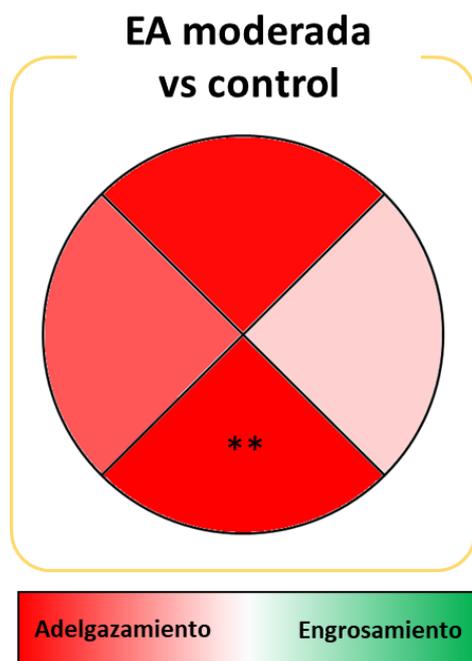
**Gráfica 39. Representación colorimétrica de los cambios del espesor peripapilares en el análisis de 4 sectores entre los grupos EA leve y control. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos.**

Al comparar los sujetos con **EA moderada respecto a los controles** se encontró que había un descenso significativo en el sector inferior peripapilar ( $95,87 \pm 11,98$ , EA moderada vs  $112,82 \pm 12,1$ , control) ( $p < 0,01$ ) y del espesor promedio en los pacientes con EA moderada ( $79,5 \pm 10,89$ , EA moderada vs  $90,32 \pm 7,87$ , control) ( $p < 0,05$ ). Este descenso significativo era de un  $-15,0\%$  en el sector peripapilar inferior y de un  $-12,0\%$  en el espesor promedio (Tabla 44, Gráfica 40). La representación colorimétrica de la Gráfica 40 muestra una marcada coloración rojiza mostrando el adelgazamiento en la EA moderada respecto a la leve sobre todo en las porciones verticales de la papila.

**Tabla 44. Análisis del espesor peripapilar en 4 sectores de los grupos EA moderada y control.**

Sector peripapilar		Control	EA moderada	EA moderada vs control	
		(n= 34)	(n= 11)	% diferencia	P-valor
Sector peripapilar	Superior	104,37 ± 13,52	89,25 ± 18,68	-14,5	0,072
	Nasal	72,50 ± 11,03	70,50 ± 11,62	-2,8	0,521
	Inferior	112,82 ± 12,10	95,87 ± 11,98	-15,0	<b>0,003**</b>
	Temporal	69,08 ± 11,52	62,25 ± 6,94	-9,9	0,109
<b>Espesor promedio peripapilar</b>		90,32 ± 7,87	79,50 ± 10,89	-12,0	<b>0,018*</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



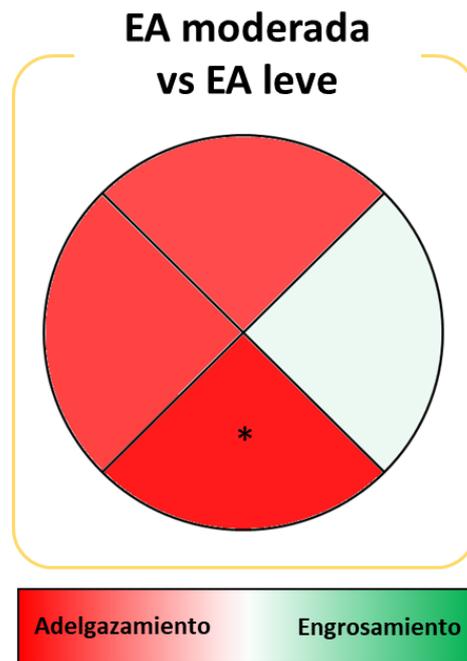
**Gráfica 40. Representación colorimétrica de los cambios del espesor peripapilares en el análisis de 4 sectores entre los grupos EA leve y control.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Comparando los pacientes con **EA moderada con los EA leve** se encontró que solamente persistía el descenso significativo en el sector peripapilar inferior ( $95,87 \pm 11,98$ , EA moderada vs  $110,74 \pm 18,06$ , EA leve) ( $p < 0,05$ ) con un descenso de espesor de un -13,4% (Tabla 45, Gráfica 41). En este caso el análisis colorimétrico de variaciones de espesores muestran un descenso de espesores marcado en todos los sectores excepto en nasal donde la coloración es verde suave, mostrando un leve engrosamiento en esa región (Gráfica 41).

**Tabla 45. Análisis del espesor peripapilar en 4 sectores de los grupos EA moderada y EA leve.**

		EA leve	EA moderada	EA moderada vs EA leve	
		(n= 36)	(n= 11)	% diferencia	P-valor
<b>Sector peripapilar</b>	<b>Superior</b>	99,80 $\pm$ 21,25	89,25 $\pm$ 18,68	-10,6	0,115
	<b>Nasal</b>	69,68 $\pm$ 12,02	70,50 $\pm$ 11,62	1,2	0,864
	<b>Inferior</b>	110,74 $\pm$ 18,06	95,87 $\pm$ 11,98	-13,4	<b>0,027*</b>
	<b>Temporal</b>	69,97 $\pm$ 14,36	62,25 $\pm$ 6,94	-11,0	0,132
<b>Espesor promedio peripapilar</b>		87,76 $\pm$ 15,89	79,50 $\pm$ 10,89	-9,4	0,120

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



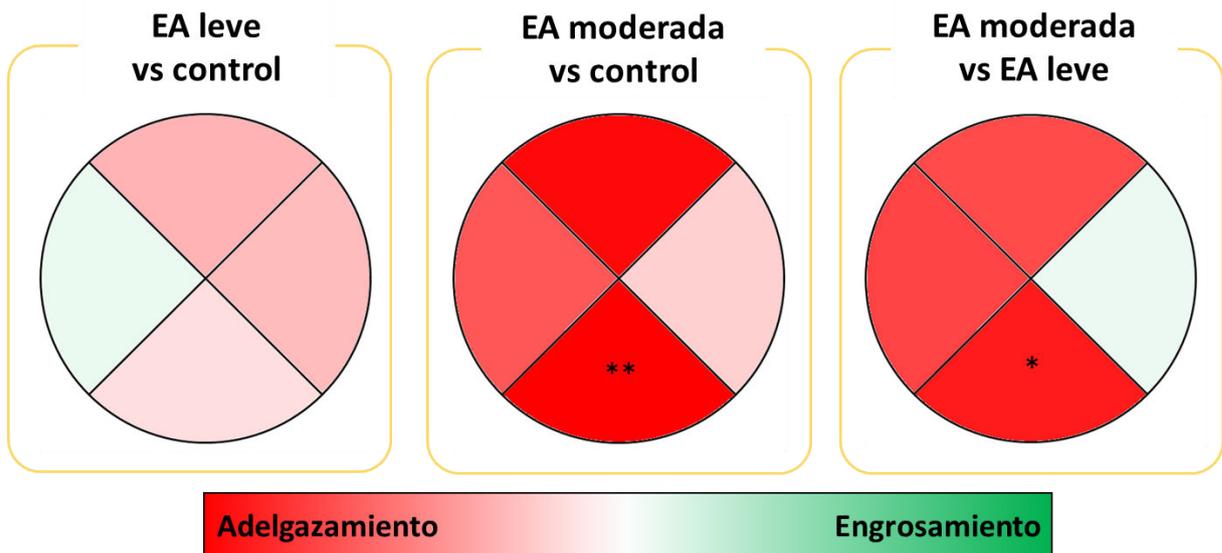
Gráfica 41. Representación colorimétrica de los cambios del espesor peripapilares en el análisis de 4 sectores entre los grupos EA moderada y EA leve. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05.

En la Tabla 46 y Gráfica 42 en la se resumen los resultados del análisis de OCT peripapilar en el análisis de 4 sectores mediante y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.

Tabla 46. Análisis del espesor peripapilar en 4 sectores.

Sector peripapilar	Control (n= 34)	EA leve (n= 36)	EA moderada (n= 11)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
Superior	104,37 ± 13,52	99,80 ± 21,25	89,25 ± 18,68	-4,4	0,510	-14,5	0,072	-10,6	0,115
Nasal	72,50 ± 11,03	69,68 ± 12,02	70,50 ± 11,62	-3,9	0,272	-2,8	0,521	1,2	0,864
Inferior	112,82 ± 12,10	110,74 ± 18,06	95,87 ± 11,98	-1,8	0,764	-15,0	<b>0,003**</b>	-13,4	<b>0,027*</b>
Temporal	69,08 ± 11,52	69,97 ± 14,36	62,25 ± 6,94	1,3	0,985	-9,9	0,109	-11,0	0,132
Espesor promedio peripapilar	90,32 ± 7,87	87,76 ± 15,89	79,50 ± 10,89	-2,8	0,641	-12,0	<b>0,018*</b>	-9,4	0,120

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



**Gráfica 42. Representación colorimétrica de los cambios del espesor peripapilares en el análisis de 4 sectores entre los 3 grupos.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

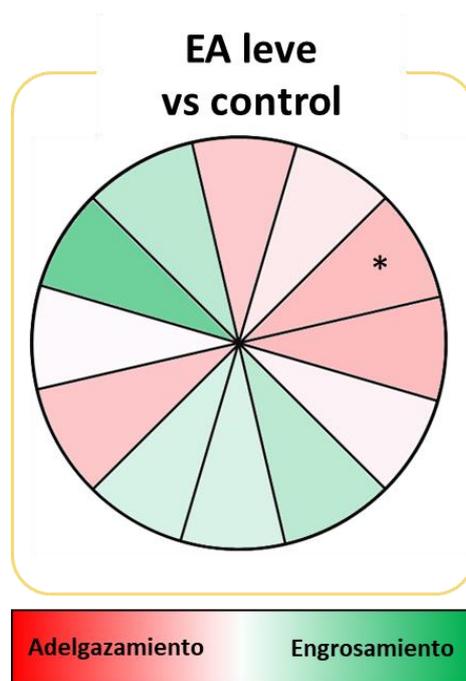
### *Análisis de la papila en 12 sectores.*

En el análisis de la papila dividida en los 12 sectores horarios al comparar el grupo de **EA leve con el control**, únicamente el sector 2 mostró una disminución significativa comparado con los controles 6 ( $87,53 \pm 19,45$ , EA leve vs  $98,22 \pm 15,78$ , control) ( $p < 0,05$ ), donde el descenso era de un -10,9% respecto a los controles (Tabla 47, Gráfica 43). A pesar de no haber más sectores con significación estadística unos sectores estaban adelgazados (sector 1 (-3,0%), sector 2 (-10,9%), sector 3 (-11,0%), sector 4 (-1,5%), sector 8 (-9,3%), sector 9 (-0,4%) y sector 12 (-8,6%) y otros engrosados (sector 5 (5,0%), sector 6 (2,7%), sector 7 (2,9%), sector 10 (10,9%) y sector 11 (5,1%)) respecto a los controles (Tabla 47, Gráfica 43). Esta variación se puede ver con la representación colorimétrica de la Gráfica 43, donde se muestran todos los colores en tonos pastel debido a que estas diferencias de espesor son pequeñas.

**Tabla 47. Análisis del espesor peripapilar en los 12 sectores de los grupos EA leve y control.**

		Control	EA leve	EA leve vs control	
		(n= 35)	(n= 36)	% diferencia	P-valor
Sector peripapilar	<b>1</b>	102,31 ± 19,78	99,22 ± 24,69	-3,0	0,617
	<b>2</b>	98,22 ± 15,78	87,53 ± 19,45	-10,9	<b>0,016*</b>
	<b>3</b>	83,17 ± 19,69	74,05 ± 17,54	-11,0	0,055
	<b>4</b>	66,51 ± 10,97	65,54 ± 12,68	-1,5	0,791
	<b>5</b>	79 ± 22,83	82,94 ± 17,25	5,0	0,186
	<b>6</b>	105,6 ± 23,14	108,44 ± 26,18	2,7	0,554
	<b>7</b>	116,89 ± 21,85	120,3 ± 24,51	2,9	0,700
	<b>8</b>	102,46 ± 30,75	92,89 ± 28,56	-9,3	0,160
	<b>9</b>	64,17 ± 16,05	63,89 ± 15,71	-0,4	0,982
	<b>10</b>	61,97 ± 12,39	68,72 ± 18,33	10,9	0,164
	<b>11</b>	85,37 ± 19,05	89,69 ± 23,13	5,1	0,538
	<b>12</b>	111,66 ± 19,58	102,08 ± 28,65	-8,6	0,296

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



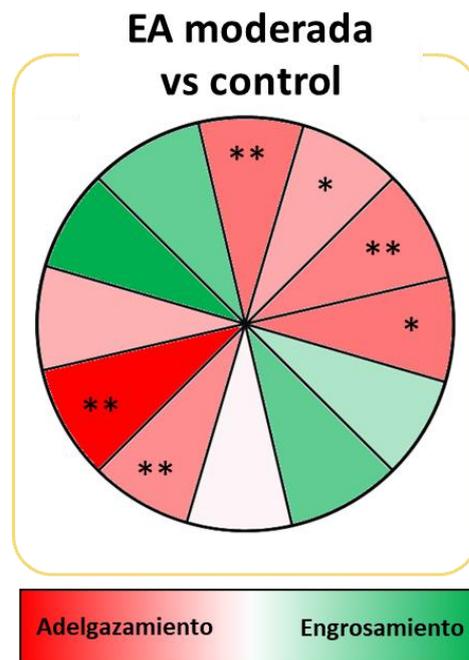
**Gráfica 43. Representación colorimétrica de los cambios del espesor entre los grupos EA leve y control en el análisis de la papila dividida en 12 sectores.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Al analizar el grupo **EA moderada respecto a los controles** se observó que había un adelgazamiento significativo en el sector 1 ( $87,37 \pm 14,86$ , EA moderada vs  $102,31 \pm 19,78$ , control) ( $p < 0,05$ ), sector 2 ( $77,12 \pm 13,46$ , EA moderada vs  $98,22 \pm 15,78$ , control) ( $p < 0,01$ ), sector 3 ( $63,75 \pm 19,32$ , EA moderada vs  $83,17 \pm 19,69$ , control) ( $p < 0,05$ ), sector 7 ( $94,25 \pm 14,75$ , EA moderada vs  $116,89 \pm 21,85$ , control) ( $p < 0,01$ ), sector 8 ( $57,00 \pm 6,44$ , EA moderada vs  $102,46 \pm 30,75$ , control) ( $p < 0,01$ ) y sector 12 ( $85,12 \pm 18,51$ , EA moderada vs  $111,66 \pm 19,58$ , control) ( $p < 0,01$ ) (Tabla 48, Gráfica 44). En estos sectores el descenso porcentual de espesor fue de -14,6% en el sector 1, de -21,5% en el sector 2, de -23,3% en el sector 3, de -19,4% en el sector 7, de -44,4% en el sector 8 y de -23,8% en el sector 12. Cabe destacar el incremento no significativo del sector 5 (5,0%), el sector 10 (19,2%) y el sector 11 (11,9%) (Tabla 48). Todos estos cambios se pueden ver en la Gráfica 44 donde se observa una forma de pajarita con los ejes oblicuos que corresponden a las horas 4, 5, 10 y 11 en verde, marcando un engrosamiento, y el resto en tonos rojizos marcando un adelgazamiento que en este caso es significativo en los pacientes con EA moderada comparados con los controles.

**Tabla 48. Análisis del espesor peripapilar en los 12 sectores de los grupos EA moderada y control.**

Sector peripapilar		Control	EA moderada	EA moderada vs control	
		(n= 35)	(n= 11)	% diferencia	P-valor
Sector peripapilar	1	102,31 ± 19,78	87,37 ± 14,86	-14,6	<b>0,031*</b>
	2	98,22 ± 15,78	77,12 ± 13,46	-21,5	<b>0,003**</b>
	3	83,17 ± 19,69	63,75 ± 19,32	-23,3	<b>0,021*</b>
	4	66,51 ± 10,97	70,5 ± 23,2	6,0	0,938
	5	79 ± 22,83	88,5 ± 22,88	12,0	0,195
	6	105,6 ± 23,14	104,25 ± 22,73	-1,3	0,685
	7	116,89 ± 21,85	94,25 ± 14,75	-19,4	<b>0,005**</b>
	8	102,46 ± 30,75	57 ± 6,44	-44,4	<b>&lt;0,001**</b>
	9	64,17 ± 16,05	55,75 ± 10,95	-13,1	0,151
	10	61,97 ± 12,39	73,87 ± 18,79	19,2	0,061
	11	85,37 ± 19,05	95,5 ± 29,55	11,9	0,274
	12	111,66 ± 19,58	85,12 ± 18,51	-23,8	<b>0,003**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney (EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



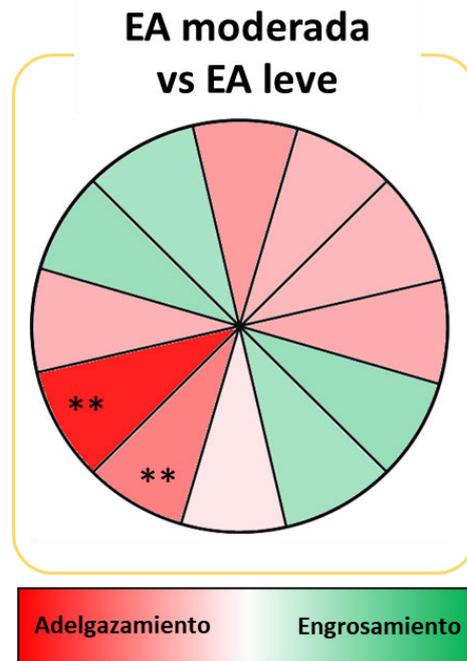
**Gráfica 44. Representación colorimétrica de los cambios del espesor entre los grupos EA moderada y control en el análisis de la papila dividida en 12 sectores.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01.

El grupo de EA cuando comparamos los **moderados con los leves** encontramos que el sector 7 ( $94,25 \pm 14,75$ , EA moderada vs  $120,3 \pm 24,51$ , EA leve) ( $p < 0,01$ ), y el sector 8 ( $57 \pm 6,44$ , EA moderada vs  $92,89 \pm 28,56$ , EA leve) ( $p < 0,001$ ), presentan un adelgazamiento significativo. Este adelgazamiento representa el  $-21,7\%$  en el sector 7 y el  $-38,6\%$  en el sector 8 (Tabla 50, Gráfica 45). En la representación colorimétrica de la Gráfica 45 se sigue manteniendo el patrón en corbata observado entre los EA moderada y controles pero con colores más suaves mostrando que estos cambios no son tan acentuados como en la comparativa anterior.

**Tabla 49. Análisis del espesor peripapilar en los 12 sectores de los grupos EA moderada y EA leve.**

Sector peripapilar		EA leve	EA moderada	EA moderada vs EA leve	
		(n= 36)	(n= 11)	% diferencia	P-valor
Sector peripapilar	1	99,22 ± 24,69	87,37 ± 14,86	-11,9	0,148
	2	87,53 ± 19,45	77,12 ± 13,46	-11,9	0,157
	3	74,05 ± 17,54	63,75 ± 19,32	-13,9	0,175
	4	65,54 ± 12,68	70,50 ± 23,2	7,6	0,876
	5	82,94 ± 17,25	88,50 ± 22,88	6,7	0,438
	6	108,44 ± 26,18	104,25 ± 22,73	-3,9	0,563
	7	120,30 ± 24,51	94,25 ± 14,75	-21,7	<b>0,005**</b>
	8	92,89 ± 28,56	57,00 ± 6,44	-38,6	<b>&lt;0,001**</b>
	9	63,89 ± 15,71	55,75 ± 10,95	-12,7	0,190
	10	68,72 ± 18,33	73,87 ± 18,79	7,5	0,273
	11	89,69 ± 23,13	95,50 ± 29,55	6,5	0,474
	12	102,08 ± 28,65	85,12 ± 18,51	-16,6	0,057

Media ± DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



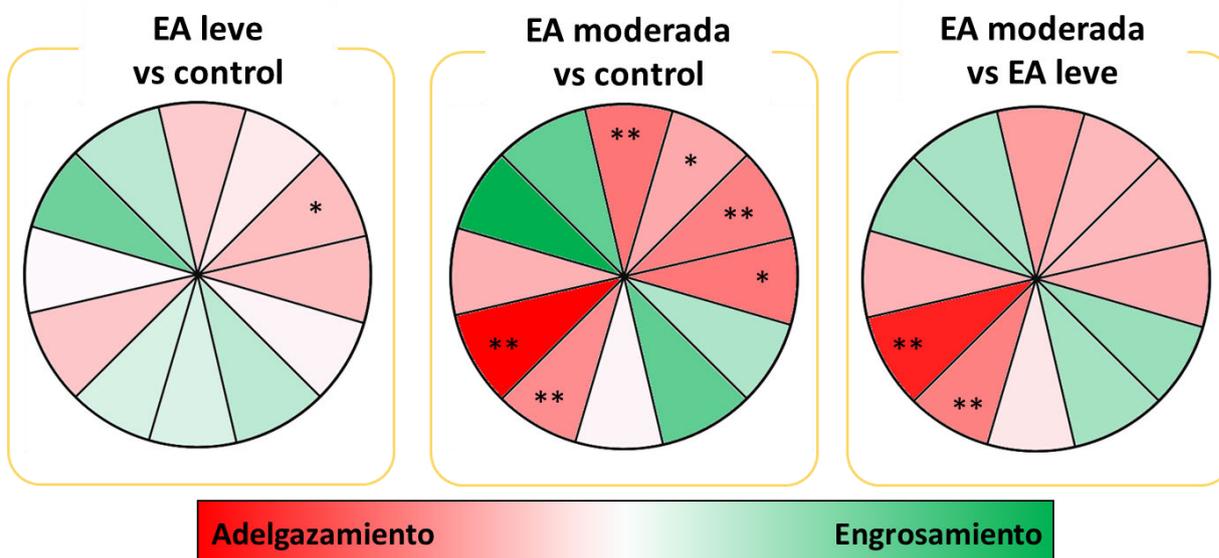
**Gráfica 45. Representación colorimétrica de los cambios del espesor entre los grupos EA moderada y EA leve en el análisis de la papila dividida en 12 sectores.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En la Tabla 50 y en la Gráfica 46 en la se resumen los resultados del análisis de OCT peripapilar en el análisis de 12 sectores mediante y su comparativa entre los 3 grupos estudiados.

Tabla 50. Análisis del espesor peripapilar en los 12 sectores de los grupos estudiados

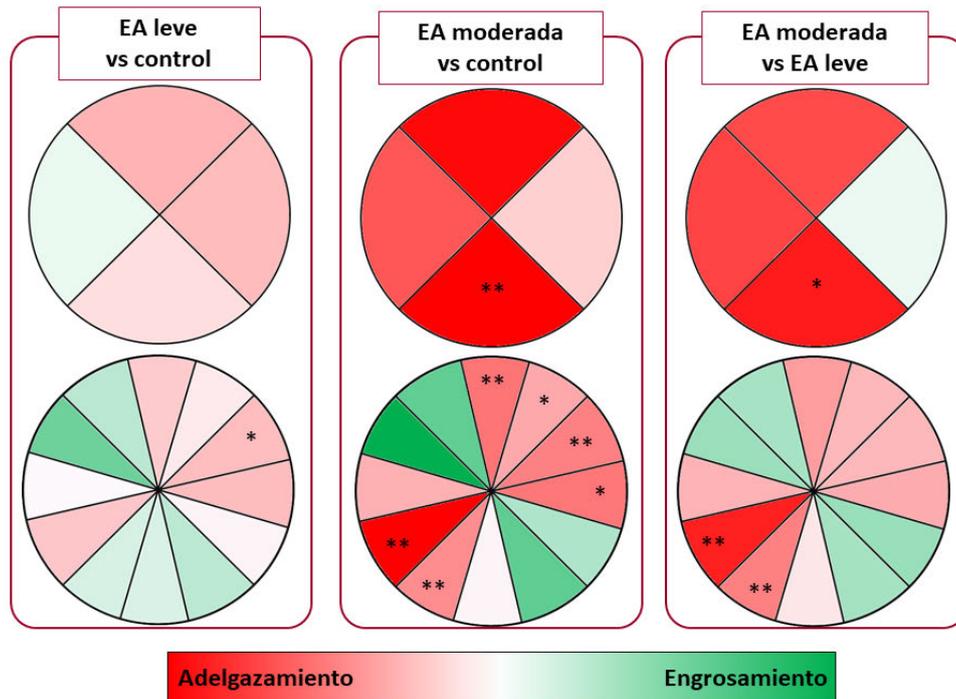
Sector peripapilar	Control (n= 35)	EA leve (n= 36)	EA moderada (n= 11)	EA leve vs control		EA moderada vs control		EA moderada vs EA leve	
				% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor	% diferencia	P-valor
1	102,31 ± 19,78	99,22 ± 24,69	87,37 ± 14,86	-3,0	0,617	-14,6	<b>0,031*</b>	-11,9	0,148
2	98,22 ± 15,78	87,53 ± 19,45	77,12 ± 13,46	-10,9	<b>0,016*</b>	-21,5	<b>0,003**</b>	-11,9	0,157
3	83,17 ± 19,69	74,05 ± 17,54	63,75 ± 19,32	-11,0	0,055	-23,3	<b>0,021*</b>	-13,9	0,175
4	66,51 ± 10,97	65,54 ± 12,68	70,50 ± 23,20	-1,5	0,791	6,0	0,938	7,6	0,876
5	79,00 ± 22,83	82,94 ± 17,25	88,50 ± 22,88	5,0	0,186	12,0	0,195	6,7	0,438
6	105,60 ± 23,14	108,44 ± 26,18	104,25 ± 22,73	2,7	0,554	-1,3	0,685	-3,9	0,563
7	116,89 ± 21,85	120,3 ± 24,51	94,25 ± 14,75	2,9	0,700	-19,4	<b>0,005**</b>	-21,7	<b>0,005**</b>
8	102,46 ± 30,75	92,89 ± 28,56	57,00 ± 6,44	-9,3	0,160	-44,4	<b>&lt;0,001*</b>	-38,6	<b>&lt;0,001*</b>
9	64,17 ± 16,05	63,89 ± 15,71	55,75 ± 10,95	-0,4	0,982	-13,1	0,151	-12,7	0,190
10	61,97 ± 12,39	68,72 ± 18,33	73,87 ± 18,79	10,9	0,164	19,2	0,061	7,5	0,273
11	85,37 ± 19,05	89,69 ± 23,13	95,50 ± 29,55	5,1	0,538	11,9	0,274	6,5	0,474
12	111,66 ± 19,58	102,08 ± 28,65	85,12 ± 18,51	-8,6	0,296	-23,8	<b>0,003**</b>	-16,6	0,057

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; DE: desviación estándar)



Gráfica 46. Representación colorimétrica de los cambios del espesor peripapilares en el análisis de 12 sectores entre los 3 grupos. En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \*p<0,05; \*\*p<0,01.

En la Gráfica 47 se representa la comparación mediante escala colorimétrica de las diferencias de espesor entre los grupos tanto en el análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos como en el análisis mediante la rejilla de 6x6.



**Gráfica 47. Representación colorimétrica de los cambios del espesor entre los grupos en el análisis de la papila.** En rojo adelgazamientos y en verde engrosamientos. Con asterisco los resultados con diferencias significativas \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 6.3.4 Estudio de la coroides mediante OCT Spectralis

Para el estudio del espesor coroidal medido mediante la OCT Spectralis se tuvo una muestra de 8 controles y 17 pacientes con EA leve.

El **espesor coroidal subfoveal** tuvo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los pacientes con EA leve, donde el espesor fue de  $204,47 \pm 39,14$  mientras que en los controles era de  $241,50 \pm 39,69$  (Tabla 51, Gráfica 48).

En el **sector nasal respecto a la fóvea de la coroides** se encontró una disminución significativa del espesor coroidal tanto a  $500\mu\text{m}$  ( $195,12 \pm 42,75$ , EA leve vs  $236,50 \pm 39,05$ , control) ( $p < 0,05$ ), como a  $1000\mu\text{m}$  ( $189,59 \pm 31,96$ , EA leve vs  $228,12 \pm 41,63$ , control) ( $p < 0,05$ ) y a  $1500\mu\text{m}$  de la fóvea ( $178,59 \pm 31,57$ , EA leve vs  $226,38 \pm 38,95$ , control) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 51, Gráfica 48).

En el **sector inferior de la coroides** se encontró una disminución estadísticamente significativa a  $500\mu\text{m}$  de la fóvea ( $197,76 \pm 38,07$ , EA leve vs  $242,50 \pm 38,24$ , control) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 51, Gráfica 48).

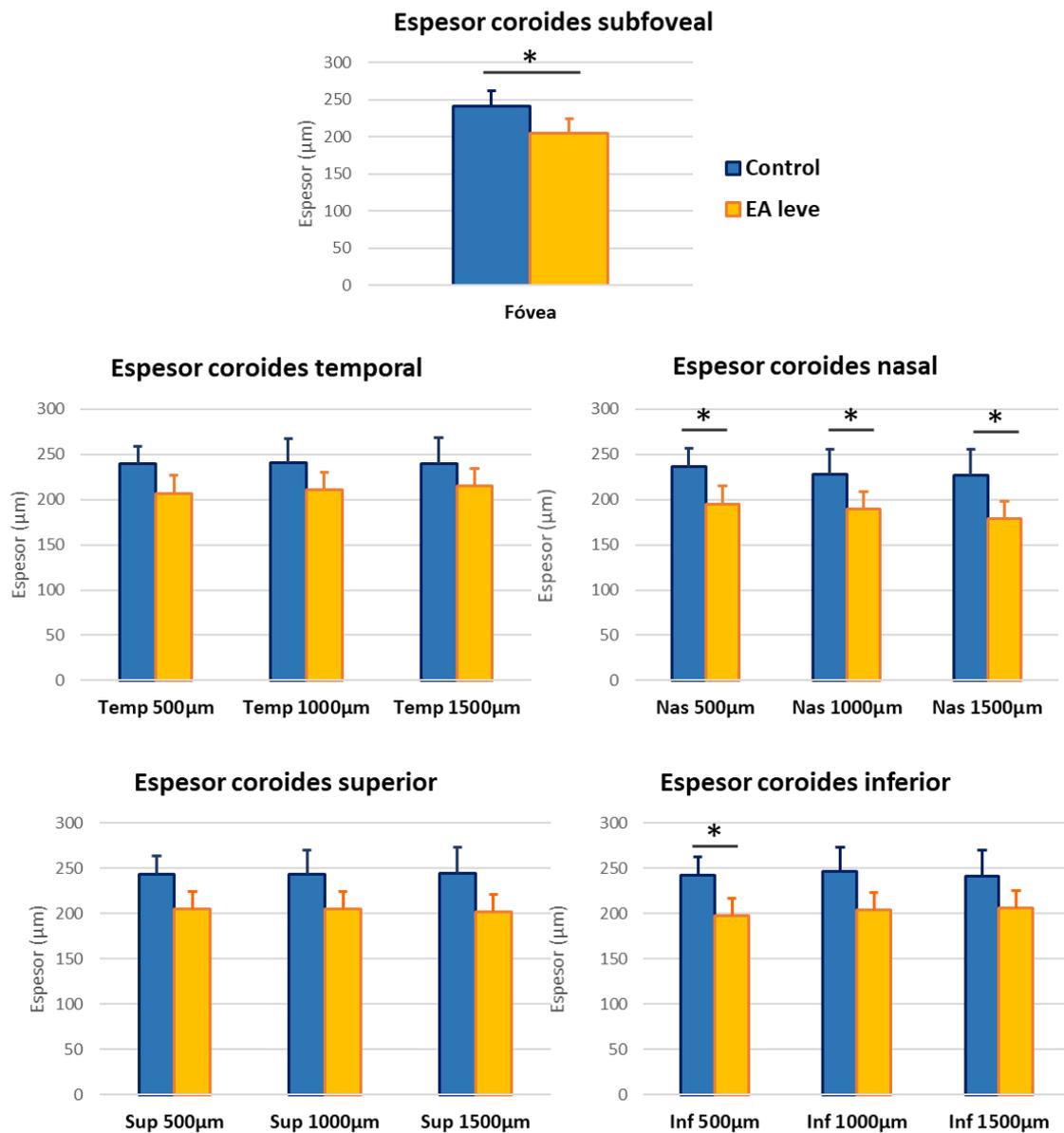
Respecto al adelgazamiento en los pacientes con EA leve respecto a los controles se encontró que el mayor adelgazamiento estaba localizado a  $1500\mu\text{m}$  de la fóvea hacia nasal con una disminución de un  $-21,11\%$ .

Tabla 51 . Análisis del espesor coroideo de los grupos EA leve y control.

	Control (n= 8)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
			% diferencia	P-valor
<b>MMSE</b>	29,40 ± 1,83	24,00 ± 5,32		<b>&lt;0,001**</b>
<b>Fóvea</b>	241,50 ± 39,69	204,47 ± 39,14	-15,33	<b>0,048*</b>
<b>Temp 500µm</b>	239,12 ± 53,61	206,71 ± 38,43	-13,56	0,109
<b>Temp 1000µm</b>	240,38 ± 58,71	211,06 ± 38,49	-12,20	0,137
<b>Temp 1500µm</b>	238,88 ± 46,95	214,94 ± 43,61	-10,02	0,244
<b>Nas 500µm</b>	236,50 ± 39,05	195,12 ± 42,75	-17,50	<b>0,047*</b>
<b>Nas 1000µm</b>	228,12 ± 41,63	189,59 ± 31,96	-16,89	<b>0,033*</b>
<b>Nas 1500µm</b>	226,38 ± 38,95	178,59 ± 31,57	-21,11	<b>0,013*</b>
<b>Sup 500µm</b>	243,75 ± 42,75	204,82 ± 35,94	-15,97	0,062
<b>Sup 1000µm</b>	243,63 ± 39,41	205,24 ± 39,32	-15,76	0,055
<b>Sup 1500µm</b>	244,50 ± 43,53	202,18 ± 38,04	-17,31	0,062
<b>Inf 500µm</b>	242,50 ± 38,24	197,76 ± 38,07	-18,45	<b>0,018*</b>
<b>Inf 1000µm</b>	246,50 ± 47,16	204,59 ± 38,90	-17,00	0,054
<b>Inf 1500µm</b>	241,25 ± 35,62	206,76 ± 39,33	-14,29	0,062

Media ± DE; \*P < 0,05, Test de Mann-Whitney

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; Temp: temporal; Nas: nasal; Sup: superior; Inf: inferior; DE: desviación estándar)



**Gráfica 48. Análisis del espesor coroideo en los grupos control y EA leve.** EA: Enfermedad de Alzheimer; Temp: temporal; Nas: nasal; Sup: superior; Inf: inferior. \* $p < 0,05$

### 6.3.5 Estudio de la zona avascular foveal mediante OCTA.

El análisis de la ZAF se realizó entre 8 pacientes controles y 14 pacientes con EA leve.

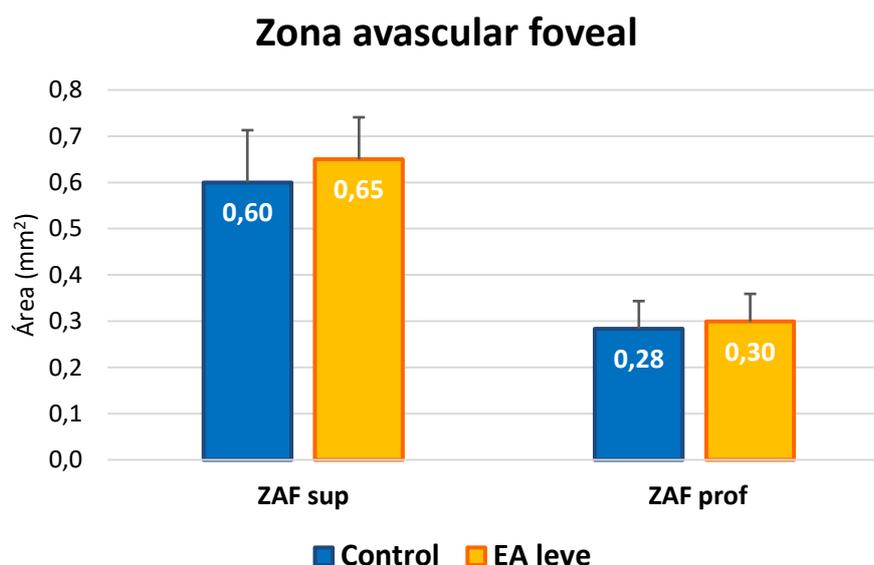
En el análisis de la **ZAF superficial** se encontró que los controles mostraban un área de  $0,60 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ , mientras que los pacientes con EA leve el área era de  $0,65 \pm 0,18 \text{ mm}^2$ ; siendo esta diferencia no significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabla 52, Gráfica 49).

El área de la **ZAF profunda** reveló en los controles un área de  $0,28 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ , mientras que en los pacientes con EA leve el área era de  $0,29 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ , donde tampoco se encontraban diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 52, Gráfica 49).

**Tabla 52. Análisis de la zona avascular foveal entre los grupos EA leve y control**

	Control (n= 8)	EA leve (n= 14)	P-valor
MMSE	29,40 ± 1,83	24,00 ± 5,32	<0,001**
ZAF superficial (mm <sup>2</sup> )	0,60 ± 0,23	0,65 ± 0,18	<b>0,413</b>
ZAF profunda (mm <sup>2</sup> )	0,28 ± 0,12	0,29 ± 0,12	<b>0,441</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(EA: Enfermedad de Alzheimer; MMSE: Mini Mental State Examination; ZAF: zona avascular foveal; DE: desviación estándar)



**Gráfica 49. Zona avascular foveal de los pacientes controles y EA.** ZAF: zona avascular foveal; EA: Enfermedad de Alzheimer.

### 6.3.6 Estudio de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico.

Mediante el uso del software “Laguna ON<sub>h</sub>E” se calculó la Hb total y por sectores de la cabeza del nervio óptico de 17 pacientes con EA leve y 49 controles.

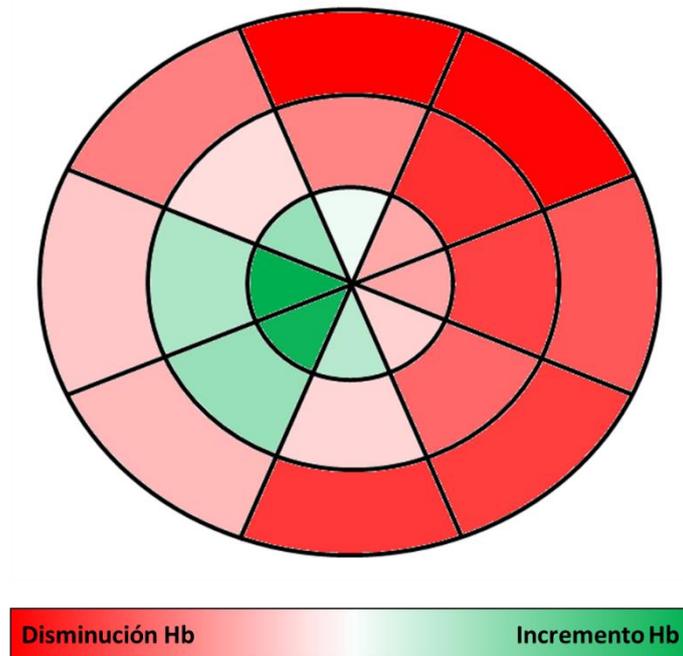
En ninguno de los parámetros analizados se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los valores de Hb en la cabeza del nervio óptico (Tabla 53, Gráfica 50).

**Tabla 53. Porcentaje de la oxihemoglobina en el nervio óptico analizada mediante fotografías del nervio óptico con el programa Laguna ONhE en los grupos de EA leve y control**

		Control (n= 49)	EA leve (n= 17)	EA leve vs control	
				% diferencia	P-valor
<b>MMSE</b>		30 ± 0,00	23,35 ± 3,12		
<b>Cociente E/P estimado</b>		0,50 ± 0,10	0,53 ± 0,11	7,08	0,363
<b>GDF</b>		16,06 ± 17,72	10,35 ± 21,90	-5,71	0,391
<b>Hb total</b>		65,64 ± 7,19	64,18 ± 10,34	-1,46	0,608
<b>Sectores</b>	S1	71,41 ± 7,79	69,82 ± 11,42	-1,59	0,792
	S2	70,22 ± 7,78	66,93 ± 9,89	-3,30	0,259
	S3	65,31 ± 8,48	62,61 ± 9,27	-2,70	0,352
	S4	70,33 ± 8,49	69,54 ± 10,46	-0,79	0,849
	S5	69,46 ± 8,24	66,85 ± 9,91	-2,61	0,495
	S6	65,02 ± 9,00	61,91 ± 8,65	-3,11	0,253
	S7	68,25 ± 9,26	69,62 ± 11,23	1,36	0,901
	S8	68,66 ± 8,2	67,96 ± 11,04	-0,69	0,764
	S9	65,29 ± 9,43	62,08 ± 10,80	-3,21	0,235
	S10	64,92 ± 9,54	69,24 ± 12,22	4,31	0,229
	S11	65,37 ± 7,42	67,21 ± 11,79	1,84	0,553
	S12	63,12 ± 8,11	62,04 ± 13,85	-1,08	0,775
	S13	63,85 ± 9,29	68,31 ± 12,70	4,45	0,226
	S14	64,63 ± 7,85	66,10 ± 12,50	1,47	0,468
	S15	62,07 ± 7,45	61,21 ± 13,43	-0,86	0,843
	S16	66,06 ± 9,25	67,92 ± 11,50	1,86	0,660
	S17	67,97 ± 7,73	67,41 ± 11,61	-0,56	0,965
	S18	64,13 ± 7,69	62,12 ± 11,68	-2,01	0,665
	S19	69,90 ± 8,95	70,24 ± 11,34	0,33	0,883
	S20	70,79 ± 8,02	68,65 ± 10,25	-2,14	0,538
	S21	64,92 ± 8,84	60,80 ± 9,81	-4,12	0,168
	S22	71,89 ± 8,42	70,36 ± 12,16	-1,52	0,764
	S23	71,17 ± 7,83	67,51 ± 10,72	-3,66	0,235
	S24	65,12 ± 8,93	61,06 ± 9,57	-4,06	0,177

Media ± DE; \*P &lt; 0,05, \*\*P &lt; 0,01 Test de Mann-Whitney.

(EA: Enfermedad de Alzheimer; vs: versus; cpg: ciclos por grado; DE: desviación estándar)



**Gráfica 50.** Representación colorimétrica de los cambios de % de hemoglobina en la cabeza del nervio óptico medido mediante el programa de Laguna ONhE entre los pacientes con EA leve y controles de edad.

## 6.4 Curvas ROC

A partir de la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se representan las parejas (1-especificidad, sensibilidad) obtenidos al considerar todos los posibles puntos de corte de la prueba proporcionándonos una representación global de la exactitud diagnóstica, que vendrá definida mediante el valor del área bajo la curva (aROC). Una vez construida la curva se determina el mejor punto de corte, el cual combine una mejor sensibilidad y especificidad (punto que queda más hacia arriba y hacia la izquierda).

### 6.4.1 Test psicofísicos. Curvas ROC

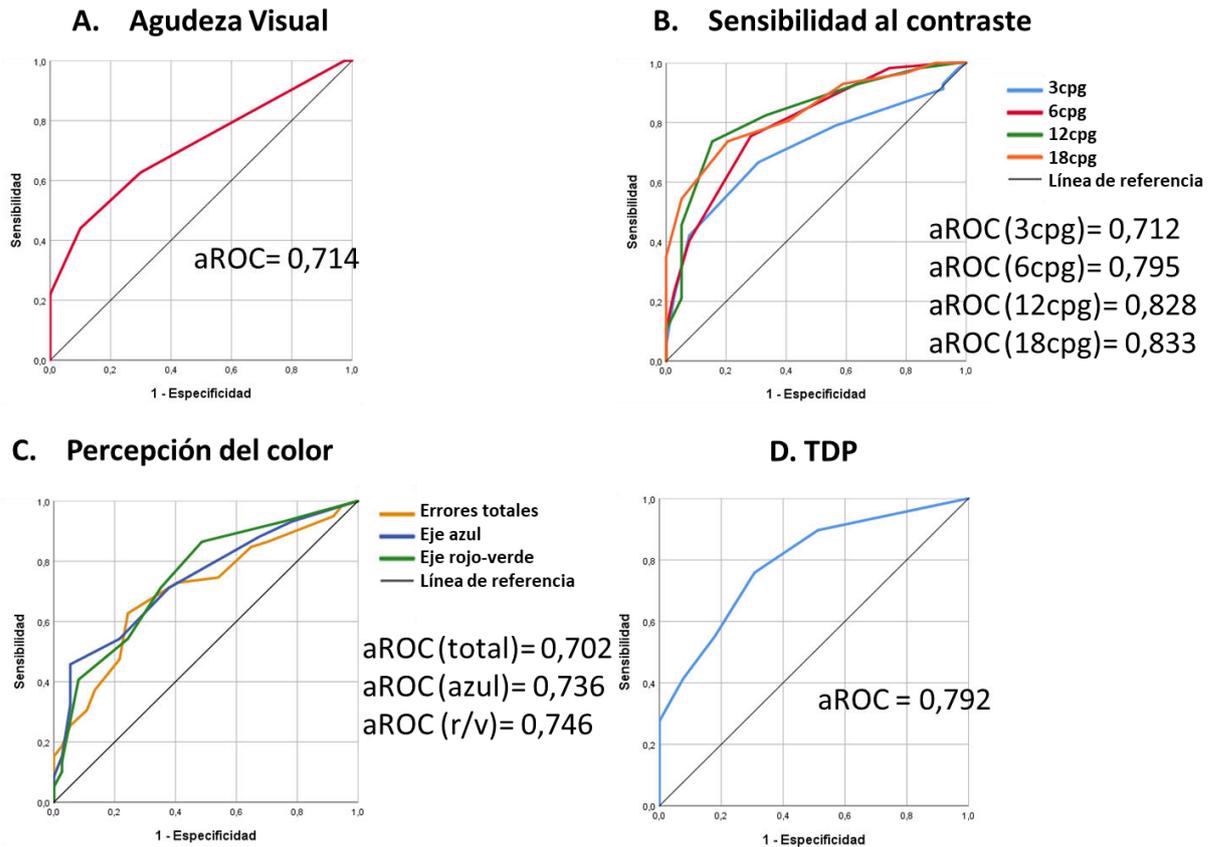
El análisis de las curvas ROC de los métodos psicofísicos mostró que todas las pruebas tenían un alto valor predictivo en el que todas el p-valor era menor de 0,001. El mayor valor predictivo lo muestran las altas frecuencias espaciales en el test de SC siendo la mejor prueba la frecuencia de 18cpg (aROC=0,833;  $p<0,001$ ), es decir, la exactitud diagnóstica es de un 83,3%, seguida por la frecuencia de 12cpg (aROC=0,823;  $p<0,001$ ), 6 cpg (aROC=0,795;  $p<0,001$ ), el test de reconocimiento TDP (aROC=0,792;  $p<0,001$ ), los errores inespecíficos

en la región del deután (aROC=0,746;  $p<0,001$ ), del tritán (aROC=0,736;  $p<0,001$ ), la medida de la AV (aROC=0,714;  $p<0,001$ ), la SC de 3cpg (aROC=0,712;  $p<0,001$ ), y por último los errores totales inespecíficos del test Farnsworth (aROC=0,702;  $p<0,001$ ) (Tabla 54, Gráfica 51).

**Tabla 54. Análisis del área bajo la curva en los test psicofísicos.**

Test		aROC	DE	P-valor
AV		0,714	0,051	<0,001**
SC (cpg)	3	0,712	0,052	<0,001**
	6	0,795	0,046	<0,001**
	12	0,828	0,043	<0,001**
	18	0,833	0,040	<0,001**
Farnsworth	Errores totales	0,702	0,054	0,001**
	Errores eje tritán	0,736	0,051	<0,001**
	Errores eje deután	0,746	0,051	<0,001**
TDP		0,792	0,045	<0,001**

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; (aROC: area under the receiver operating characteristic; AV: agudeza visual; SC: sensibilidad al contraste; TDP: test digital de percepción; DE: desviación estándar)



**Gráfica 51. Análisis de las curvas ROC de los métodos psicofísicos.**

A. Agudeza visual; B. Sensibilidad al contraste; C. Percepción del color y D. Test digital de percepción.

### 6.4.2 Pruebas morfológicas. Curvas ROC

Se analizaron las curvas ROC de todos los parámetros de retina medidos mediante la OCT, tanto maculares como peripapilares.

#### *Curvas ROC en el análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos*

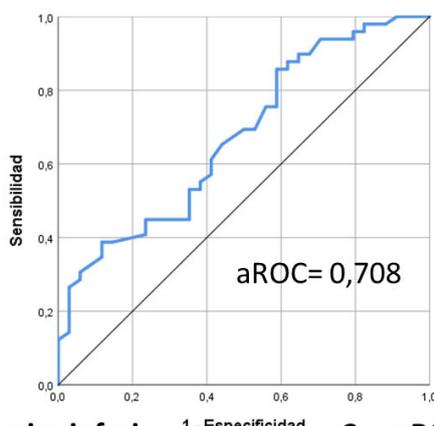
Las medidas maculares que mostraron una significación estadística fueron el espesor foveal (aROC=0,708;  $p < 0,01$ ), en el análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos, en el anillo macular interior el sector inferior (aROC=0,680;  $p < 0,05$ ) y temporal (aROC=0,665;  $p < 0,05$ ). El resto de los parámetros analizados nos mostraban significación estadística (Tabla 55, Gráfica 52).

**Tabla 55. Análisis del área bajo la curva de los parámetros maculares del análisis de círculos concéntricos analizados mediante OCT.**

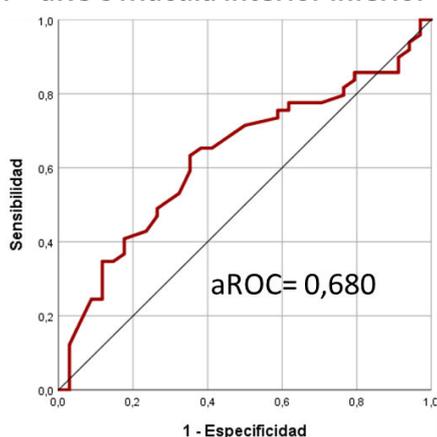
	aROC	DE	P-valor	
<b>Fóvea</b>	0,708	0,064	<b>0,004**</b>	
<b>Anillo macular interior</b>	<b>Superior</b>	0,638	0,070	
	<b>Nasal</b>	0,616	0,072	
	<b>Inferior</b>	0,680	0,067	<b>0,013*</b>
	<b>Temporal</b>	0,665	0,068	<b>0,022*</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	<b>Superior</b>	0,510	0,073	
	<b>Nasal</b>	0,550	0,072	
	<b>Inferior</b>	0,453	0,073	
	<b>Temporal</b>	0,538	0,073	

\*P<0,05; \*\*P<0,01; (aROC: area under the receiver operating characteristic; DE: desviación estándar)

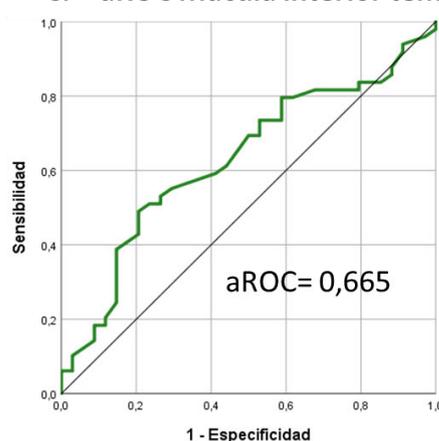
### A. aROC Fóvea



### B. aROC Mácula interior inferior



### C. aROC Mácula interior temporal



**Gráfica 52. Análisis de las curvas ROC del análisis de la mácula en sectores circulares concéntricos mediante OCT. A: aROC de la fóvea; B: aROC de la mácula interior en el sector inferior; C: aROC de la mácula interior en el sector temporal.**

**Curvas ROC en el análisis de la mácula mediante una rejilla cuadrangular de 6x6.**

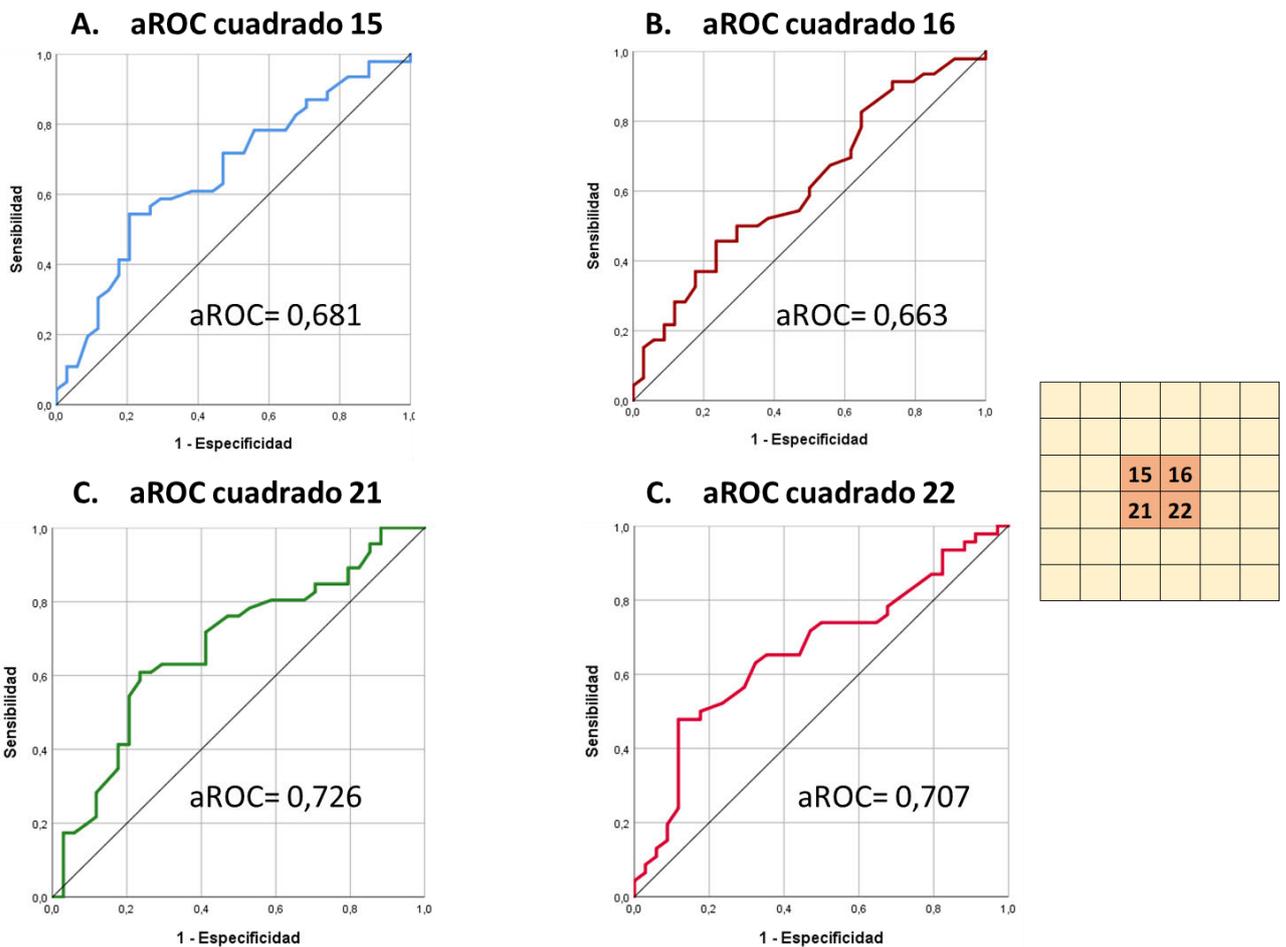
Los valores que se mostraron con un valor predictivo significativo en el análisis macular mediante una rejilla cuadrangular de 6x6 fueron el cuadrado 15 (aROC=0,681;  $p<0,05$ ), el cuadrado 16 (aROC=0,663;  $p<0,05$ ), el cuadrado 21 (aROC=0,726;  $p<0,01$ ) y el cuadrado 22 (aROC=0,707;  $p<0,01$ ). El resto de los parámetros analizados mediante la rejilla cuadrangular de 6x6 no mostraron valores con significación estadística (Tabla 56, Gráfica 53).

**Tabla 56. Análisis del área bajo la curva en los diferentes parámetros maculares del análisis de una rejilla cuadrangular de 6x6.**

		aROC	DE	P-valor
Mácula 6x6 (sector)	1	0,542	0,072	0,558
	2	0,562	0,073	0,392
	3	0,510	0,072	0,885
	4	0,543	0,073	0,549
	5	0,557	0,073	0,434
	6	0,601	0,072	0,161
	7	0,528	0,072	0,703
	8	0,528	0,073	0,703
	9	0,526	0,072	0,717
	10	0,507	0,072	0,921
	11	0,496	0,073	0,953
	12	0,594	0,072	0,193
	13	0,549	0,073	0,502
	14	0,594	0,072	0,195
	15	0,681	0,066	<b>0,012*</b>
	16	0,663	0,067	<b>0,024*</b>
	17	0,604	0,071	0,150
	18	0,557	0,072	0,430
	19	0,556	0,074	0,438
	20	0,614	0,073	0,116
	21	0,726	0,063	<b>0,002**</b>
	22	0,707	0,065	<b>0,004**</b>
	23	0,590	0,071	0,214
	24	0,579	0,072	0,275
	25	0,506	0,075	0,937
	26	0,465	0,074	0,626

27	0,504	0,073	0,953
28	0,500	0,072	0,995
29	0,466	0,072	0,636
30	0,572	0,072	0,317
31	0,525	0,074	0,727
32	0,508	0,073	0,916
33	0,482	0,073	0,808
34	0,473	0,074	0,713
35	0,554	0,074	0,453
36	0,586	0,073	0,236

\*P<0,05; \*\*P<0,01; (aROC: area under the receiver operating characteristic; DE: desviación estándar)



**Gráfica 53. Análisis de las curvas ROC del análisis de la mácula en una parrilla cuadrada de 6x6 mediante OCT. A: aROC del cuadrado 15; B: aROC del cuadrado 16; C: aROC de la mácula del cuadrado 21; D: aROC del cuadrado 22. A la derecha representación gráfica de las áreas maculares correspondientes mediante el diagrama de 6x6.**

### *Curvas ROC en el análisis de la papila en 4 sectores.*

En el análisis de las curvas ROC ninguno de los 4 sectores mostró significación estadística. En la Tabla 57 se muestran los valores obtenidos del análisis.

**Tabla 57. Análisis del área bajo la curva en los diferentes parámetros del análisis peripapilar en 4 sectores.**

	aROC	DE	P-valor	
Sector de papila	Superior	0,611	0,071	0,125
	Nasal	0,614	0,070	0,116
	Inferior	0,580	0,071	0,272
	Temporal	0,568	0,072	0,350
Espesor promedio de papila		0,617	0,070	0,107

\*P<0,05; \*\*P<0,01; (aROC: area under the receiver operating characteristic; DE: desviación estándar)

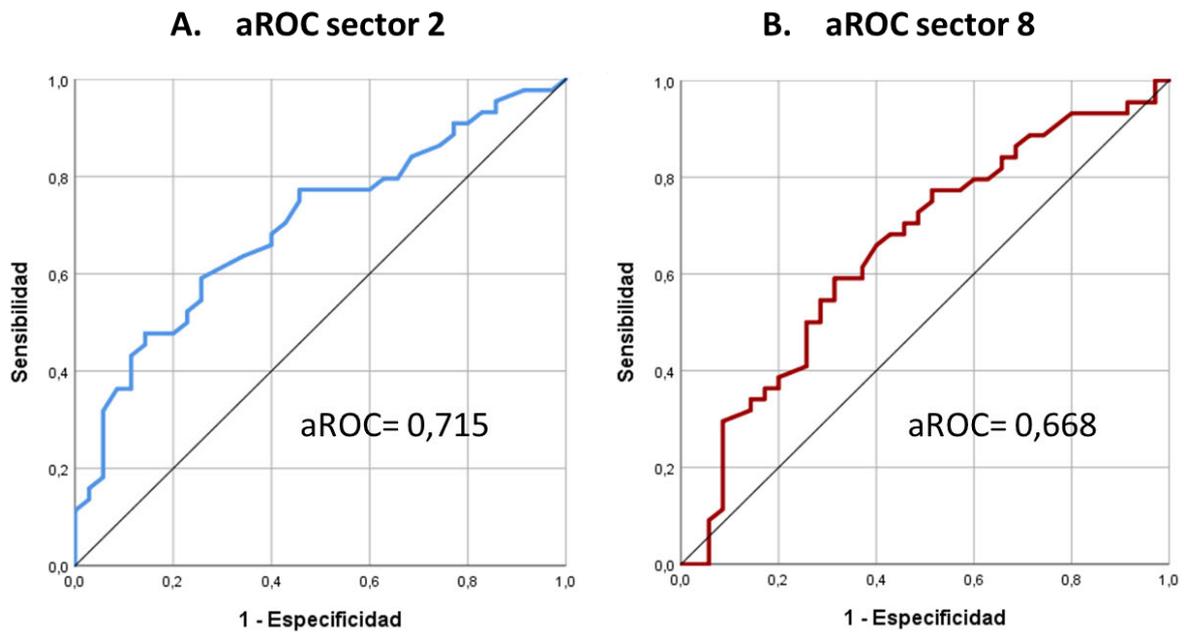
### *Curvas ROC en el análisis de la papila en los 12 sectores horarios.*

En el estudio de las curvas ROC para los 12 sectores horarios peripapilares se encontró significación estadística para el sector 2 (aROC=0,715; p<0,01) y el sector 8 (aROC=0,668; p<0,05). El resto de sectores analizados no mostró significación estadística (Tabla 58, Gráfica 54).

**Tabla 58. Análisis del área bajo la curva en los diferentes parámetros de retina analizados mediante OCT.**

Papila (sectores horarios)	aROC	DE	P-valor
1	0,633	0,070	0,066
2	0,715	0,064	<b>0,003**</b>
3	0,629	0,069	0,075
4	0,497	0,072	0,969
5	0,454	0,073	0,523
6	0,520	0,072	0,777
7	0,549	0,072	0,498
8	0,668	0,068	<b>0,020*</b>
9	0,569	0,071	0,340
10	0,403	0,071	0,180
11	0,467	0,072	0,650
12	0,596	0,071	0,184

\*P<0,05; \*\*P<0,01; (aROC: area under the receiver operating characteristic; DE: desviación estándar)



**Gráfica 54. Análisis de las curvas ROC del análisis de de la papila en los 12 sectores horarios mediante OCT. A: aROC del sector 2; B: aROC del sector 8.**

#### *Curvas ROC en el análisis del espesor coroideo.*

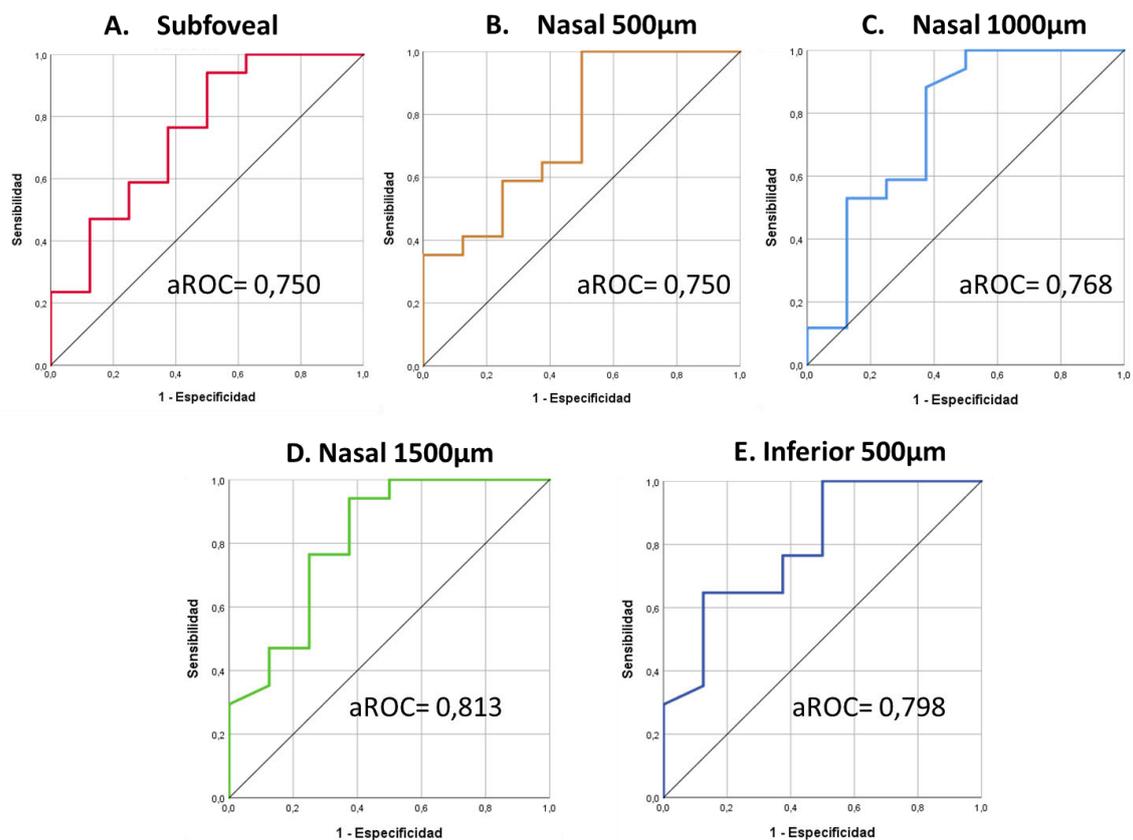
Todos los valores de la coroides mostraron un buen valor predictivo siendo todos significativos excepto a 1500  $\mu\text{m}$  de la fovea en el sector temporal.

Los mejores valores de curvas ROC se obtuvieron para el espesor coroideo subfoveal (aROC=0,750;  $p<0,01$ ), el sector nasal a 500  $\mu\text{m}$  (aROC=0,750;  $p<0,01$ ), 1000  $\mu\text{m}$  (aROC=0,768;  $p<0,01$ ), y 1500  $\mu\text{m}$  (aROC=0,813;  $p<0,01$ ), y en el sector inferior a 500  $\mu\text{m}$  (aROC=0,798;  $p<0,01$ ) (Tabla 59, Gráfica 55).

**Tabla 59 . Análisis del área bajo la curva en el estudio del espesor coroideo.**

	aROC	DE	P-valor
Subfoveal	0,750	0,077	<b>0,005**</b>
Temp 500µm	0,702	0,089	<b>0,022*</b>
Temp 1000µm	0,688	0,093	<b>0,034*</b>
Temp 1500µm	0,647	0,089	0,096
Nas 500µm	0,750	0,076	<b>0,005**</b>
Nas 1000µm	0,768	0,082	<b>0,002**</b>
Nas 1500µm	0,813	0,070	<b>&lt;0,001**</b>
Sup 500µm	0,735	0,080	<b>0,008**</b>
Sup 1000µm	0,743	0,079	<b>0,006**</b>
Sup 1500µm	0,735	0,083	<b>0,008**</b>
Inf 500µm	0,798	0,068	<b>&lt;0,001**</b>
Inf 1000µm	0,743	0,082	<b>0,006**</b>
Inf 1500µm	0,735	0,081	<b>0,008**</b>

\*P < 0,05; \*\*P<0,01; (aROC: area under the receiver operating characteristic; Temp: temporal; Nas: nasal; Sup: superior; Inf: inferior; DE: desviación estándar)



**Gráfica 55. Análisis de las curvas ROC del espesor coroideo medido mediante OCT Spectralis.**

## 6.5 Análisis de correlaciones con el MMSE.

En el análisis de correlaciones se ha estudiado la relación lineal que existe entre todas las pruebas psicofísicas y parámetros de OCT (maculares y peripapilares) con el valor del MMSE que es uno de los test usados para detectar el deterioro cognitivo y evaluar su evolución y estadio.

Para analizar dichas relaciones lineales se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson. Este coeficiente toma valores entre -1 y 1. Valores positivos y cercano a 1 indican una fuerte relación lineal positiva entre las dos variables (es decir, cuando una de ellas aumenta, la otra también). Valores negativos y cercanos a -1 indican una fuerte relación lineal negativa entre las dos variables (cuando una de ellas disminuye, la otra aumenta). Valores cercanos al 0 indican ninguna relación lineal entre las variables a analizar.

### 6.5.1 Correlaciones MMSE y test psicofísicos

En el análisis de la correlación de Pearson entre el MMSE con los test psicofísicos se encontró que todas las pruebas presentaban una significación estadística ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 60. Correlación de Pearson entre Mini Mental State Examination y Test Psicofísicos**

	r	P-valor	
<b>Agudeza Visual</b>	0,406	<0,001**	
3 cpg	0,386	<0,001**	
<b>Sensibilidad al Contraste</b>	6 cpg	0,544	<0,001**
12 cpg	0,439	<0,001**	
18 cpg	0,411	<0,001**	
<b>Rue 28-Hue</b>	Errores totales	-0,483	<0,001**
Errores inespecíficos eje tritán	-0,451	<0,001**	
Errores inespecíficos eje deután	-0,506	<0,001**	
<b>TDP</b>	Láminas correctas	0,257	0,012*

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Pearson (cpg, ciclos por grado; TDP, Test Digital de Percepción).

La mayor correlación con el MMSE se encontró en el test de SC en la frecuencia de 6 cpg con una correlación positiva de 0,544 ( $p < 0,001$ ), seguida por los errores inespecíficos del eje del deután en el análisis de la percepción del color con una correlación significativa

inversa de -0,506 ( $p < 0,001$ ) (a menor MMSE, mayor número de errores), los errores totales ( $r = -0,483$ ;  $p < 0,001$ ), los errores inespecíficos del eje del tritán ( $r = -0,451$ ;  $p < 0,01$ ) que presentan correlaciones muy altas, seguido por la SC de 12 cpg ( $r = 0,439$ ;  $p < 0,01$ ) y de 18 cpg ( $r = 0,411$ ;  $p < 0,01$ ), la AV ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,01$ ), la SC de 3 cpg ( $r = 0,386$ ;  $p < 0,01$ ) y el test de integración visual TDP ( $r = 0,257$ ;  $p < 0,01$ ), presentando estas últimas todas correlaciones positivas (Tabla 60).

### 6.5.2 Correlaciones MMSE y OCT

En el análisis de correlaciones entre el MMSE y los parámetros de la OCT se encontraron correlaciones significativas tanto en la porción macular como en la peripapilar (Tabla 61).

Respecto a las medidas **maculares** la mejor correlación con la puntuación del MMSE fue para El cuadrado 4 en el análisis de 6x6 ( $r = 0,277$ ;  $p < 0,05$ ), seguida por el cuadrado 6 ( $r = 0,262$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 12 ( $r = 0,261$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 24 ( $r = 0,253$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 16 ( $r = 0,243$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 5 ( $r = 0,242$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 3 ( $r = 0,238$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 30 ( $r = 0,232$ ;  $p < 0,05$ ) y en el análisis en círculos concéntricos el anillo macular exterior temporal ( $r = 0,229$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 61).

**Tabla 61. Correlación de Pearson entre Mini Mental State Examination y OCT**

Test		r	P-valor	
<b>Macula</b>				
<b>Mácula redondo</b>	<b>Anillo. Ext. Temp</b>	0,229	<b>0,038*</b>	
	<b>3</b>	0,238	<b>0,035*</b>	
	<b>4</b>	0,277	<b>0,014*</b>	
	<b>5</b>	0,242	<b>0,032*</b>	
	<b>Mácula 6x6</b>	<b>6</b>	0,262	<b>0,021*</b>
		<b>12</b>	0,261	<b>0,023*</b>
		<b>16</b>	0,243	<b>0,030*</b>
		<b>24</b>	0,253	<b>0,027*</b>
<b>30</b>		0,232	<b>0,042*</b>	
<b>Papila</b>				
<b>4 sectores</b>	<b>Superior</b>	0,340	<b>0,002**</b>	
	<b>Inferior</b>	0,328	<b>0,004*</b>	
<b>12 sectores</b>	<b>1</b>	0,260	<b>0,022*</b>	
	<b>7</b>	0,278	<b>0,014*</b>	
	<b>12</b>	0,370	<b>0,001**</b>	
<b>Espesor promedio</b>		0,308	<b>0,007**</b>	

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Pearson.

Las correlaciones de mayor a menor de la **papila** con la puntuación del MMSE fueron el sector 12 en el análisis de sectores horarios ( $r = 0,370$ ;  $p < 0,01$ ), en el análisis de los 4 sectores el sector superior ( $r = 0,340$ ;  $p < 0,01$ ) y el inferior ( $r = 0,328$ ;  $p < 0,01$ ), el espesor promedio peripapilar ( $r = 0,308$ ;  $p < 0,01$ ) y en el análisis de 12 sectores el sector 7 ( $r = 0,278$ ;  $p < 0,01$ ) y 1 ( $r = 0,260$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabla 61).

## 6.6 Análisis de correlaciones entre la sensibilidad al contraste y el espesor de la retina medido con OCT.

### 6.6.1 Correlaciones sensibilidad al contraste y espesores maculares.

En el análisis de correlaciones de Pearson se ha estudiado la relación lineal que existe entre las frecuencias estudiadas de la sensibilidad al contraste y las medidas de la retina maculares proporcionadas por la OCT.

#### *Correlación de Pearson entre la SC y el análisis de la mácula mediante sectores circulares concéntricos.*

Los mejores valores de correlación macular con la SC se encontraron en la **frecuencia de 3 cpg** donde eran significativas las correlaciones encontradas en la fovea ( $r = 0,375$ ;  $p < 0,01$ ), en el anillo macular interior en superior ( $r = 0,401$ ;  $p < 0,01$ ), nasal ( $r = 0,223$ ;  $p < 0,05$ ), inferior ( $r = 0,442$ ;  $p < 0,01$ ), y temporal ( $r = 0,438$ ;  $p < 0,01$ ); en el anillo macular exterior en superior ( $r = 0,247$ ;  $p < 0,05$ ), nasal ( $r = 0,231$ ;  $p < 0,05$ ) y temporal ( $r = 0,280$ ;  $p < 0,05$ ) y en el espesor central ( $r = 0,277$ ;  $p < 0,05$ ), en la media de espesores maculares ( $r = 0,366$ ;  $p < 0,01$ ) y en el volumen macular ( $r = 0,348$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabla 62, Gráfica 56).

En la **frecuencia de 6 cpg** se encuentra una correlación significativa con el espesor foveal ( $r = 0,243$ ;  $p < 0,05$ ), con el anillo macular interior en los sectores inferior ( $r = 0,260$ ;  $p < 0,05$ ) y temporal ( $r = 0,275$ ;  $p < 0,05$ ) y con el anillo macular exterior con el sector temporal ( $r = 0,226$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 62, Gráfica 56).

En la **frecuencia de 12 cpg** las correlaciones significativas se encuentran en el espesor foveal ( $r = 0,316$ ;  $p < 0,01$ ), en el anillo macular interior en el sector temporal ( $r = 0,274$ ;  $p < 0,05$ ), en el anillo macular exterior en el sector temporal ( $r = 0,232$ ;  $p < 0,05$ ) y en el espesor central ( $r = 0,267$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 62, Gráfica 56).

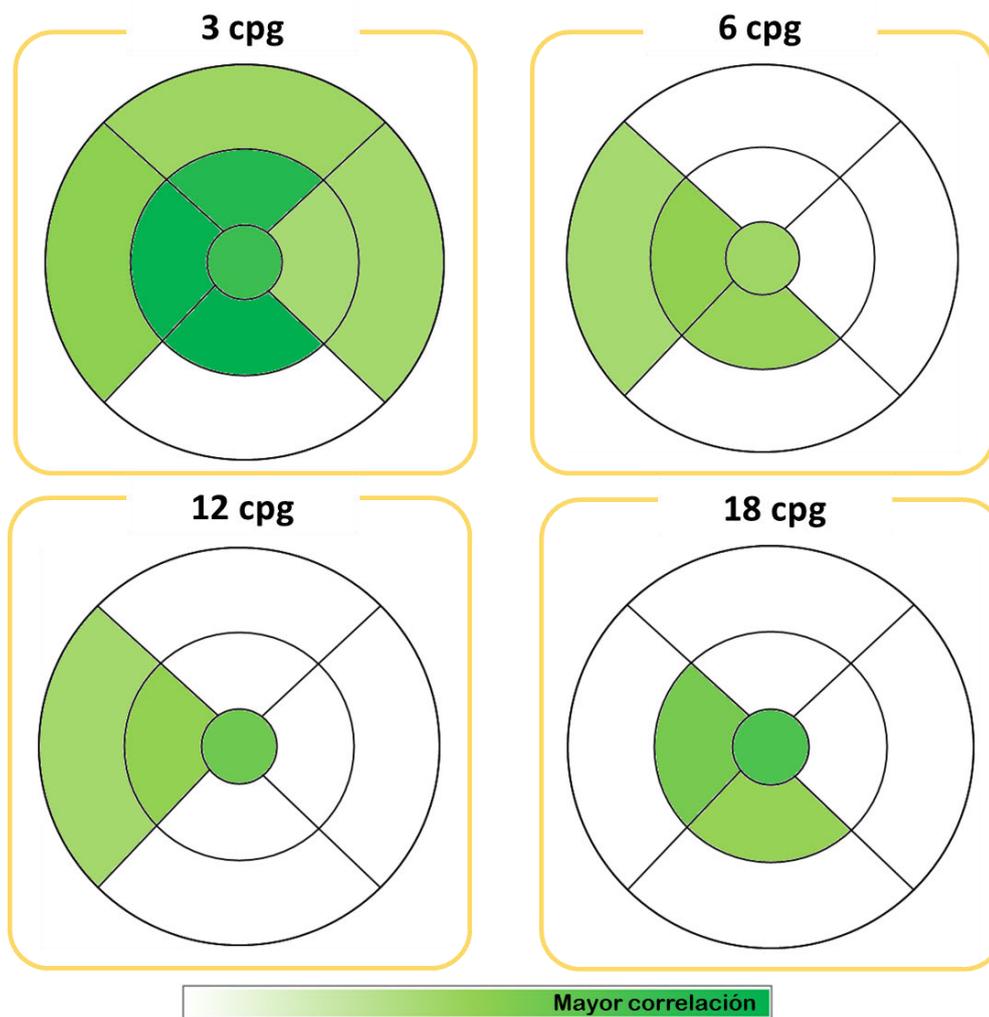
Respecto a la **frecuencia de 18 cpg**, se encontraron correlaciones significativas en la fovea ( $r = 0,353$ ;  $p < 0,01$ ), en el anillo macular interior en los sectores inferior ( $r = 0,267$ ;  $p < 0,05$ ) y temporal ( $r = 0,307$ ;  $p < 0,01$ ) y en el espesor central ( $r = 0,224$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 62, Gráfica 56).

En la Gráfica 56 se encuentra una representación en escala de verdes donde se representan aquellas áreas maculares que tienen una correlación significativa con las diferentes frecuencias espaciales analizadas mediante el test de SC.

**Tabla 62. Correlación de Pearson entre el test de SC y los parámetros maculares del análisis de círculos concéntricos analizados mediante OCT.**

		CSV-1000E							
		3 cpg		6 cpg		12 cpg		18 cpg	
		r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
<b>Fóvea</b>		0,375	<b>0,001**</b>	0,243	<b>0,029*</b>	0,316	<b>0,004**</b>	0,353	<b>0,001**</b>
<b>Anillo macular interior</b>	<b>Superior</b>	0,401	<b>&lt;0,001**</b>	0,204	0,068	0,184	0,100	0,208	0,063
	<b>Nasal</b>	0,223	<b>0,047*</b>	0,063	0,576	-0,027	0,810	-0,013	0,907
	<b>Inferior</b>	0,442	<b>&lt;0,001**</b>	0,260	<b>0,019*</b>	0,228	0,041	0,267	<b>0,016*</b>
	<b>Temporal</b>	0,438	<b>&lt;0,001**</b>	0,275	<b>0,013*</b>	0,274	<b>0,013*</b>	0,307	<b>0,005**</b>
<b>Anillo macular exterior</b>	<b>Superior</b>	0,247	<b>0,027*</b>	0,055	0,626	0,051	0,651	0,068	0,550
	<b>Nasal</b>	0,231	<b>0,041*</b>	0,014	0,901	0,014	0,904	0,009	0,940
	<b>Inferior</b>	0,111	0,329	-0,049	0,668	-0,019	0,867	-0,045	0,692
	<b>Temporal</b>	0,280	<b>0,012*</b>	0,226	<b>0,043*</b>	0,232	<b>0,039*</b>	0,219	0,051
<b>Espesor central</b>		0,277	<b>0,013*</b>	0,139	0,218	0,267	<b>0,017*</b>	0,224	<b>0,046*</b>
<b>Media macular</b>		0,366	<b>0,001**</b>	0,183	0,111	0,187	0,103	0,203	0,077
<b>Volumen macular</b>		0,348	<b>0,002**</b>	0,133	0,242	0,174	0,125	0,161	0,157

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Pearson. (cpg: ciclos por grado).



**Gráfica 56. Correlaciones de Pearson entre la sensibilidad al contraste y el análisis mediante sectores concéntricos de la mácula mediante OCT.** En verde aquellas correlaciones significativas  $p < 0,05$ .

***Correlación de Pearson entre la SC y el análisis de la mácula mediante una rejilla cuadrangular de 6x6.***

En la **frecuencia de 3 cpg** fue en la que se encontró un mayor número de correlaciones con la rejilla cuadrangular de 6x6. Se encontraron correlaciones significativas en el cuadrado 3 ( $r = 0,290$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 4 ( $r = 0,322$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 5 ( $r = 0,261$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 6 ( $r = 0,252$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 9 ( $r = 0,333$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 10 ( $r = 0,369$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 11 ( $r = 0,304$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 12 ( $r = 0,303$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 14 ( $r = 0,260$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 15 ( $r = 0,405$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 16 ( $r = 0,414$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 17 ( $r = 0,364$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 18 ( $r = 0,264$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 20 ( $r = 0,255$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 21 ( $r = 0,399$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 22 ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,01$ ), el

cuadrado 23 ( $r = 0,308$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 24 ( $r = 0,304$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 30 ( $r = 0,322$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 35 ( $r = 0,229$ ;  $p < 0,05$ ) y el cuadrado 36 ( $r = 0,233$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 63, Gráfica 57).

La **frecuencia de 6 cpg** mostró una correlación significativa con el cuadrado 15 ( $r = 0,251$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 16 ( $r = 0,243$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 21 ( $r = 0,229$ ;  $p < 0,05$ ) y el cuadrado 22 ( $r = 0,235$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 63, Gráfica 57).

La **frecuencia de 12 cpg** tenía una correlación significativa con el cuadrado 12 ( $r = 0,237$ ;  $p < 0,05$ ), el cuadrado 21 ( $r = 0,238$ ;  $p < 0,05$ ) y el cuadrado 22 ( $r = 0,221$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 63, Gráfica 57).

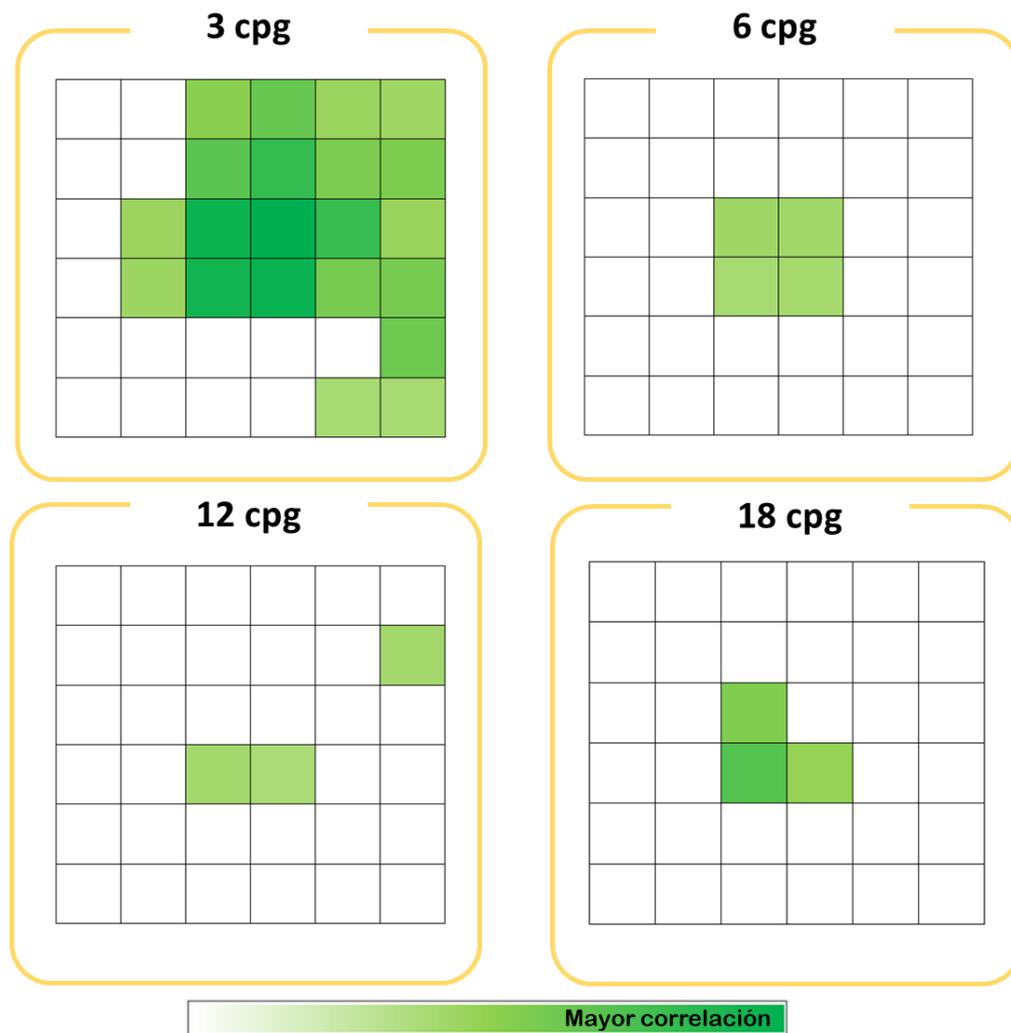
La **frecuencia de 18 cpg** tenía una correlación significativa con el cuadrado 15 ( $r = 0,299$ ;  $p < 0,01$ ), el cuadrado 21 ( $r = 0,339$ ;  $p < 0,05$ ) y el cuadrado 22 ( $r = 0,277$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 63, Gráfica 57).

En la Gráfica 57 se encuentra una representación es escala de verdes donde se representan aquellas áreas maculares que tienen una correlación significativa con las diferentes frecuencias espaciales analizadas mediante el test de SC.

**Tabla 63. Correlación de Pearson entre el test de SC y los parámetros maculares del análisis de una rejilla cuadrangular de 6x6 analizados mediante OCT.**

		CSV-1000E							
		3 cpg		6 cpg		12 cpg		18 cpg	
		r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
<b>Mácula 6x6 (sector)</b>	<b>3</b>	0,290	<b>0,010**</b>	0,126	0,273	0,030	0,793	0,079	0,493
	<b>4</b>	0,322	<b>0,004**</b>	0,155	0,177	0,053	0,643	0,123	0,283
	<b>5</b>	0,261	<b>0,021*</b>	0,110	0,339	0,099	0,388	0,087	0,448
	<b>6</b>	0,252	<b>0,028*</b>	0,120	0,300	0,207	0,072	0,171	0,140
	<b>9</b>	0,333	<b>0,003**</b>	0,109	0,341	0,035	0,760	0,087	0,450
	<b>10</b>	0,369	<b>0,001**</b>	0,088	0,445	0,006	0,958	0,034	0,770
	<b>11</b>	0,304	<b>0,007**</b>	0,085	0,460	0,029	0,800	0,016	0,892
	<b>12</b>	0,303	<b>0,008**</b>	0,177	0,129	0,237	<b>0,040*</b>	0,142	0,225
	<b>14</b>	0,260	<b>0,021*</b>	0,097	0,393	0,008	0,941	0,080	0,485
	<b>15</b>	0,405	<b>&lt;0,001**</b>	0,251	<b>0,026*</b>	0,210	0,063	0,299	<b>0,007**</b>
	<b>16</b>	0,414	<b>&lt;0,001**</b>	0,243	<b>0,031*</b>	0,190	0,094	0,211	0,062
	<b>17</b>	0,364	<b>0,001**</b>	0,112	0,324	-0,033	0,770	0,038	0,739
	<b>18</b>	0,264	<b>0,020*</b>	0,097	0,401	0,090	0,438	0,093	0,420
	<b>20</b>	0,255	<b>0,023*</b>	0,140	0,219	0,029	0,801	0,083	0,465
	<b>21</b>	0,399	<b>&lt;0,001**</b>	0,229	<b>0,042*</b>	0,238	<b>0,035*</b>	0,339	<b>0,002*</b>
	<b>22</b>	0,406	<b>&lt;0,001**</b>	0,235	<b>0,037*</b>	0,221	<b>0,005*</b>	0,277	<b>0,013*</b>
	<b>23</b>	0,308	<b>0,006**</b>	0,133	0,246	-0,060	0,604	0,010	0,995
	<b>24</b>	0,304	<b>0,008**</b>	0,182	0,166	0,075	0,521	0,118	0,309
<b>30</b>	0,322	<b>0,003**</b>	0,129	0,268	0,095	0,413	0,117	0,315	
<b>35</b>	0,229	<b>0,048*</b>	0,013	0,912	0,087	0,456	0,077	0,514	
<b>36</b>	0,233	<b>0,046*</b>	0,068	0,565	0,028	0,810	0,089	0,450	

\*P<0.05, \*\*P<0.01 Test de Pearson. (cpg: ciclos por grado).



Gráfica 57. Correlaciones de Pearson entre la sensibilidad al contraste y el análisis mediante una rejilla cuadrangular de 6x6 de la mácula mediante OCT. En verde aquellas correlaciones significativas  $p < 0,05$ .

### 6.6.2 Correlaciones sensibilidad al contraste y espesores peripapilares.

En el análisis de correlaciones de Pearson se ha estudiado la relación lineal que existe entre las frecuencias estudiadas de la sensibilidad al contraste y las medidas de la retina peripapilares proporcionadas por la OCT.

*Correlación de Pearson entre la SC y el análisis peripapilar dividido en 4 sectores mediante OCT.*

En el análisis de correlaciones entre la SC y el espesor de la retina peripapilar dividida en 4 sectores únicamente se encontró una correlación significativa, la correlación de la

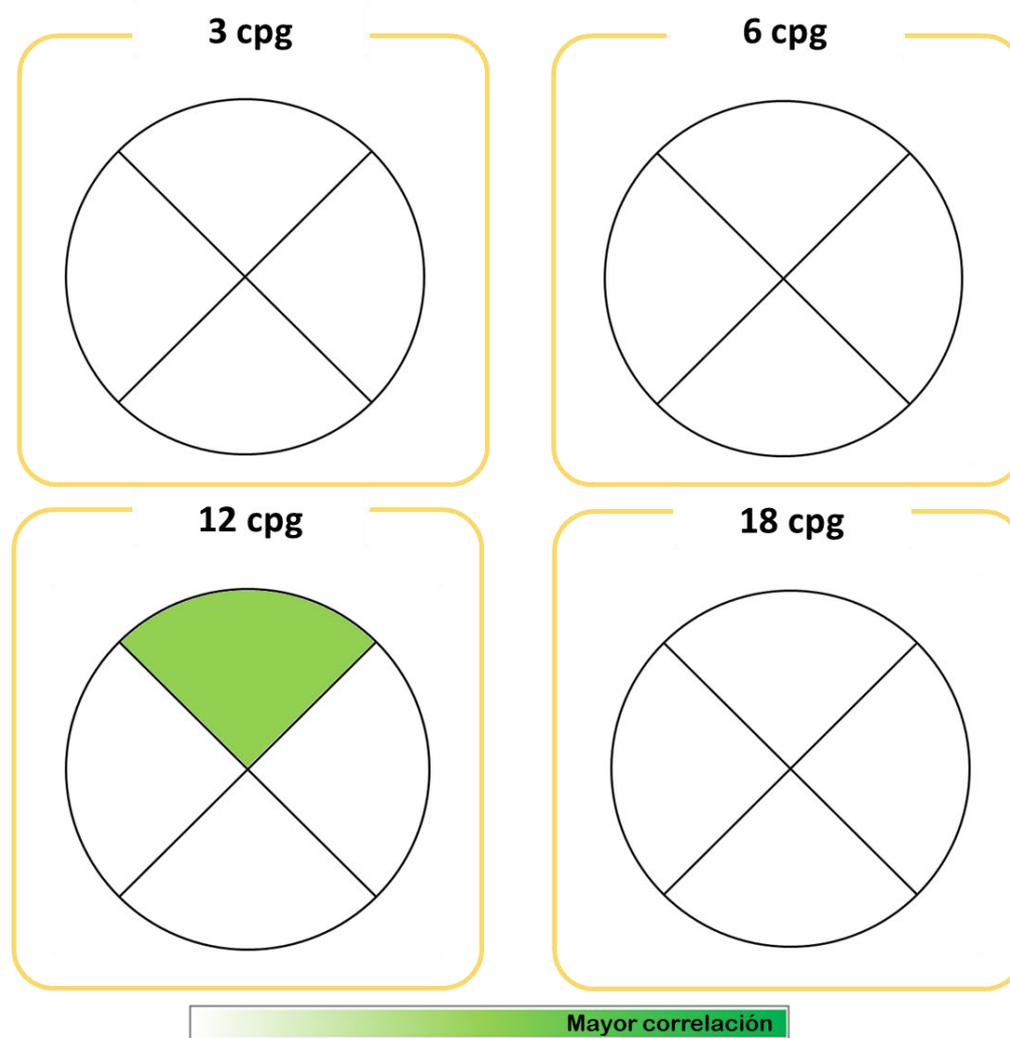
**frecuencia de 12 cpg** con el sector superior peripapilar ( $r = 0,238$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 64, Gráfica 58).

En la Gráfica 58 se encuentra una representación es escala de verdes donde se representan aquellas áreas peripapilares que tienen una correlación significativa con las diferentes frecuencias espaciales analizadas mediante el test de SC.

**Tabla 64. Correlación de Pearson entre el test de SC y los parámetros del análisis peripapilar en 4 sectores.**

		CSV-1000E							
		3 cpg		6 cpg		12 cpg		18 cpg	
		r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
Sector de papila	Superior	0,087	0,446	0,210	0,065	0,238	<b>0,038*</b>	0,123	0,283
	Nasal	0,180	0,118	0,050	0,665	0,082	0,477	0,065	0,572
	Inferior	0,054	0,640	0,036	0,755	0,082	0,480	-0,052	0,651
	Temporal	-0,004	0,970	-0,158	0,174	-0,031	0,791	-0,080	0,490

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Test de Pearson. (cpg: ciclos por grado).



**Gráfica 58. Correlaciones de Pearson entre la sensibilidad al contraste y el análisis mediante peripapilar dividido en 4 sectores mediante OCT.** En verde aquellas correlaciones significativas  $p < 0,05$ .

***Correlación de Pearson entre la SC y el análisis peripapilar dividido en 12 sectores horarios mediante OCT.***

En el análisis de correlaciones entre los 12 sectores horarios peripapilares y la **frecuencia de 3cpg** no se encontró ninguna significación estadística (Tabla 65, Gráfica 59).

En la **frecuencia de 6 cpg** se encontró una significación estadística con el sector horario 1 ( $r = 0,310$ ;  $p < 0,01$ ) y el sector horario 2 ( $r = 0,238$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 65, Gráfica 59).

En la **frecuencia de 12 cpg** la significación estadística se encontró en el sector horario 2 ( $r = 0,343$ ;  $p < 0,01$ ) y el sector horario 12 ( $r = 0,262$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 65, Gráfica 59).

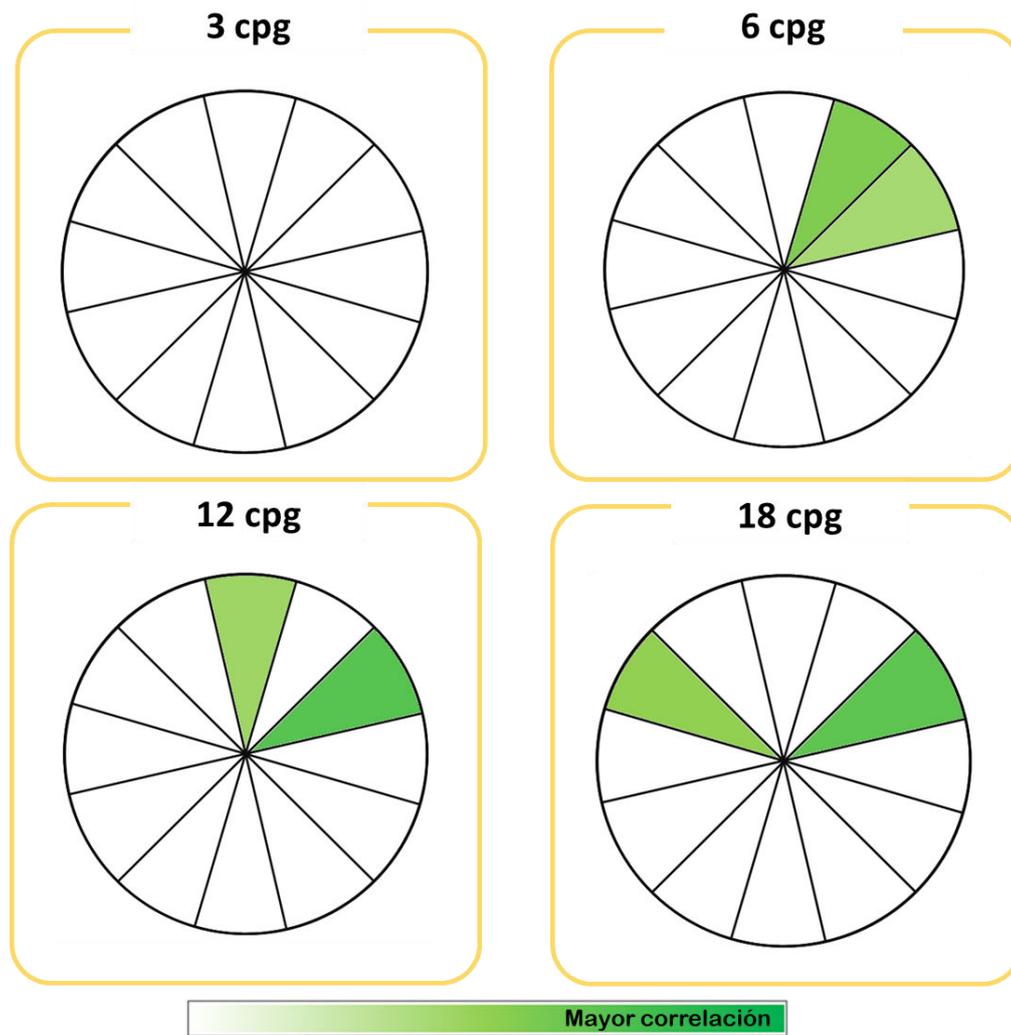
En la **frecuencia de 18 cpg** había una correlación significativa en el sector horario 2 ( $r = 0,337$ ;  $p < 0,01$ ) y el sector horario 10 ( $r = -0,278$ ;  $p < 0,05$ ), siendo ésta última la única correlación inversa (Tabla 65, Gráfica 59).

En la Gráfica 59 se encuentra una representación es escala de verdes donde se representan aquellas áreas peripapilares que tienen una correlación significativa con las diferentes frecuencias espaciales analizadas mediante el test de SC.

**Tabla 65. Correlación de Pearson entre el test de SC y los parámetros del análisis peripapilar en 12 sectores.**

	CSV-1000E								
	3 cpg		6 cpg		12 cpg		18 cpg		
	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	
<b>Papila (sectores horarios)</b>	<b>1</b>	0,166	0,146	0,310	<b>0,005**</b>	0,199	0,079	0,147	0,197
	<b>2</b>	0,095	0,405	0,238	<b>0,034*</b>	0,343	<b>0,002**</b>	0,337	<b>0,002**</b>
	<b>10</b>	0,06	0,597	-0,059	0,606	-0,154	0,176	-0,278	<b>0,013*</b>
	<b>12</b>	-0,014	0,901	0,091	0,429	0,262	<b>0,021*</b>	0,133	0,245

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Test de Pearson. (cpg: ciclos por grado).



**Gráfica 59. Correlaciones de Pearson entre la sensibilidad al contraste y el análisis mediante peripapilar dividido en 12 sectores horarios mediante OCT.** En verde aquellas correlaciones significativas  $p < 0,05$ .

Tras el análisis estructural de la retina en pacientes con EA mediante OCT y OCTA en las que se obtuvieron diversas zonas de engrosamiento y otras de adelgazamiento respecto a los controles, ya que no se disponía de tejido humano para intentar dar respuesta a las alteraciones estructurales retinianas encontradas, se decidió analizar los cambios que se producen en la retina de un modelo transgénico de ratón de EA, a sabiendas de las diferencias que pueden existir entre un modelo y la patología humana.

## 6.7 Análisis de las células Iba-1+ en las retinas de ratones 3xTgAD.

### 6.7.1 Descripción morfológica de las células Iba-1+ en las muestras de retina.

#### 6.7.1.1 Grupo de animales no transgénicos de 16 meses de edad (controles).

En los ratones pigmentados C57BL/6, las células Iba-1+ se distribuían por toda la extensión de la retina dispuestas en plexos en la CPE (Figura 54 A-B), CPI (Figura 55 A-B) y CFN-CCG (Figura 57).

#### *Capa plexiforme externa y capa plexiforme interna.*

En el grupo control de edad, tanto en la CPE como en la CPI se observó que las células Iba-1+ tenían un aspecto **ramificado estrellado** (Figura 54 A-B y Figura 55 A-B). Además, en la CPI existía un tipo adicional de células Iba-1+ con **aspecto dendritiforme** (Figura 58 A1-A3 y Figura 59 B1-B3).

Las células **Iba-1+ de aspecto ramificado** formaban un plexo ordenado con forma de mosaico distribuyéndose de forma equidistante. En estos plexos no se observaban solapamientos o contactos entre las células vecinas. Los somas celulares eran triangulares u ovalados y estaban centrados en la célula presentando un tamaño pequeño. Del soma emergían prolongaciones primarias finas y largas que se dividían dicotómicamente en prolongaciones secundarias de las que derivaban prolongaciones terciarias. Tanto los somas como las prolongaciones celulares, se posicionaban generalmente paralelos a la superficie de la retina (Figura 54 A-B y Figura 55 A-B).

Las células **Iba-1+ de aspecto dendritiforme**, tenían un soma grueso del que emergían prolongaciones primarias gruesas. Estas prolongaciones daban lugar a otras prolongaciones secundarias más cortas e igual de gruesas que las primarias. Esta morfología daba a la célula un aspecto similar al de las células dendríticas. Estas células eran poco numerosas, se disponían paralelas a la superficie retiniana y se localizaban en el área yuxtapapilar y en la retina periférica próxima a la ora serrata de la CPI (Figura 58 A1-A3 y Figura 59 B1-B3).

#### *Capa de fibras nerviosas y capas de células ganglionares de la retina.*

En el grupo de animales no transgénicos en la CFN-CGR se distinguían dos tipos morfológicos de células Iba-1+: unas células **ramificadas** (Figura 57 A) y otras células **perivasculares** con apariencia **alargada** (Figura 57 B y Figura 60 A1), ambas se encontraban en relación con los vasos sanguíneos.

Las células **perivasculares Iba-1+**, tenían una apariencia alargada y disponían tanto el soma como sus prolongaciones en la pared vascular. Eran células poco ramificadas, que presentaban un soma y unas prolongaciones celulares toscas. Esta población celular no era muy abundante y presentaba predilección por los vasos venosos, encontrándose sobre todo cerca de la cabeza del nervio óptico y sobre el vaso venoso retiniano periférico (Figura 57 B y Figura 60 A1).

Las células **Iba-1+ de aspecto ramificado** eran las más comunes en estas capas y se situaban en relación con los vasos sanguíneos y en las zonas intervasculares. Los somas de estas células eran pequeños y de forma ovoide o triangular, de ellos salían entre 2 a 4 prolongaciones primarias, que se dividían en prolongaciones secundarias más finas, a partir de las cuales salían otras terciarias cortas y finas. Tanto el soma como las prolongaciones de estas células se disponían, de forma mayoritaria, paralelas a la superficie de la retina (Figura 57A). Las células de esta capa estaban muy próximas a las células Iba-1+ de la CPI.

#### **6.7.1.2 Grupo de animales transgénicos de Alzheimer (3xTgAD) de 16 meses de edad.**

En los ratones pigmentados transgénicos 3xTgAD, al igual que en el grupo control, las células Iba-1+ se distribuían por toda la extensión de la retina dispuestas en plexos localizados en la CPE, CPI y CFN-CCG. Sin embargo, estos plexos no eran tan uniformes, al contrario de lo que ocurría en el grupo control no transgénico (Figura 54 C-G, Figura 55 C-G).

##### ***Capa plexiforme externa y capa plexiforme interna.***

En estas capas los plexos Iba-1+ en algunas zonas retinianas perdían la estructura en mosaico debido al agrupamiento de células Iba-1+, a expensas de zonas con menor densidad celular Iba-1+ (Figura 54 C-G, Figura 55 C-G). A este cambio del mosaico también contribuía la presencia de células Iba-1+ cuyos somas se disponían perpendiculares a la superficie de la

retina, ocupando un menor espacio en la estructura en mosaico (Figura 54 D, E, H y Figura 55 E-H).

En algunas áreas de agrupación de células Iba-1+ se seguía un patrón circular en el que se podían observar como oleadas de células, distanciadas equidistantemente y alineadas, en las que sus prolongaciones estaban orientadas hacia el interior del círculo (Figura 54 E y Figura 55 D). En estos patrones circulares, aparecían en el centro células Iba-1+ con somas muy engrosados, prolongaciones muy retraídas y células con disposición vertical (Figura 54D-E y Figura 55 D, F). Cuando se observaba esta alteración en el plexo microglial de la CPE, también aparecía en la zona subyacente de la CPI, observándose un desplazamiento vertical de microglías entre ambas capas y por tanto una alteración en el mosaico microglial de las capas plexiformes.

En otras zonas, las células Iba-1 + se disponían de forma organizada formando una agrupación lineal (barrera) en la cual las células estaban más engrosadas y con gran retracción de las prolongaciones. Las células Iba-1 + próximas a estas “barreras” reorientaban sus prolongaciones hacia ellas (Figura 54 F,G y Figura 55 E,G).

En algunas zonas de la retina, numerosas células Iba-1 + se disponían de forma perpendicular a la superficie retiniana. Cuando esto ocurría la intensidad de la inmunotinción Iba-1 + de los somas se incrementaba considerablemente (Figura 54 H y Figura 55 H). Cuando analizábamos estas células con la herramienta del axiovision que permite una visualización en 3D, se pudo observar que estas células se disponían verticalmente y mandaban sus prolongaciones tanto a la CPI como a la CPE (Figura 56 B). La disposición vertical de las células Iba-1+ era más frecuente en la CPI que en la CPE, donde había campos enteros en los que todas las células presentaban esta disposición.

En los animales transgénicos en la CPE y en la CPI, se observaba en general un incremento del tamaño de los somas y una retracción de las prolongaciones celulares (Figura 54 C y Figura 55 C). Además, en algunas zonas había células Iba-1 + que presentaban una gran hipertrofia con aumento considerable del tamaño de los somas y una gran retracción de sus prolongaciones. Sus prolongaciones primarias, al estar retraídas, eran más gruesas y la retracción de las las prolongaciones secundarias y terciarias daban a la célula un aspecto espiculado (Figura 54 D-G y Figura 55 D-G). Estas células se localizaban en las zonas de “barrera” o de agrupamientos celulares mencionadas con anterioridad (Figura 54 D-G y Figura 55 D-G).

### ***Capa de fibras nerviosas y capas de células ganglionares de la retina***

En el grupo de animales transgénicos 3xTgAD, en la CFN-CGR se distinguían dos tipos morfológicos de células Iba-1+: unas células **ramificadas** (Figura 57 C) y otras células **perivasculares** (Figura 57 E) con apariencia alargada ambas se encontraban en relación con los vasos sanguíneos.

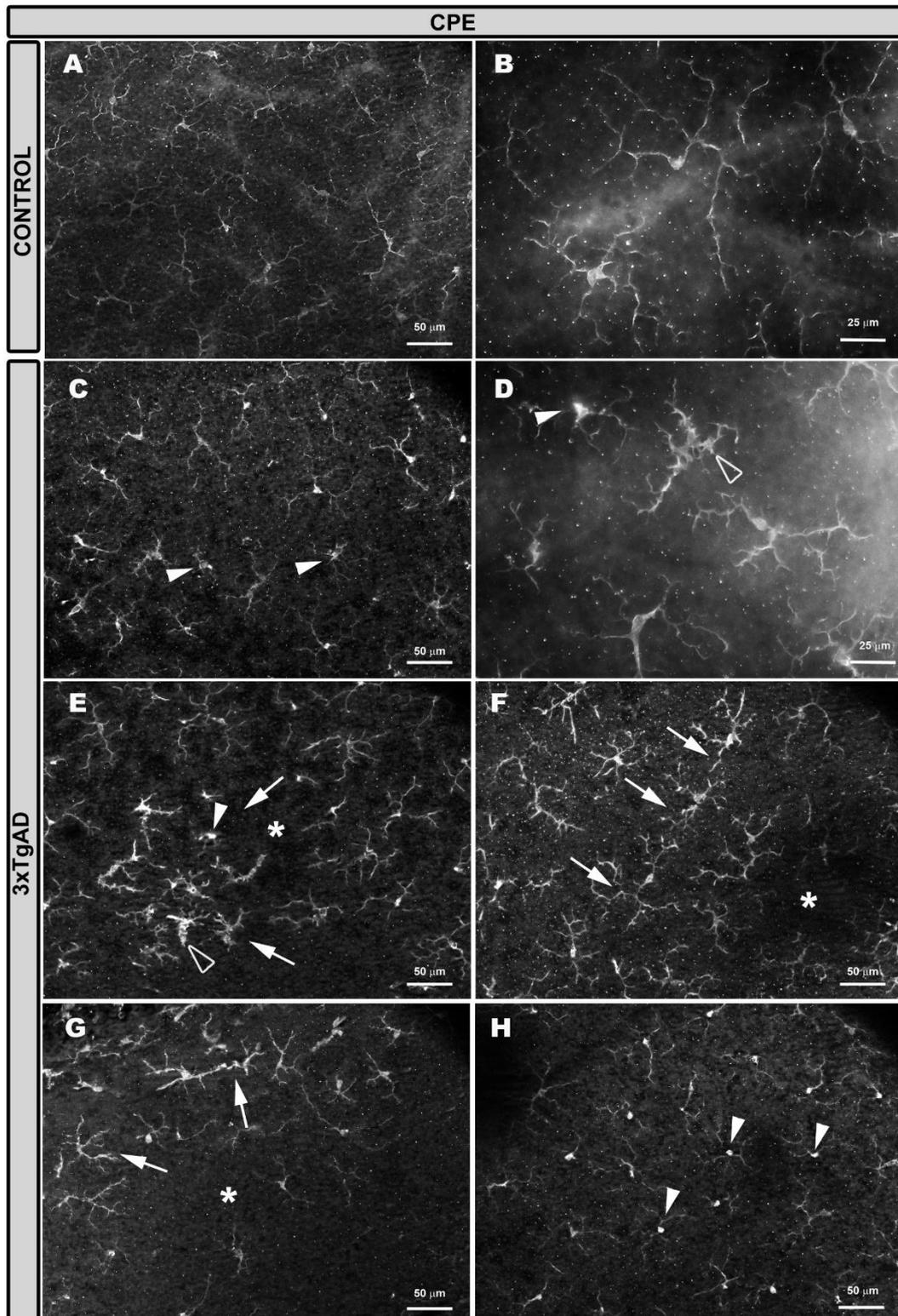
Tanto las células perivasculares como las ramificadas, presentaban un aumento del tamaño del soma, una retracción y engrosamiento de las prolongaciones primarias y una retracción de prolongaciones secundarias y terciarias. Esta retracción, aparentemente, provocaba que el área de arborización de estas células fuera menor (Figura 57 C y D).

A lo largo de toda la retina, tanto en los animales control como en los transgénicos, se observó un punteado difuso Iba-1+ en donde se localizaban las células Iba-1 +, que era mayor en áreas cercanas al disco y disminuía en la periferia. En alguna célula se pudo observar como este punteado se originaba de la célula Iba-1+, tanto de células de tipo dendrítico (Figura 58 A1 y A3) como también de las células microgliales ramificadas.

### **6.7.2 Expresión de OX-6 en las retinas de animales transgénicos 3xTgAD y controles.**

En los **animales no transgénicos controles**, se vio que existía una expresión constitutiva de OX-6 en forma de acúmulos que se disponían fundamentalmente en el soma de las células Iba-1+ en todas las capas estudiadas (Figura 59 A1-A3), a excepción de las células dendríticas de la CPI (Figura 58 A1-A3 y Figura 59 B1-B3) y en las células perivasculares de la CFNR (Figura 60 A1-A3), donde su expresión de OX-6 se daba en toda la extensión celular. En alguna de estas células se observó microvesículas OX-6 + que se almacenaban y parecían surgir del soma y de las prolongaciones de la célula (Figura 58 A2-A3).

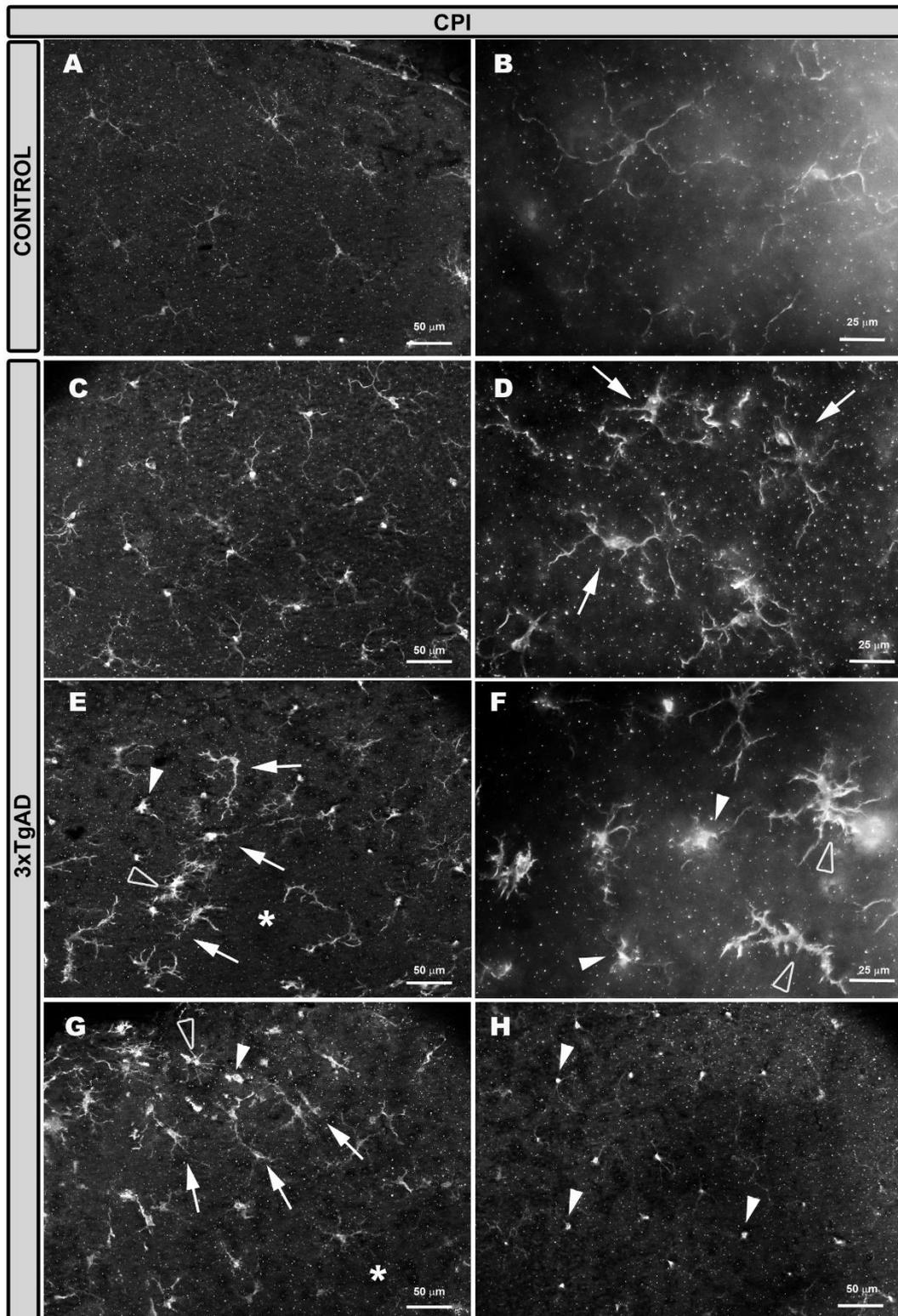
En los **animales transgénicos 3xTgAD**, la observación de la tinción de OX-6 no difiere de los animales controles, mostrándose una expresión en forma de acúmulo de OX-6 en el soma de las células Iba-1+ en todas las capas estudiadas (Figura 59 C1-C3 y D1-D3). Igual que en el control, las células dendríticas y las perivasculares expresaban OX-6 tanto en el soma como en las prolongaciones (Figura 60 B1—B3).



**Figura 54. Células Iba-1+ de la capa plexiforme externa. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1. Montaje plano de retina.** En los ojos control (A-B) las células forman un plexo regular en forma de mosaico por toda la retina teniendo la mayoría de ellas un aspecto ramificado. En los animales 3xTgAD (C-H) se observa en general un engrosamiento del soma y un acortamiento de las

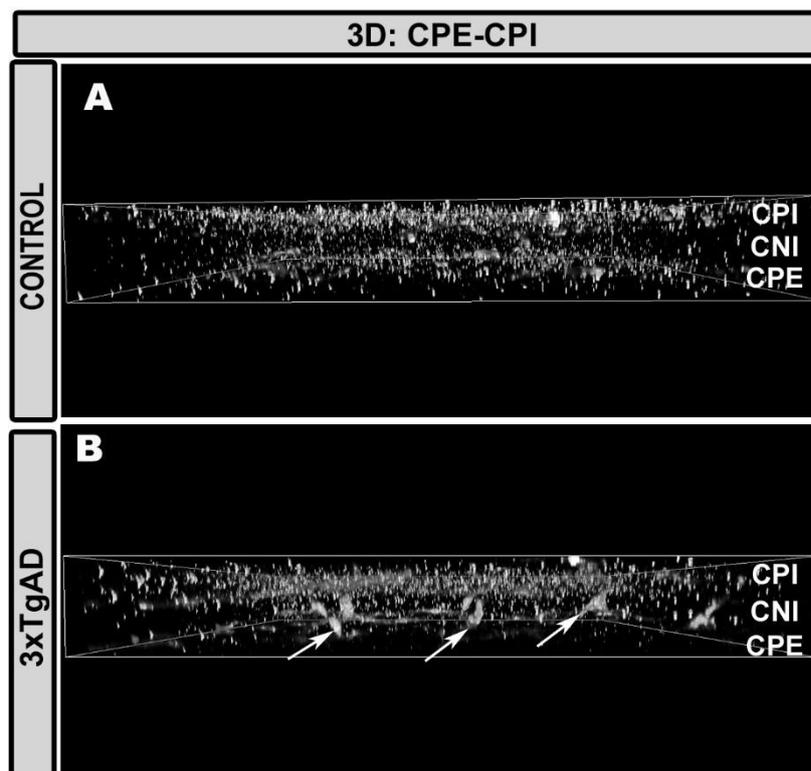
---

prolongaciones de las células Iba-1 + (C). La estructura en mosaico se pierde en algunas zonas, existiendo zonas de agrupación celular (flechas) en forma circular (E) o formando barreras (F, G) a expensas de zonas sin células (\*); en estas zonas se pueden observar células que cambian su orientación disponiéndose perpendicularmente a la superficie retiniana (cabeza de flecha blanca), células que han retraído casi completamente sus prolongaciones adquiriendo aspecto ameboideo (cabeza de flecha hueca). Las células de disposición perpendicular se encuentran en algunas zonas formando áreas extensas (H) (cabeza de flecha blanca). Capa plexiforme externa (CPE).

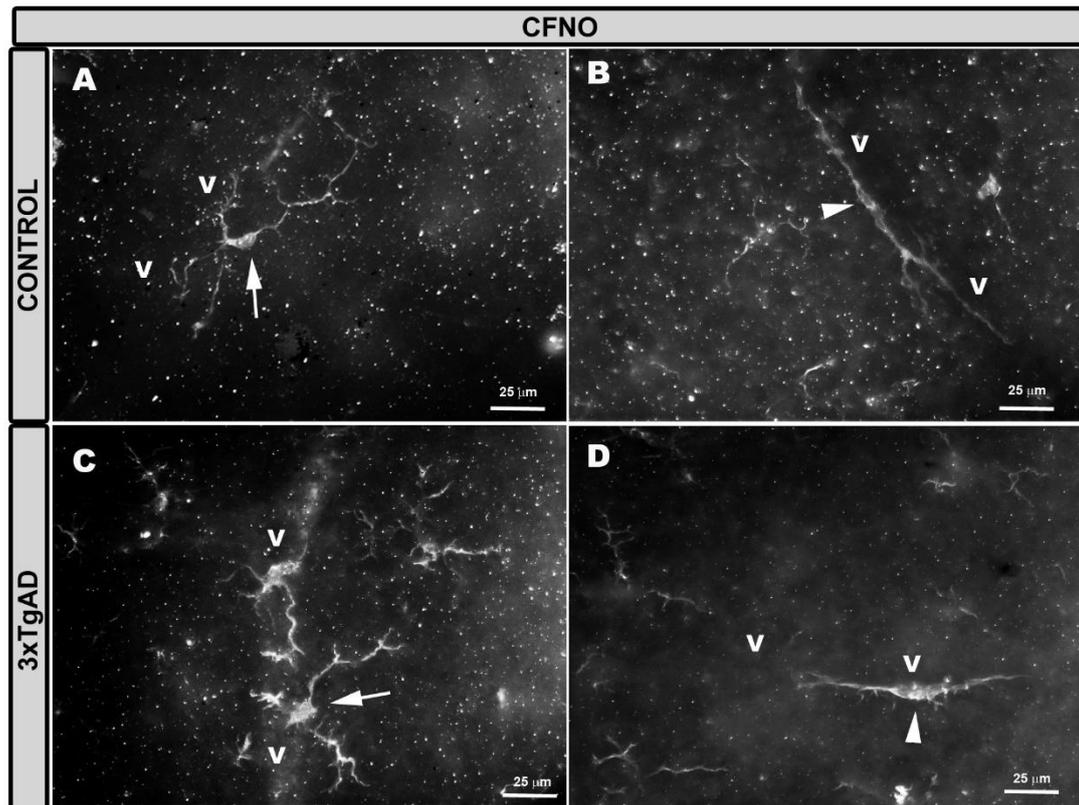


**Figura 55. Células Iba-1+ de la capa plexiforme interna. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1. Montaje plano de retina.** En los ojos control (A-B) la mayoría de las células tienen un aspecto ramificado y forman un plexo regular en forma de mosaico a través de la retina. En los animales 3xTgAD (C-H) las células Iba-1 + se encuentran engrosadas y retraídas (C). En estos animales el

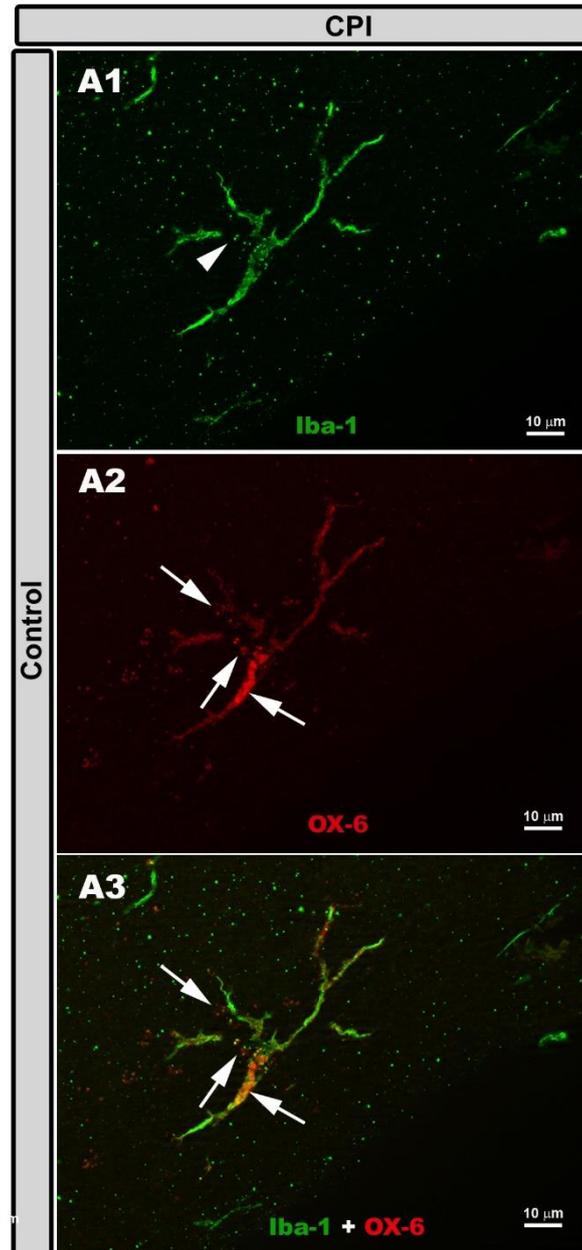
mosaico deja de ser homogéneo, existiendo zonas de agrupación celular (flechas) en forma circular (D) o formando barreras (E, G) existiendo áreas sin células (\*). En las zonas de agrupamiento se observan células de aspecto ameboideo con gran retracción de las prolongaciones (cabeza de flecha hueca) y células de disposición vertical (cabeza de flecha blanca), éstas últimas también se encuentran en otras zonas retinianas formando grandes extensiones (H). Capa plexiforme interna (CPI).



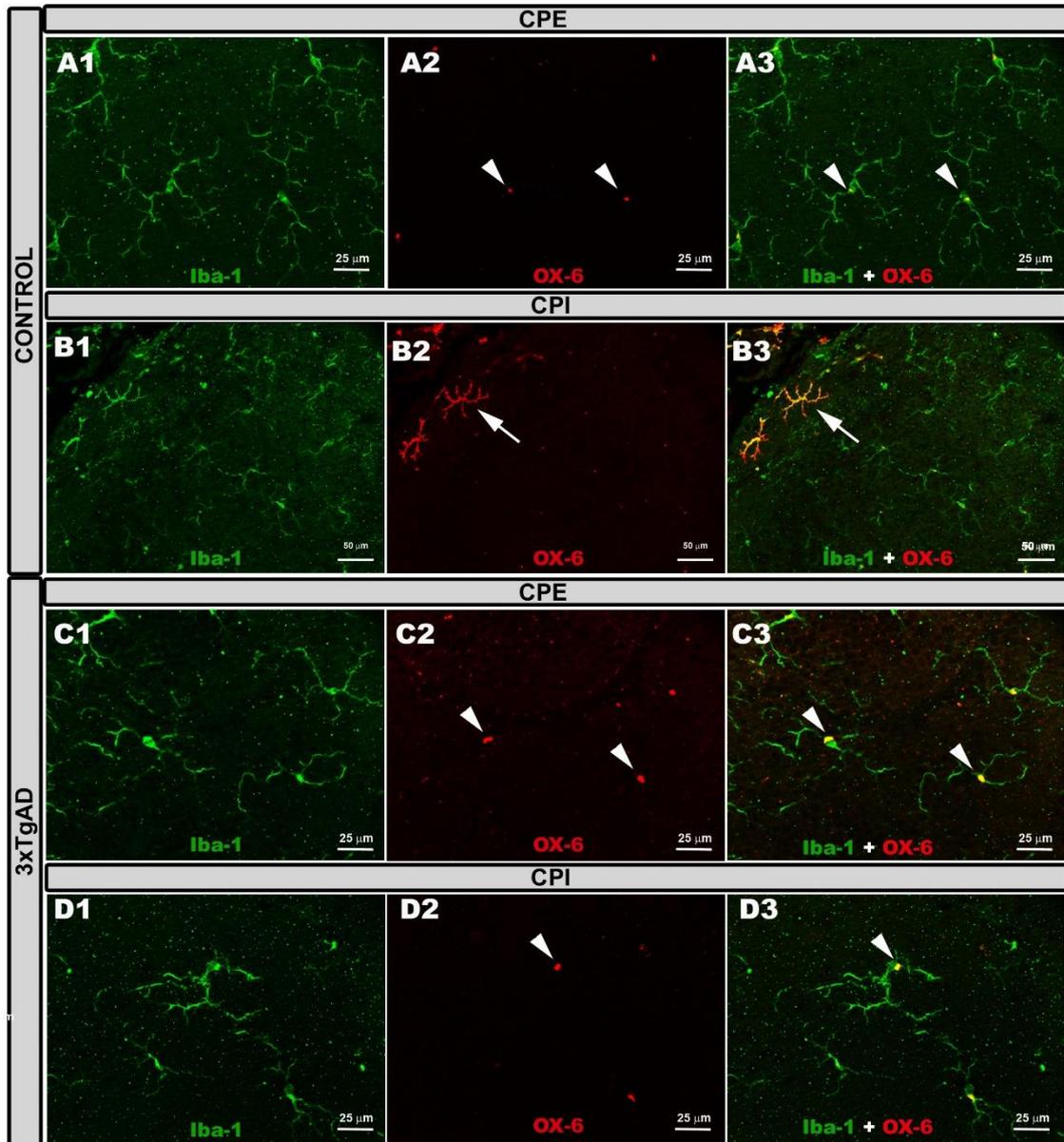
**Figura 56. Células Iba-1+ de la capa plexiforme interna- capa plexiforme externa. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1. Montaje plano de retina. Análisis en el plano XYZ con la herramienta 3D view del axiovision. En algunas zonas de la retina de los animales 3xTgAD (B) se observan células Iba-1 (flechas) que se disponen de forma perpendicular a la superficie retiniana ocupando la capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI) y capa plexiforme externa (CPE). Estas células no se ven en el grupo control (A).**



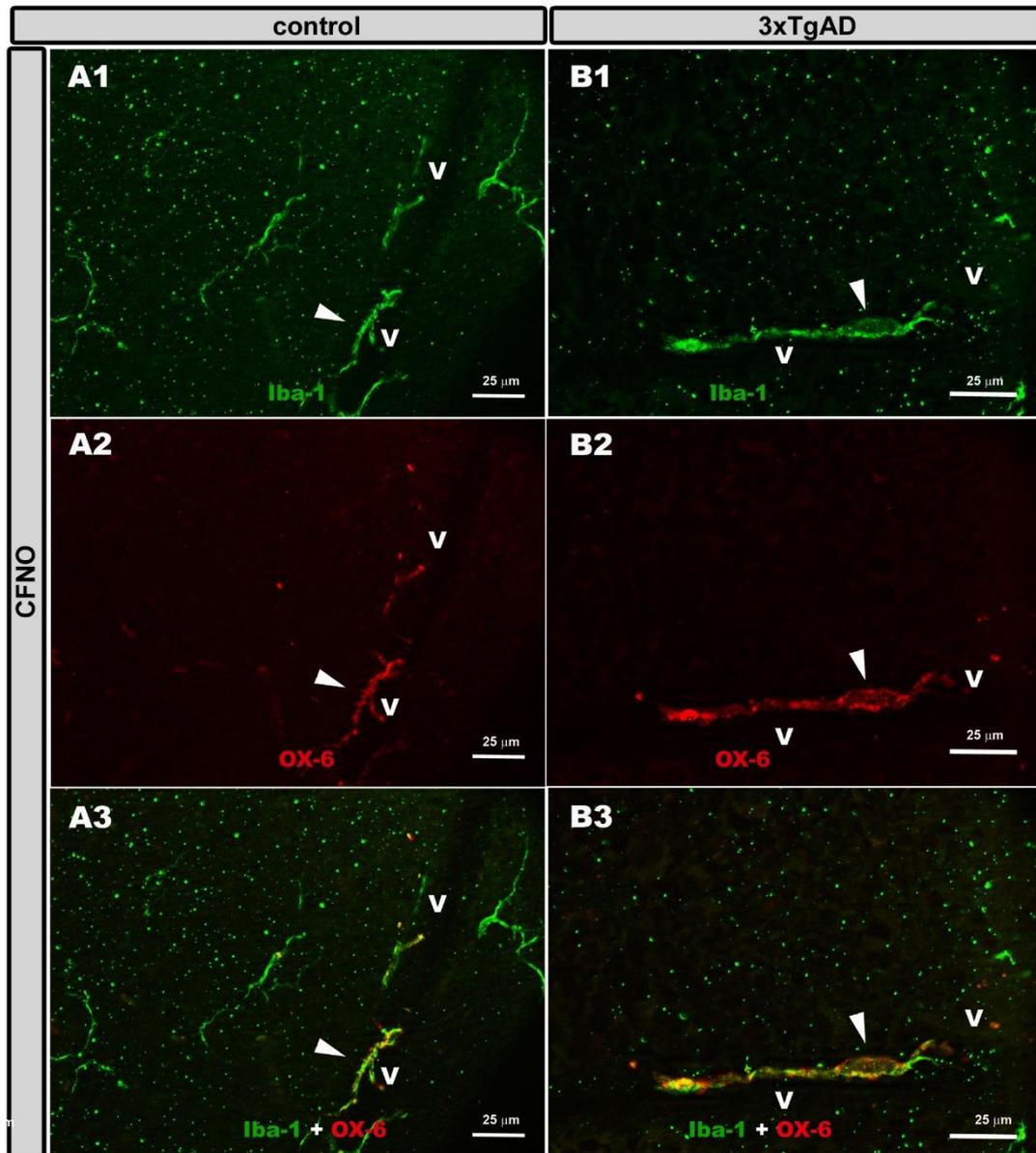
**Figura 57. Células Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1. Montaje plano de retina.** En los animales control (A, B) se observan células Iba-1 + de aspecto ramificado (A) (flecha) que en ocasiones se disponen sobre los vasos (v) y células perivasculares Iba-1 + (B) (cabeza de flecha) con apariencia alargada, bipolar y con escasas ramificaciones, situadas siempre sobre las paredes de los vasos (v). En los animales 3xTgAD tanto las células Iba-1 + ramificadas (C) (flecha) como las perivasculares (D) (cabeza de flecha) presentan engrosamiento del soma y retracción de las prolongaciones. Capa de fibras del nervio óptico (CFNO).



**Figura 58. Células Iba-1+ y OX-6 + de la capa plexiforme interna. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1 y anti-OX-6. Montaje plano de retina con ApoTome.** En la CPI de la retina se observan células Iba-1+ (A1) (cabeza de flecha) con soma y prolongaciones gruesas semejantes a las células dendríticas y localizadas en las zonas próximas al disco óptico y en la retina periférica. Estas células son intensamente OX-6 + en toda su extensión (A2, A3). En el soma se pueden observar acúmulos de microvesículas OX-6 + (A2, A3) (flechas) las cuales parecen salir hacia el espacio extracelular. Esto también se observa con el marcaje Iba-1+ (A1, A3) (cabeza de flecha). Capa plexiforme interna (CPI).



**Figura 59. Células Iba-1+ y OX-6+ de las capas plexiformes interna y externa. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1 y anti-OX-6. Montaje plano de retina con ApoTome.** En los animales control en las células Iba-1+ (CPE: A1-A3; CPI: B1-B3) se observa una expresión constitutiva de OX-6 en forma de acúmulo solo en el soma celular (cabeza de flecha) (A2-A3; B2-B3), excepto en las células de aspecto dendritiforme, en la que la expresión de OX-6 se produce en toda la célula (B2-B3) (flecha). En los animales 3xTgAD la expresión de OX-6 (cabeza de flecha) es igual a la observada en los animales control tanto en la CPE (C1-C3) como en la CPI (D1-D3). Capa plexiforme externa (CPE); Capa plexiforme interna (CPI).



**Figura 60. Células Iba-1+ y OX-6 + perivasculares de la capa de fibras del nervio óptico. Inmunofluorescencia con anti-Iba-1 y anti-OX-6. Montaje plano de retina con ApoTome. Tanto en los animales control (A1-A3) como en los animales 3xTgAD (B1-B3) las células perivasculares Iba-1 + (A1, B1) (cabeza de flecha) expresan OX-6 de forma intensa tanto en el soma como en las prolongaciones (A2-A3; B2-B3) (cabeza de flecha). Capa de fibras del nervio óptico (CFNO); vaso (V).**

### 6.7.3 Análisis cuantitativo de las retinas de ratones 3xTgAD y los controles de edad.

Para el análisis cuantitativo de las retinas de los ratones 3xTgAD se utilizaron 8 retinas de 8 ratones de 16 meses de edad, que correspondían a ratones con una EA sintomática. Los resultados se compararon con 8 retinas de 8 ratones C57BL/6 no transgénicos (controles) de la misma edad. Como se dijo con anterioridad dada la proximidad de la CFN-CCG y la CPI en estos ratones fue imposible realizar una correcta separación de estas capas. Por este motivo, y para llevar a cabo un análisis estadístico más correcto de los tejidos se decidió dividir las poblaciones analizadas en dos plexos diferentes CPE y CCI (CPI+CCG+CFN).

#### 6.7.3.1 Número de células Iba-1+ en los ratones 3xTgAD y controles.

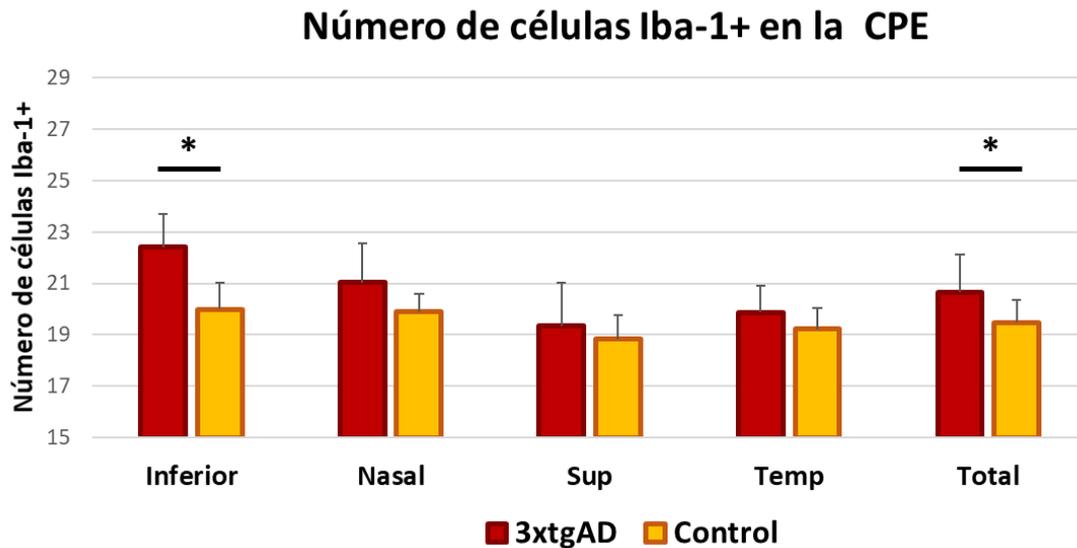
##### *Número de células Iba-1+ en la CPE.*

En la CPE, el conteo manual de las células Iba-1+ en las muestras de ratones 3xTgAD en la CPE mostró un aumento significativo de número de células en la media del conteo total de toda la retina ( $20,67 \pm 2,92$ , 3xTgAD vs  $19,49 \pm 1,72$ , control) ( $p < 0,05$ ) y en el sector inferior de la retina respecto a los animales controles ( $22,42 \pm 2,58$ , 3xTgAD vs  $20,00 \pm 2,02$ , control) ( $p < 0,05$ ) y (Tabla 66, Gráfica 60).

**Tabla 66. Contaje del número de células Iba-1+ en la CPE de los ratones 3xTgAD y controles.**

	CPE		
	3xTgAD	Control	P-valor
Inferior	$22,42 \pm 2,58$	$20,00 \pm 2,02$	<b>0,039*</b>
Nasal	$21,04 \pm 3,02$	$19,89 \pm 1,42$	0,314
Superior	$19,33 \pm 3,39$	$18,83 \pm 1,89$	0,682
Temporal	$19,88 \pm 2,05$	$19,22 \pm 1,66$	0,514
<b>Total</b>	$20,67 \pm 2,92$	$19,49 \pm 1,72$	<b>0,035*</b>

Media  $\pm$  DE; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  Test de Mann-Whitney  
(CPE: capa plexiforme externa; DE: desviación estándar)



**Gráfica 60. Número de células Iba-1+ en las CPE en los ratones 3xTgAD y los controles.**  
\*p<0.05; \*\*p<0.01; Test de Mann-Whitney.

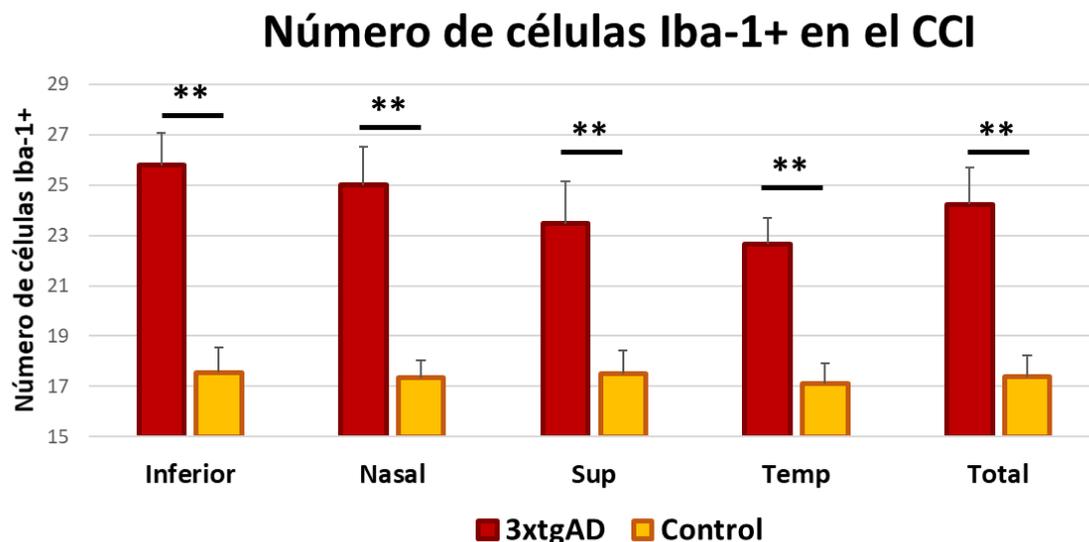
#### *Número de células Iba-1+ en el complejo CI.*

En el CCI, en todos los sectores analizados se encontró un aumento significativo en el número de células Iba-1+ en los ratones 3xTgAD respecto a los controles: inferior (25,79 ± 2,33, 3xTgAD vs 17,56 ± 1,66, control) (p<0,001), nasal (25,00 ± 3,08, 3xTgAD vs 17,33 ± 1,43, control) (p<0,001), superior (23,46 ± 2,58, 3xTgAD vs 17,50 ± 1,64, control) (p<0,001), y temporal (22,67 ± 1,17, 3xTgAD vs 17,11 ± 1,20, control) (p<0,001), así como en el promedio de toda la retina (24,23 ± 2,60, 3xTgAD vs 17,38 ± 1,53, control) (p<0,001). En los ratones 3xTgAD el mayor incremento de células Iba-1+ se observó en los sectores inferior y nasal (Tabla 67, Gráfica 61).

**Tabla 67. Contaje del número de células Iba-1+ en el CCI de los ratones 3xTgAD y controles.**

CCI			
	3xTgAD	Control	P-valor
Inferior	25,79 ± 2,33	17,56 ± 1,66	<0,001**
Nasal	25,00 ± 3,08	17,33 ± 1,43	<0,001**
Superior	23,46 ± 2,58	17,50 ± 1,64	<0,001**
Temporal	22,67 ± 1,17	17,11 ± 1,20	<0,001**
Total	24,23 ± 2,60	17,38 ± 1,53	<0,001**

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(CCI: complejo capas internas; DE: desviación estándar)



Gráfica 61. Número de células Iba-1+ en las CCI en los ratones 3xTgAD y los controles.  
\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; Test de Mann-Whitney.

#### 6.7.3.2 Área del soma Iba-1+ en los ratones 3xTgAD y controles.

##### *Área del soma Iba-1+ en la CPE.*

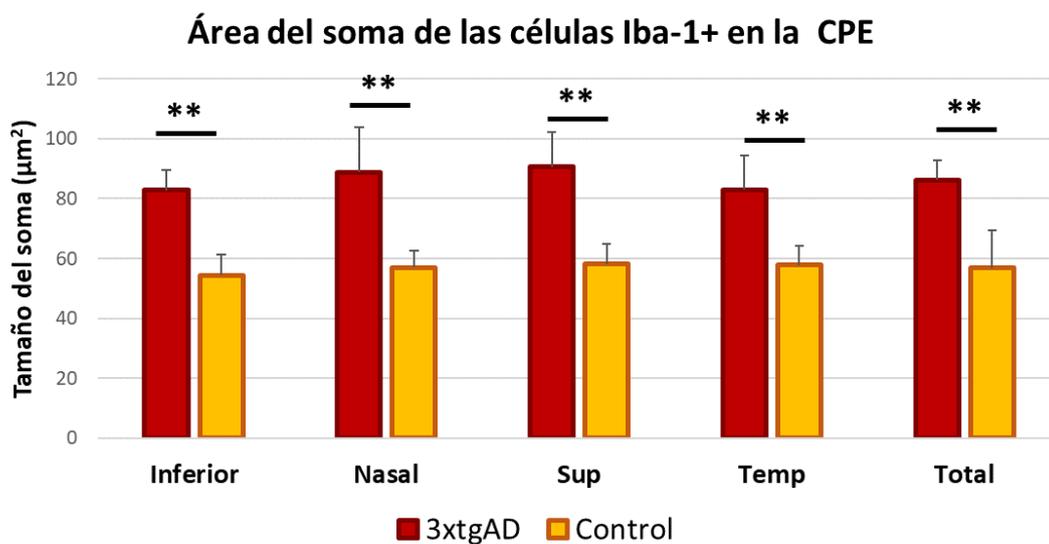
En la CPE el área del tamaño del soma de las células Iba-1+ mostraba una diferencia significativa en todos los sectores de la retina: inferior ( $82,82 \pm 13,82$ , 3xTgAD vs  $54,48 \pm 13,82$ , control) ( $p < 0,001$ ), nasal ( $88,78 \pm 30,00$ , 3xTgAD vs  $56,97 \pm 11,55$ , control) ( $p < 0,001$ ), superior ( $90,72 \pm 23,30$ , 3xTgAD vs  $58,10 \pm 13,89$ , control) ( $p < 0,001$ ), y temporal ( $83,01 \pm 22,85$ , 3xTgAD vs  $57,82 \pm 13,15$ , control) ( $p < 0,001$ ) así como en el promedio total de la retina ( $86,33 \pm 13,12$ , 3xTgAD vs  $56,84 \pm 25,46$ , control) ( $p < 0,001$ ) en los animales 3xTgAD respecto a los controles (Tabla 68, Gráfica 62).

En los animales 3xTgAD el mayor área del tamaño del soma en la CPE se obtuvo en los sectores nasal y superior (Tabla 68, Gráfica 62).

**Tabla 68. Área del soma Iba-1+ en la CPE de los ratones 3xTgAD y controles.**

	CPE		P-valor
	3xTgAD	Control	
Inferior	82,82 ± 13,82	54,48 ± 13,82	<0,001**
Nasal	88,78 ± 30,00	56,97 ± 11,55	<0,001**
Superior	90,72 ± 23,30	58,10 ± 13,89	<0,001**
Temporal	83,01 ± 22,85	57,82 ± 13,15	<0,001**
<b>Total</b>	<b>86,33 ± 13,12</b>	<b>56,84 ± 25,46</b>	<b>&lt;0,001**</b>

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(CPE: capa plexiforme externa; DE: desviación estándar)



**Gráfica 62. Área del soma Iba-1+ en las CPE en los ratones 3xTgAD y los controles.**  
\*p<0.05; \*\*p<0.01; Test de Mann-Whitney.

**Área del soma Iba-1+ en el CCI.**

En el CCI los valores del área del tamaño del soma de las células Iba-1+ mostraba una diferencia significativa en todos los sectores de la retina: inferior (80,26 ± 20,36, 3xTgAD vs 46,67 ± 11,52, control) (p<0,001), nasal (84,40 ± 21,80, 3xTgAD vs 48,20 ± 9,78, control) (p<0,001), superior (84,30 ± 17,67, 3xTgAD vs 54,44 ± 12,13, control) (p<0,001), y temporal (79,11 ± 20,49, 3xTgAD vs 50,40 ± 10,54, control) (p<0,001), así como en el promedio total de la retina (82,03 ± 20,17, 3xTgAD vs 49,96 ± 11,35, control) (p<0,001) en los animales 3xTgAD respecto a los controles (Tabla 69, Gráfica 63).

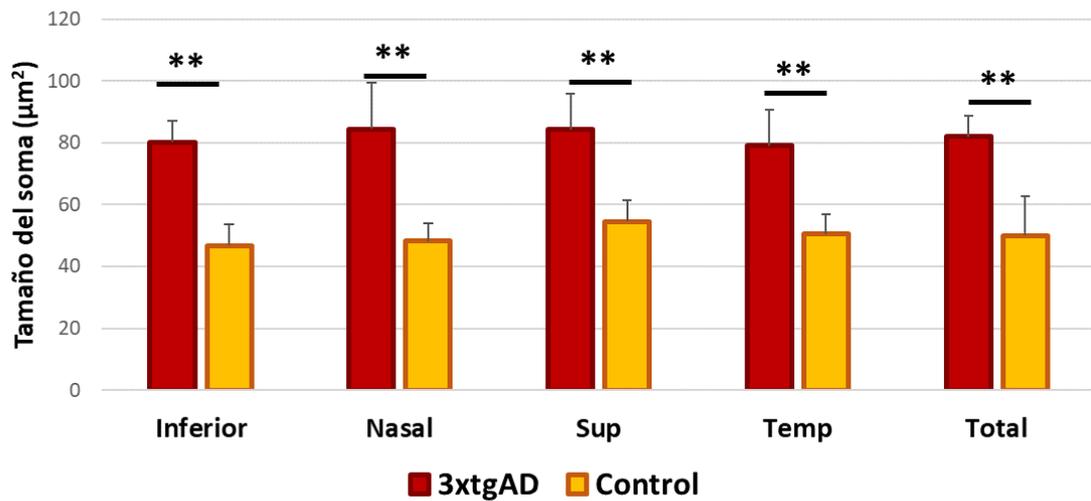
En el grupo 3xTgAD el mayor tamaño del área del soma en el CCI se obtuvo en las áreas nasal y superior (Tabla 69, Gráfica 63).

Tabla 69. Área del soma Iba-1+ en el CCI de los ratones 3xTgAD y controles.

CCI			
	3xTgAD	Control	P-valor
Inferior	80,26 ± 20,36	46,67 ± 11,52	<0,001**
Nasal	84,40 ± 21,80	48,20 ± 9,78	<0,001**
Superior	84,30 ± 17,67	54,44 ± 12,13	<0,001**
Temporal	79,11 ± 20,49	50,40 ± 10,54	<0,001**
Total	82,03 ± 20,17	49,96 ± 11,35	<0,001**

Media ± DE; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 Test de Mann-Whitney  
(CCI: complejo capas internas; DE: desviación estándar)

### Área del soma de las células Iba-1+ en el CCI



Gráfica 63. Área del soma Iba-1+ en las CCI en los ratones 3xTgAD y los controles.

\*p&lt;0.05; \*\*p&lt;0.01; Test de Mann-Whitney.

# 7. DISCUSIÓN



## 7. DISCUSIÓN

El Alzheimer, como todas las demás patologías neurodegenerativas, carecen de biomarcadores objetivos específicos de la enfermedad<sup>497</sup>. Como parte del SNC, la retina o porción neural del ojo comparte muchas características con el cerebro anatómicas y fisiológicas, incluido su origen embrionario. Su ubicación periférica en el SNC proporciona una forma accesible y no invasiva de examinar la patología cerebral<sup>236,498</sup>. Debido a estas características los test visuales y estructurales usados en la consulta rutinaria de oftalmología podrían ser usados como una herramienta útil para la ayuda del diagnóstico y seguimiento de las patologías neurodegenerativas.

En el presente estudio se han analizado los valores de AV, SC, percepción del color, TDP, OCT macular y peripapilar y oxihemoglobina de la cabeza del nervio óptico en pacientes con EA leve y EA moderada y comparado con sujetos sanos de la misma edad. Además se estudió el espesor coroideo y la zona avascular foveal. Se han analizado la sensibilidad de las diferentes pruebas como biomarcadores de la EA y las correlaciones de los resultados de estas pruebas con el grado de MMSE, también se correlacionó la SC con las medidas de retina proporcionadas por la OCT.

En este estudio se ha realizado también el análisis de la microglía en un modelo animal de Alzheimer (3xTgAD) a los 16 meses de edad para conocer el estado de activación de la retina en estos animales comparados con otros animales controles no transgénicos de la misma edad.

### 7.1 Selección de la muestra de pacientes a estudio.

Uno de los puntos relevantes del presente estudio se refiere a la cuidada selección de la muestra participante. La inclusión de pacientes al estudio comenzó en octubre de 2012 y terminó en marzo de 2018.

Ninguno de los 3 grupos del estudio presentaba anomalías o patología oftalmológica que pudiera enmascarar alguno de los resultados obtenidos. Tanto el grupo con EA leve como el grupo con EA moderada siguieron un estricto protocolo de inclusión a nivel de memoria. Para llegar al diagnóstico y estadio de la EA se realizó una extensa anamnesis,

tanto con el paciente como con los familiares, exámenes físico y neurológico, evaluación cognitiva, funcional y de conducta, pruebas de neuroimagen y serología.

Además de los estrictos criterios de inclusión, fue especialmente difícil el que los pacientes acudieran a la consulta para la revisión oftalmológica. Gran parte de los problemas residían en que estos pacientes no pueden venir solos (debido a su déficit cognitivo) y dependen de un cuidador, el cual muchas veces es un familiar, que debido a la *sobrecarga del cuidador* no quiere participar en un estudio de este tipo. En un alto porcentaje de casos, después de acordar una cita con estos pacientes, o no se presentaban a la consulta, o llamaban para anularla.

A pesar de todas las dificultades de reclutamiento la muestra de pacientes con EA era muy homogénea en términos de edad, estadio de enfermedad, etnia y nivel educativo. Los pacientes del grupo de EA leve tenían altos valores de MMSE con una media de  $25,18 \pm 3,80$ , mayor que cualquier valor encontrado en la literatura <sup>513,537,536,511,538</sup>. Esto implica que todos los pacientes con EA leve incluidos en este estudio se encontraban en una etapa muy temprana de la enfermedad. Los pacientes con EA moderada presentaban valores de MMSE de  $19,89 \pm 2,76$ , lo que nos permitía que estos pacientes entendieran las instrucciones para realizar los test de una manera correcta. A pesar de esto, el examinador estuvo constantemente refrescando las instrucciones de cada test para evitar que el paciente tuviera fallos debido a una pérdida de memoria.

Las pruebas realizadas fueron elegidas de manera minuciosa teniendo en cuenta el declive cognitivo de los pacientes y el posible déficit nominativo. Los test de AV se pasaban aislando las letras, ya que se ha demostrado que de esta manera los pacientes con demencia presentan mejores valores. Para la medida de la SC se eligió el CSV-1000E, donde los pacientes no necesitan verbalizar el resultado y los resultados son más independientes de los valores de AV <sup>537</sup>. Para el análisis de la percepción del color se eligió el test Roth 28-hue por no ser necesaria la verbalización. En el análisis de las medidas de la retina mediante OCT y las medidas de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico, la colaboración del paciente era mínima y solo se requería que el paciente mantuviera el ojo abierto y la mirada fija en el estímulo de fijación.

## 7.2 Cambios en los test psicofísicos en los pacientes con EA.

La EA es una patología que se caracteriza por la aparición patológica de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral, incluidas varias áreas que están implicadas en muchas etapas del procesamiento de la información <sup>499</sup>. La distribución de los ovillos neurofibrilares está correlacionada con el desarrollo de los síntomas clínicos ya que los ovillos neurofibrilares aparecen inicialmente en la corteza entorrinal (área 28 de Brodmann) del lóbulo temporal ventromedial, la cual está involucrada en la memoria de reconocimiento <sup>438,500-502</sup>. Los estudios neuroanatómicos en mamíferos superiores revelan que la corteza entorrinal da lugar a axones que interconectan la formación del hipocampo bidireccionalmente con el resto de la corteza. Su destrucción en la EA podría desempeñar un papel prominente en los déficits de memoria y reconocimiento que anuncian la aparición de la EA y que la caracterizan a lo largo de su curso <sup>500</sup>. Así mismo, incluso en las etapas más precoces de la EA, los pacientes presentan dificultades para realizar tareas que requieren la visión, como es reconocer objetos o caras <sup>503,504</sup>, dificultad en la lectura <sup>505</sup> o déficits en la percepción del espacio <sup>506</sup> a pesar de presentar valores de AV y campos visuales relativamente normales.

Realizar pruebas psicofísicas en una patología como la EA puede ser un gran reto, debido a que la mayor parte de estas pruebas requieren una comprensión y una memorización del funcionamiento de la prueba, ambos requisitos necesarios para que el paciente la realice de forma correcta. Por lo tanto, sin una vigilancia por parte de un examinador experimentado, anomalías detectadas en las pruebas, en realidad podrían ser el resultado de una falta de cumplimiento de la tarea y no de un déficit visual.

### 7.2.1 Disminución de la agudeza visual.

Los valores de AV de los tres grupos presentados en este estudio se encuentran dentro del rango de la normalidad en el rango de edad de los pacientes <sup>507</sup>. A pesar de esto, la AV en nuestros pacientes con EA leve y EA moderada mostraba una disminución significativa en los valores respecto al grupo control. La AV mostró una correlación significativa directa con el MMSE mostrando que la AV disminuye cuando la capacidad cognitiva disminuye. El valor predictivo de la AV era significativo con un valor del 71,4%.

El examen de la AV en los pacientes con EA ha mostrado bastante controversia a lo largo de las últimas décadas. A pesar de que algunos autores no encuentran diferencias significativas de AV en los pacientes con EA <sup>508-516</sup>, otros autores no solo encuentran una pérdida de AV <sup>517,518</sup>, sino que también lo asocian, en algunos casos, con alucinaciones visuales cuando la AV está bastante deteriorada <sup>519-521</sup>. Hay estudios que cifran que el 13% de los pacientes con EA experimentan estas alucinaciones <sup>522,523</sup>. De esta forma, incluso ha sido descrita una correlación del empeoramiento de la AV con el avance de la EA <sup>524</sup> así como una disminución de la AV en condiciones de baja luminosidad en otros pacientes de EA <sup>513</sup>. Este declive de la AV se ha observado también en ratas transgénicas de EA (TgF344-AD) mediante la técnica de la respuesta optocinética <sup>322</sup>.

La degeneración de los axones de las CGR en la EA puede comprometer selectivamente a las CGR grandes <sup>406</sup> que probablemente constituyen la proyección predominante al colículo superior y a las capas magnocelulares del NGL. Es bien conocido, por estudios en animales, que el colículo superior juega un papel principal en el control de los movimientos extraoculares <sup>525</sup>. Del mismo modo, en humanos con EA, los axones de las CGR correspondientes a la vía parvocelular también se han visto disminuidas en el NO <sup>407</sup>. Además, en humano se han identificado la presencia de placas de A $\beta$  más abundantes en las capas parvocelulares que en las magnocelulares; así como la presencia de anillos neurofibrilares <sup>420,421</sup>. Estas células parvocelulares tienen campos receptores pequeños que se traducen en altas resoluciones espaciales <sup>526</sup>.

Todas estas alteraciones, la falta de control de los movimientos extraoculares junto con una alteración de la vía parvocelular (detalle) es lo que puede estar ocasionando la disminución de la AV en nuestros pacientes con EA, dando comienzo en estadios muy precoces, como refleja la bajada significativa de AV en nuestros pacientes con EA leve. En nuestro estudio, los pacientes con EA moderada presentan un descenso de AV respecto al control, de forma similar a los pacientes con EA leve. Estos pacientes con EA moderada no presentan diferencias significativas respecto al grupo de EA leve a pesar de la pérdida de neuronas en la retina. Esto podría ser debido a fenómenos de adaptación y compensación neural que se ponen de manifiesto tras la disfunción o muerte de las neuronas implicadas en el proceso visual. Esta adaptación puede establecer el estado operativo de las neuronas muy bajo para maximizar la transmisión de información <sup>527</sup>.

### 7.2.2 Bajada de todas las frecuencias en la sensibilidad al contraste.

Encontramos que, en comparación con los controles, la SC en los pacientes con EA leve y EA moderada estaba significativamente reducida en todas las frecuencias espaciales, siendo la reducción más pronunciada en las frecuencias espaciales más altas. Específicamente en la frecuencia de 18 cpg, donde la reducción era de un -40,67% de sensibilidad en los pacientes con EA leve y de un -36,98% en los pacientes con EA moderada, ambos comparados con los controles. En ambos grupos con EA, se encontró que conforme aumentaba la frecuencia espacial de estudio, mayor era la pérdida de SC respecto al grupo control.

En la vía visual las frecuencias espaciales altas se registran en las células parvocelulares de la retina, que están más concentradas en el área macular. Las frecuencias espaciales bajas son registradas por las células magnocelulares distribuidas por toda la retina <sup>216</sup>. Nuestros resultados en el test de SC, donde hay una disminución significativa en los grupos de EA respecto al grupo control en todas las frecuencias espaciales, sugieren que los pacientes con EA sufren un deterioro de la función tanto de las células parvocelulares como de las magnocelulares, siendo las células parvocelulares las más afectadas (que es donde se encuentra una mayor bajada en la SC). Estos hallazgos explican las correlaciones entre las frecuencias espaciales y parámetros de OCT. Estas correlaciones son significativas en todas las frecuencias espaciales con los grosores de la fovea y áreas maculares. Correlacionando directamente el descenso de las frecuencias espaciales en el área macular con los descensos de espesor de la retina en mácula.

Por el contrario, la disminución significativa de SC para las frecuencias espaciales más bajas encontradas en pacientes con EA no fue paralela a los hallazgos de OCT en la región peripapilar en el hecho de que la disminución del espesor de la retina encontrada no tuvo una correlación en el área peripapilar tan fuerte como en la mácula. Estos hallazgos nos permiten postular que, en la EA leve, la SC parece detectar el deterioro de la vía magnocelular antes que la OCT.

Por otro lado, al analizar la SC en pacientes con EA moderada no presentaban cambios significativos en los registros de la SC respecto al grupo de EA leve. Esto nos muestra que la SC sufre un brusco descenso en todas las frecuencias espaciales cuando la enfermedad debuta y esta pérdida se estabiliza en el avance de la enfermedad quizás, tal

y como ocurría con la AV, por fenómenos adaptativos y de compensación neural para maximizar la transmisión de información <sup>527</sup>.

Durante varias décadas, se ha puesto el foco en el estudio de la SC en los pacientes con EA. Estos estudios muestran mucha controversia entre sí. A pesar de que en dos estudios no se detectaron diferencias entre los pacientes con EA y los controles <sup>508,515</sup>, la mayoría de los estudios, al igual que ocurre en nuestro trabajo, encontraron que la función de SC estaba alterada en los pacientes con EA. En algunos casos, como en nuestros pacientes, la SC se redujo en todas las frecuencias espaciales examinadas <sup>510,513,517,528-533</sup>, siendo coincidentes con los resultados de nuestro estudio, que el mayor declive correspondió a las frecuencias espaciales altas <sup>528,530,534</sup>. Por otro lado, contrario a nuestros resultados, otros autores mostraron que las frecuencias espaciales más bajas fueron las más afectadas <sup>511,512,516,535,536</sup>.

Las posibles razones para tales discrepancias, pueden radicar en las diferencias de la muestra (estadio de los pacientes con EA), así como en el test utilizado para examinar la SC <sup>537</sup>. Así, el test de Regan, con letras de bajo contraste, y el Vistech VCTS-6500 están influenciados por el valor de AV, mientras que en el test de Pelli-Robson y el test de Freiburg son independientes de la AV <sup>537</sup>. En el presente estudio, se usó el test CSV-1000E que se basa en la prueba Pelli-Robson y, por lo tanto, se puede suponer que no está influenciada por los valores de la AV.

Neargarder et al. mostró también una disminución de la SC en los pacientes con EA acorde a nuestros resultados <sup>537</sup>. A pesar de esto, los resultados podrían haber sido influenciados por la peor AV de los pacientes, la prueba seleccionada y la gran variabilidad de estadio de la EA con valores de MMSE comprendidos entre 6 y 26. Mientras tanto el estudio de Gilmore et al. <sup>538</sup> incluyó solo a los participantes que proporcionaron una respuesta válida en todas las frecuencias espaciales, eliminando a los pacientes que no pudieron discriminar todas las frecuencias espaciales examinadas, pudiendo tener una sobreestimación en alguno de los valores obtenidos

Polo et al., estudiaron la correlación de la SC con los cambios morfológicos de retina encontrando en los pacientes con EA que los valores del test de SC, medido con CSV-1000E, estaban asociados significativamente con los cambios estructurales en la retina medidos con la OCT (especialmente con el área macular). Estos resultados concuerdan con los nuestros donde se demuestra que la mayor correlación de SC y estructura se da

en el área macular. A pesar de que estos resultados son concordantes Polo et al. usa el mismo test de SC (CSV-1000E) pero no la misma OCT (Cirrus), por lo que la segmentación de la retina que proporciona el software de este estudio difiere del nuestro<sup>516</sup>.

Apoyándonos en estos datos, parece que las frecuencias espaciales de 12 y 18 cpd son las más afectadas en la EA y estas alteraciones ya aparecen en las primeras etapas de la enfermedad. De acuerdo con nuestros valores de ROC, las frecuencias espaciales más sensibles fueron 18 cpd (83,3%), seguidas de las 12 cpd (82,8%). Estos resultados nos muestran que la SC, específicamente las frecuencias más altas tienen el mejor valor predictivo de todas las pruebas psicofísicas analizadas, esto es apoyado también por el estudio de Marmor et al. donde también se encuentra que la SC es una herramienta más sensible que la AV para identificar empeoramiento subclínico de la función visual<sup>539</sup>. En otro estudio longitudinal también confirmaron que el test de SC era específico para la detección preclínica de la EA<sup>540</sup>.

El análisis de correlaciones nos indica una fuerte significación estadística entre todas las frecuencias espaciales y el test de MMSE, siendo una prueba predictiva del deterioro cognitivo del paciente con demencia tipo Alzheimer.

En un trabajo comparando 35 pacientes con EA y 35 controles se mostró que las deficiencias en la SC en pacientes con EA son las responsables en gran parte de las diferencias en el rendimiento de los test clásicos de screening de esta enfermedad, como por ejemplo en la identificación de letras, la lectura de palabras, la denominación de dibujos, y la discriminación de caras<sup>536</sup>.

El papel de la SC se subestima a menudo, siendo una función visual muy importante, incluso hay estudios que demuestran que la pérdida de SC es el mejor predictor de la capacidad de los ancianos para realizar actividades de la vida cotidiana<sup>537,541</sup>, así como que puede predecir el riesgo de caída de éstos<sup>542</sup>. Debido a que en pacientes con EA la frecuencia de las caídas es elevada<sup>543</sup>, es importante examinar esta función visual y ajustar el entorno de los pacientes con el fin de evitar caídas y por lo tanto mejorar su calidad de vida<sup>277</sup>, especialmente cuando las primeras frecuencias espaciales afectadas, según nuestros datos, parecen ser las correspondientes a la función macular, responsable de la visión central, que es imprescindible para la realización de la mayoría de las tareas cotidianas.

### 7.2.3 Empeoramiento de la visión cromática.

Al evaluar la percepción del color en nuestros pacientes no se encontró discromatopsia en ninguno de los 3 grupos.

Al analizar el número total de errores inespecíficos realizados por los pacientes se encontró que existía un aumento significativo entre los pacientes con EA moderada comparado tanto con los pacientes con EA leve (77,34%) y los controles (132,26%).

En el análisis de los errores inespecíficos en la región del tritán (azul) el aumento significativo de fallos se encuentra entre los pacientes con EA leve (63,98%) y EA moderada (144,38%) respecto al grupo control; así como entre el grupo EA leve y EA moderada (49,04%).

Los resultados de los errores inespecíficos en la región del deután (verde) revelan que también había diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, los pacientes con EA leve presentaban un 59,85% más errores, mientras que los pacientes con EA moderada se incrementaba un 158,49% más que los controles. Entre los grupos con la patología los pacientes con EA moderada mostraban un incremento de 61,71% más de errores que los pacientes con EA leve.

A diferencia de los sujetos con pérdida de la visión del color debido a lesiones corticales focales o lesiones de la retina, los pacientes con EA raramente se quejan de déficits de visión del color. Las pruebas de color en pacientes con EA son controvertidas debido al déficit nominativo que presentan estos pacientes y, por lo tanto, podrían tener problemas para verbalizar los colores o nominar los números y las formas que se ven en los test.

La prueba de color utilizada en el presente estudio no requiere nominación, aunque debe tenerse en cuenta que el rendimiento de la prueba depende de la memoria de los pacientes para recordar las instrucciones y, por lo tanto, para una correcta ejecución, el examinador debe repetir las instrucciones durante la prueba cuando sea necesario.

Este aumento en el número de fallos inespecíficos en las diferentes regiones examinadas nos muestra una peor percepción en ligeros cambios de tonalidad del color en los pacientes con EA leve y EA moderada respecto al grupo control. A diferencia de nuestro trabajo, algunos estudios que utilizan las pruebas de *Farnsworth* e *Ishihara* no encontraron diferencias en la percepción del color entre los pacientes con EA y el grupo

de control <sup>531,544,545</sup>. Sin embargo en un trabajo más reciente usando nuestro test (*Farnsworth 28-hue*) se detectaron diferencias significativas entre pacientes con EA moderada y controles <sup>516</sup>, lo mismo que ocurre en nuestros pacientes al analizar los errores en los ejes tritán y deután, donde también existen diferencias significativas en la percepción del color en estos ejes entre los pacientes con EA moderada con respecto al control. Además, en nuestro trabajo los pacientes con EA leve también presentaron diferencias significativas en la percepción del color en los ejes tritán y deután con respecto al control. Este hecho y los resultados obtenidos en las curvas ROC, con valores predictivos entre un 70-75%, nos hace pensar que este tipo de examen de la visión cromática podría constituir un biomarcador del diagnóstico precoz de la EA.

En el análisis de correlaciones de los errores inespecíficos de la percepción del color con la puntuación del MMSE nos muestra que tanto los errores totales, como los errores inespecíficos de la región de tritán y deután se correlacionan de forma inversa con la puntuación del MMSE de forma significativa, esto implica que a menor MMSE mayor número de fallos en la realización del *Farnsworth 28-hue*.

Hay otros estudios que corroboran estos resultados incluso usando otros test, como fueron los estudios que utilizaron el *City University Color Test* donde encontraron defectos en el eje tritán detectando una correlación con el grado de demencia <sup>228,229,511,546</sup>; mientras otros autores encontraron que los errores eran más numerosos en la región del deután <sup>547</sup>. Estos datos son consistentes con los resultados detectados por otros autores utilizando la prueba de *Ishihara* <sup>517</sup> y la *City University Color* <sup>546,548</sup>.

Pache et al., utilizando la prueba de *Ishihara* y la *PV-16*, encontraron que los errores inespecíficos no asociados con un eje específico eran más prevalentes en pacientes con EA en comparación con los controles al igual que nuestros resultados; sin embargo, en este estudio este hallazgo no se correlacionó con la gravedad de la enfermedad <sup>549</sup>. Esta discrepancia entre los resultados de la visión de color en pacientes con EA pueden ser explicados por el uso de diferentes tests del análisis de la visión cromática aplicados, por lo que las comparaciones de los resultados son difíciles de interpretar. Un problema que presenta el test de *Ishihara* es la necesidad de identificar un patrón hecho de “piezas más pequeñas” que difieren en el color. Los pacientes con EA, uno de los síntomas que pueden experimentar es la simultagnosia (incapacidad para ver el todo de las partes), debido a una disfunción occipito-parietal bilateral, y por lo tanto, el test de *Ishihara* puede tener

un desempeño deficiente que no sea por una mala percepción cromática. Estos pacientes con simultagnosia, sin embargo, sí que desarrollan de una manera correcta, las pruebas correspondientes a la discriminación de tonos, como es el test de Farnsworth, las cuales implican colocar fichas de colores en orden de tonalidad <sup>550</sup>.

Salamone et al. postuló que el problema de la discriminación del color en pacientes con EA no es puramente cognitivo, sino que parece estar relacionado con el daño en las estructuras responsables de la percepción de los estímulos de color <sup>551</sup>. Esta afirmación es coherente con la evidencia de que las lesiones extraestriadas pueden dar lugar a déficits de color en la región del tritán <sup>511</sup> y que la corteza extraestriada se ve gravemente afectada en la EA. A pesar de que no se encontró una discromatopsia en nuestros pacientes con EA, el incremento de errores inespecíficos a lo largo del eje tritán y del eje deután, nos lleva a postular que además de la pérdida general de células M y P que parece estar teniendo lugar en nuestros pacientes, como se mencionó anteriormente, la vía Koniocelular también podría estar involucrada, dado que el espectro azul-amarillo está asociado con esta vía <sup>84</sup>. Las células ganglionares bistratificadas reciben señales de excitación *blue-on/yellow-off* de los conos S sensibles a la longitud de onda corta y proyectan esta información a las capas koniocelulares en el NGL <sup>552</sup>. Apoyando esto, en el mapa de campos receptores se ha visto que los pacientes con EA presentan una reducción significativa del área V4 más periférica, que es una región clave para el procesamiento de la visión del color <sup>553,554</sup>.

Por otro lado, también se ha descrito una degeneración en la capa de fotorreceptores en los pacientes con EA debido al descenso de la melatonina y de sus efectos antioxidantes que se produce en esta patología <sup>555</sup>. Esta degeneración no está restringida a un solo tipo de cono <sup>555,556</sup>, por lo que podría quizás explicar en parte la deficiencia a la visión del color adquirida por los pacientes con EA, que no está suscrita a ningún eje en específico. Esto podría sumarse a la degeneración de fotorreceptores inducida por depósitos de A $\beta$  en esta capa como se ha visto en modelos animales de EA <sup>285,557</sup> y más recientemente en humanos con una enfermedad neurodegenerativa (pacientes con EA y Parkinson), donde mediante OCT encontraron que la zona de los elipsoides al EPR estaba disminuido presentando una correlación directa con el grado de deterioro cognitivo <sup>558</sup>.

### 7.2.4 Empeoramiento de la integración visual.

Identificar un estímulo visual requiere no solo el análisis del input físico sino también algún contacto entre las representaciones neuronales del estímulo (incluyendo tanto los rasgos únicos como las relaciones de orden superior entre ellos) y los recuerdos que los receptores han acumulado a través de la vida de la experiencia con los objetos. Se supone que la identificación de un objeto surge de una interacción dinámica entre procesos sensoriales/físicos (procesamiento ascendente) y procesos cognitivos (procesamiento descendente). Una propiedad física importante de la imagen está representada por el contenido de la frecuencia espacial. La extracción de atributos visuales sensoriales sigue un esquema de procesamiento de grueso a fino, donde la frecuencia espacial baja representa la información global sobre la forma y orientación del estímulo mientras que la frecuencia espacial alta corresponde a la información de configuración y detalles finos <sup>499,559-563</sup>.

El test digital de percepción (TDP) es una prueba de percepción visual compleja sensible a las alteraciones perceptivas de la EA leve, que no está influenciada por la anomia. Este test está compuesto por 15 fotografías que están distorsionadas con el efecto geométrico de enlosado. Cada fotografía aparece en una lámina cuatro veces, cada una de ellas orientada en una posición diferente del espacio. La respuesta correcta sería la situación correcta de la fotografía en el espacio.

Rami et al. tras analizar a un grupo de 27 pacientes con EA leve frente a un grupo control de 86 personas observó diferencias significativas entre ambos grupos, mostrando estas diferencias una correlación significativa con el MMSE <sup>488</sup>.

Partiendo de esta suposición, dado que nuestros pacientes con EA leve y EA moderada fallaron de forma significativa un mayor número de láminas del TDP que los pacientes control, podríamos hipotetizar que esta disminución significativa de reconocimiento de las láminas del TDP podría estar causada por una disrupción del procesamiento de la información visual a nivel cerebral. Saumier et al., argumentaron que el deterioro de la identificación de objetos en la EA podría reflejar la alteración del mecanismo neuronal involucrado en los procesos visuo-espaciales y de toma de decisiones, que deberían activarse particularmente cuando los estímulos son incompletos o distorsionados, como los utilizados en el TDP <sup>564</sup>. Tal mecanismo tendría lugar en las regiones parietal y frontal, áreas en las que en los pacientes con EA no se lograría el reconocimiento inicial del

estímulo. Se cree que un buen candidato para mediar esta proyección rápida es la vía magnocelular que transmite información de la SC de baja frecuencia <sup>565</sup>, habiéndose demostrado que los axones magnocelulares que proyectan en el NGL se encuentran afectados incluso en estadios tempranos de la EA <sup>406</sup>. Esta hipótesis parece ser consistente también con los resultados obtenidos en el examen de la SC de nuestros pacientes, donde la pérdida fue evidente tanto en las frecuencias espaciales altas como en las bajas. Una pérdida de ganglionares de tipo magnocelular proporcionaría una entrada de la información visual deteriorada que, junto con la degeneración de las estructuras anatómicas responsables del procesamiento de mayor nivel, puede dar como resultado un bajo rendimiento de los pacientes con EA en pruebas de orientación, percepción espacial y reconocimiento como es el TDP.

El TDP mostraba una alta correlación significativa directa con la puntuación del MMSE y los valores de las curvas ROC mostraron un buen valor pronóstico con valores de 71,4%, por lo que se ha demostrado que el TDP es un buen test para el examen del procesamiento superior visual en los pacientes con EA y podría ser incluido como uno de los test usados en la batería de pruebas diagnósticas de demencia.

## **7.3 Pruebas estructurales de la retina.**

### **7.3.1 Tomografía de coherencia óptica.**

Como ya ha sido mencionado, la retina y el nervio óptico forman parte del SNC. Actualmente, la retina es considerada como un biomarcador indirecto del SNC o una *ventana al cerebro*, y puede ser analizada directamente con la imagen que nos proporciona la OCT. Esta imagen nos permite predecir hallazgos cerebrales patológicos en los pacientes que sufren diferentes enfermedades neurológicas <sup>278,566</sup>.

Desde el desarrollo de la OCT, este instrumento se ha utilizado para medir el espesor de la retina en diferentes patologías neurodegenerativas. A pesar de que el desarrollo de la OCT se llevó a cabo en 1991 y su distribución comercial se realizó en 1995, no fue hasta 2001 cuando se publica por primera vez un estudio de la medida del espesor de la retina en pacientes con demencia del tipo Alzheimer <sup>457</sup>. La OCT proporciona datos reproducibles y repetibles en pacientes con deterioro cognitivo, siendo capaz de detectar

los cambios que pueden ser directamente asociados al proceso degenerativo tanto del DCL como de la EA <sup>567</sup>.

A principios de siglo XXI, aparecieron numerosos estudios centrándose en la medida del espesor de la CFNR a nivel **peripapilar** en pacientes con EA. En todos los estudios se objetivó una reducción significativa del espesor de la CFNR peripapilar en los pacientes con EA comparados con los controles pareados por edad. Estos análisis se realizaron segmentando por áreas (superior, inferior, nasal y temporal) la medida del espesor peripapilar.

En nuestro estudio, cuando se realizó este tipo de **segmentación en 4 sectores** se observó que había un descenso significativo de un -15,0% en el sector inferior de los pacientes con EA moderada respecto a los controles. A pesar de no ser significativa la disminución en el sector superior, este mostraba también un descenso de espesor de un -14,5%, estando por tanto los sectores verticales muy por encima de la disminución en los sectores horizontales. En análisis de correlaciones con el MMSE mostró que tanto el sector superior como el inferior tenía una correlación significativa directa con el estado cognitivo del paciente. Sin embargo, en el análisis de las curvas ROC ninguno de estos sectores marcaba un valor predictivo significativo.

Al contrario que en nuestro estudio, varios trabajos indicaron que la reducción del espesor de la CFNR peripapilar ocurría a nivel generalizado en todas las regiones en las que el software dividía el área <sup>451-453,455-457,568,569</sup>, mientras que otros autores eran concordantes con nuestros resultados, encontrando que el descenso del espesor se daba a nivel de los sectores superior e inferior <sup>454,459,461,468</sup>, incluso en otros estudios solo se observó una disminución significativa en el sector superior peripapilar <sup>390,415,458,462,463,518</sup>. Estas discrepancias podrían ser debidas a diferentes factores como son: i) la variable inclusión de muestra en cuanto a deterioro cognitivo, donde se han agrupado en la misma muestra a pacientes con diferentes estadios de EA, e incluso a pacientes con demencia de tipo vascular; ii) el uso de diferentes OCT, donde cada una tiene la segmentación del software que provee el fabricante de una manera distinta; iii) muestra con poco rigor de selección, al incluir pacientes con alguna anomalía en la retina como son membranas epirretinianas o drusas, que pueden influenciar en el espesor de la retina.

Cuando examinamos de una manera más detallada el área **peripapilar** mediante la **segmentación en 12 sectores horarios**, nuestro estudio mostró un adelgazamiento

significativo cuando la EA está en estadio moderada, centrado en las porciones superonasal e ínfero-temporal de la papila, con un patrón en pajarita. Este cambio es menos perceptible en los pacientes con EA leve, donde solo en el sector horario 2 hay una disminución con significación estadística en el espesor peripapilar. Justo estos sectores de la papila, son los que muestran una mejor correlación con la puntuación del MMSE, mostrando el adelgazamiento de estas regiones cuando la enfermedad progresa y el deterioro cognitivo se hace más evidente. El análisis de las curvas ROC reveló que el sector horario 2 y el sector horario 8 tenían un alto valor predictivo con un 71,5% y 66,8% respectivamente.

Únicamente hemos encontrado dos trabajos en el que analizan de esta manera detallada los sectores horarios peripapilares<sup>452,570</sup>. En el estudio de Iseri et al. se encontró que todos los sectores peripapilares tenían disminuida la CFNR, a excepción del sector 8 y del sector 9. A pesar de que este estudio está realizado con otra marca de OCT (Zeiss) diferente a la de nuestro estudio, la mayor diferencia radica en el estadio de los pacientes con demencia, donde se han incluido a pacientes con MMSE de 8 hasta 18 puntos, con una media de  $18,5 \pm 6,3$ , haciendo que la muestra tenga un rango de pacientes muy dispar y poco selectivo en términos de deterioro cognitivo<sup>452</sup>. Sin embargo, en el estudio de Lad et al. al analizar los 12 sectores peripapilares en pacientes con DCL y EA leve, estos autores no encontraron diferencias significativas en ninguna de los sectores peripapilares analizados<sup>570</sup>, encontrando que algunas regiones estaban engrosadas y otras adelgazadas, siendo coincidentes estos resultados con nuestro trabajo. En este estudio, mediante análisis de regresión multivariante, señalaban que las zonas que estaban engrosadas lindaban con otras que estaban adelgazadas, estas modificaciones eran indicativas de cambios dinámicos en estas capas de la retina en el área peripapilar<sup>570</sup>.

Ferrari et al. analizaron el espesor tanto la CFNR como del complejo GCL-IPL peripapilar en DCL, EA leve, EA moderada y demencia fronto-temporal, observando que había una disminución significativa de ambos parámetros en los pacientes con EA moderada respecto a los controles, pero no en el resto de grupos, siendo estos resultados concordantes con nuestros resultados a nivel peripapilar. Estos autores sugirieron que el adelgazamiento de la CFNR y en el complejo GCL-IPL debe ocurrir en los estadios más severos de la enfermedad<sup>568</sup>. Al analizar con detalle sus resultados, curiosamente los pacientes con EA leve presentaban valores de espesor de ambas capas mayores que los pacientes con DCL, algo que también se veía en nuestros pacientes con EA leve en ciertas

regiones. Estos incrementos de espesores, según Ferrari et al. podrían indicar un proceso inflamatorio o movimientos celulares en los alrededores de la papila en estos pacientes.

Algunos estudios han observado que existe un adelgazamiento de la retina asociado con el avance del deterioro cognitivo cuando lo correlacionan con la puntuación de MMSE <sup>401,404,462,468,571</sup>, y también se ha visto que el complejo GCL-IPL peripapilar tiene una fuerte correlación con el MMSE <sup>568</sup>. En un estudio longitudinal de un año de duración en pacientes con EA leve (MMSE  $22,7 \pm 2,2$ ) observaron que la disminución de espesores en la retina era significativamente más acusada en los pacientes respecto a los controles tras 12 meses de evolución de la enfermedad. Este cambio era más prominente en las regiones superior e inferior y el descenso de espesor era paralelo al declive del deterioro cognitivo <sup>404</sup>. Se ha sugerido que el cuadrante inferior peripapilar podría ser el área con mayor especificidad y sensibilidad para detectar el deterioro cognitivo en los estadios iniciales de la EA <sup>404,454,462</sup>. En nuestro análisis se encontró también que en el cuadrante inferior de la papila presentaba una mejor correlación con la puntuación de MMSE ( $r = 0,328$ ;  $p < 0,01$ ), al igual que en los estudios anteriores, tenía una correlación significativa. A pesar de esto, en nuestro estudio el mejor valor de correlación correspondía al sector horario 12 ( $r = 0,370$ ;  $p < 0,01$ ).

En otro estudio en el que analizaba el espesor de la retina en pacientes ancianos sanos, se determinó que el análisis de su espesor podría reflejar el riesgo que presenta el paciente de desarrollo de deterioro cognitivo a lo largo del tiempo <sup>572</sup>.

Esta variabilidad de resultados puede ser debida al grado de afectación de los pacientes con EA incluidos en los estudios, ya que aquellos en los que está afectada una porción mayor de región peripapilar son aquellos pacientes en los que la enfermedad se encuentra más avanzada y al método para analizar la región peripapilar, debido a que muchos de los estudios se ha segmentado la papila únicamente en 4 sectores, perdiendo la información más detallada que te proporciona la segmentación más exhaustiva.

Más recientemente, los estudios no solo han analizado la medida del espesor de la retina a nivel peripapilar, sino que últimamente se ha puesto el foco en la **región macular**. Los estudios han demostrado que existe disminución significativa del espesor de la retina en la región macular en los pacientes con EA comparados con los controles pareados por edad <sup>452,458,461,467,468,516,573-577</sup>. En algunos estudios al analizar el área foveal se ha encontrado un engrosamiento no significativo en los pacientes con EA <sup>516,573</sup>.

Nuestro estudio ha realizado con gran detalle el examen del espesor macular con OCT, tanto en el análisis de sectores concéntricos, donde no solo se ha realizado la medida del espesor total de la retina, sino que se ha estudiado capa por capa; y en el análisis de la rejilla de 6x6, donde se dividió la región macular en 36 cuadrados que nos permitían el análisis con más detalle. Con esta forma de análisis, nos

ha permitido un mapeo más exhaustivo de la topografía macular y discernir zonas de adelgazamiento y de engrosamiento, que sin un análisis tan detallado, se enmascararían. De hecho, el engrosamiento foveal que se detecta de un 7,1% en los EA moderado, comparados con los EA leve ya nos habla de progresión en la enfermedad, así como en el análisis de la rejilla de 6x6, el engrosamiento en la EA moderada, específicamente de los cuadrados 5, 6, 11 y 21 también nos refiere progresión de la enfermedad, ya que en la EA leve lo que encontramos son adelgazamientos significativos en los cuadrados 6, 12, 15, 21 y 22. Estos engrosamientos referidos anteriormente, podrían ser debido a depósitos de A $\beta$  o pTau, típicos de esta patología <sup>211</sup>, que por un carácter proinflamatorio producirían activación de la microglía <sup>271</sup>, pudiendo generar a la vez un efecto citotóxico en las neuronas retinianas <sup>271,606</sup>.

Estudios realizados con la última tecnología OCT, la cual permite analizar las diferentes capas de retina por separado, demostraron que la reducción de espesor se encuentra a nivel de las capas más internas de la retina (complejo CFNR + CGR) mientras que las capas externas no se veían alteradas <sup>401,467,468</sup>, por esta razón algunos autores han considerado que la disminución de CGR es la causante de la disminución de espesor de la retina en los pacientes con EA <sup>468</sup>. Esta degeneración en las capas más internas de la retina también se refleja en los resultados de este estudio con un marcado adelgazamiento en la CFNR, CCG y CPI.

En un estudio en el que se analizaban los espesores en cada una de las capas de la retina en pacientes con EA leve-moderada (MMSE  $18,35 \pm 3,33$ ) encontraron que había una disminución significativa en la CCG, en la CPI y en la CNE respecto a los controles y estos defectos tenía una correlación inversa con la duración y la severidad de la EA <sup>578</sup>. Choi et al. además de encontrar una reducción significativa en el complejo formado por las CCG maculares y la plexiforme interna (GCIPL) establecieron una correlación de este complejo con el MMSE encontrando un adelgazamiento de estas capas de la retina a medida que disminuía la puntuación de este test <sup>577</sup>. Según este estudio el complejo GCL-

IPL macular parece tener un mayor valor pronóstico que los valores de la CFNR peripapilares para conocer que pacientes van a evolucionar de DCL a EA <sup>577</sup>. Esta disminución también fue observada por Jiang et al. donde encontró diferencias significativas con el grupo control, pero no entre el grupo de EA comparado con el grupo de DCL <sup>579</sup>. Este estudio encontró que esta relación del adelgazamiento del complejo GCL-IPL estaba ligada a un descenso de la velocidad del flujo sanguíneo en la mácula sugiriendo que el empeoramiento de la microcirculación puede estar causando la aceleración de la progresión de la patología, lo que implicaría a nivel sistémico la facilitación del paso de estadio DCL a EA <sup>579</sup>.

En nuestro estudio, no solo se encontraron capas donde había adelgazamientos, sino también capas con zonas de engrosamiento. Este incremento de grosor que se ve en la CNI y CNE podría coincidir con procesos inflamatorios y movimientos celulares, que se objetivan con el incremento de grosor de algunas capas más externas. En línea con estos resultados, recientemente Lad et al. a pesar de no encontrar diferencias significativas entre las medias de pacientes con DCL, pacientes con EA leve y controles, mediante un modelo de análisis de regresión multivariante encontró áreas maculares con un engrosamiento o adelgazamiento significativo en las CFNR y en el complejo GCL-IPL. Estos autores encontraron que las áreas de adelgazamiento en estas dos capas se encontraban adyacentes a áreas de engrosamiento, sugiriendo que la CFNR y GCL-IPL pueden sufrir cambios dinámicos durante la progresión de la EA <sup>570</sup>.

En 2017, Mutlu et al. <sup>580</sup> estudiaron la asociación entre las capas más internas de la retina medidas con OCT con diferentes marcadores cerebrales usando la RM. En este estudio, tras analizar a 2124 pacientes del estudio Rotterdam encontraron que el adelgazamiento de las CFNR, CCG y CPI estaba directamente relacionada con un menor volumen de la sustancia blanca y la sustancia gris cerebral. El adelgazamiento de la CFNR y de la CCG estaba asociado a una peor microestructura de la sustancia blanca. Por otro lado, no encontraron relación entre el espesor de las capas de la retina analizadas con lesiones en la sustancia blanca, microhemorragias cerebrales o infartos lacunares, por lo que la alteración de la retina se atribuía enteramente a procesos neurodegenerativos sin implicación isquémica. Observaron también que existía una relación significativa entre la disminución de la CFNR y las CCG con un menor volumen hipocampal, que es una de las características clínicas típicas de la EA, por lo que los autores enfatizaban la implicación de la retina en la patogénesis de la EA <sup>580</sup>.

Teniendo especial consideración a lo que ocurre en las etapas pre-clínicas, en los últimos años ha habido algunos estudios que han analizado las retinas de pacientes con un DCL encontrando que en la región peripapilar había un descenso de espesor también entre estos pacientes <sup>518,571,574-576</sup>, más concretamente según el estudio de Cheung et al. la reducción se sitúa en la CPI de la retina <sup>581</sup>. Curiosamente, al analizar el espesor de la mácula en estos pacientes con DCL comparando con los controles se observó que el volumen macular no solo no estaba disminuido, sino que se encontraba engrosado en comparación con los controles y con los pacientes con EA <sup>574,582</sup>. Knoll et al. encontró además un incremento de grosor en la zona peripapilar superior e inferior en los pacientes con DCL <sup>583</sup>. Los autores explicaron este incremento de volumen debido a una posible inflamación y gliosis previa a la muerte de las neuronas.

Los estudios de Snyder et al. <sup>584</sup> han revelado que en una etapa pre-clínica de la EA hay un aumento selectivo del volumen de la CPI en pacientes que tenían depósitos de A $\beta$  en cerebro observados mediante PET. En el estudio longitudinal de estos pacientes a 27 meses <sup>585</sup>, encontraron un descenso del volumen de la CPI y del volumen de la CNI y CNE, además de un adelgazamiento en el cuadrante inferior. Los autores explican el incremento de la CPI en los pacientes en etapa pre-clínica de EA debido a que en esta capa es donde las poblaciones de bipolares y amacrinas hacen la sinapsis con las dendritas de las CGR. En diferentes especies, los marcadores de sinapsis colinérgicas están concentradas en la CPI y la acetilcolina es liberada por distintos tipos de amacrinas y posiblemente por células bipolares <sup>586,587</sup>. Se conoce que uno de los cambios más importantes y tempranos en el cerebro de EA son los cambios neuroquímicos en el sistema colinérgico <sup>588</sup>, en el que produce una disrupción colinérgica <sup>589,590</sup>. El hallazgo del aumento de volumen en la capa CPI podría estar asociado a un aumento de depósitos en la retina (entre ellos A $\beta$ ) que conduciría al cambio similar en los procesos neuroquímicos en la retina <sup>584</sup>. Sería posible que estos cambios de volumen estuviesen representando un proceso inflamatorio que ocurriría en el mayor centro colinérgico de la retina teniendo lugar de forma paralela a la cascada patológica temprana que tiene lugar en el neocortex de los pacientes con EA, en los cuales, los cambios colinérgicos tempranos co-ocurren con depósitos de A $\beta$  en los mayores centros colinérgicos del cerebro <sup>584</sup>. La explicación del adelgazamiento de esta capa tras 27 meses estaría relacionado con la neurodegeneración asociada con el avance de la enfermedad tras la inflamación <sup>585</sup>.

Hay estudios que han demostrado que existe una alteración simultánea en las capas internas de la retina y el cerebro, específicamente en la sustancia blanca, en la sustancia gris y en el volumen del hipocampo <sup>580</sup>, con atrofia en corteza occipital <sup>591</sup> y con atrofia del lóbulo temporal medial <sup>592</sup>. Estas alteraciones simultáneas dan como resultado un daño a las regiones cerebrales involucradas en el procesamiento visual generando una interrupción de las conexiones dentro del tracto visual y, de ese modo, una degeneración retrógrada del nervio óptico <sup>593</sup>. Estos hallazgos proporcionan una base para los mecanismos subyacentes a los síntomas visuales específicos en pacientes con EA, tales como el rendimiento reducido en la visión, la percepción del movimiento y la memoria visual, como han demostrado los resultados de los test psicofísicos analizados en este trabajo.

Esta relación de adelgazamiento de retina y atrofia cortical puede ser explicada por el proceso denominado *dying-back*. Se ha demostrado que la liberación sostenida por la microglía de mediadores proinflamatorios tiene un efecto sobre la supresión de la neurogénesis en adultos y del transporte axonal <sup>594,595</sup>. Además, la neuroinflamación producida por la microglía activada restringe el suplemento de factores neurotróficos a las células circundantes <sup>595,596</sup> y puede afectar el proceso de intercambio de proteínas interneuronales, que es importante para la fisiología del cerebro. Las células microgliales activadas afectan a las neuronas circundantes e incluso causan retroalimentación perjudicial sobre la microglía en enfermedades degenerativas, especialmente en la EA <sup>595</sup>. La neurodegeneración generalmente comienza en los segmentos axonales distales, y afecta la progresión de las neuronas proximalmente para culminar en la muerte en un proceso de *dying-back*. Combinado con la activación microglial, la patología sináptica es la primera consecuencia neurotóxica en la neurodegeneración progresiva <sup>597</sup>. La activación microglial crónica o prolongada aumenta el nivel de citoquinas proinflamatorias al acelerar la síntesis y liberación, y también desencadena una cascada proinflamatoria que conduce a daño neuronal y apoptosis <sup>598-600</sup>.

Al mismo tiempo, la evidencia existente demostró que, en los pacientes con EA, la densidad de placas neuríticas era la más alta en los lóbulos occipitales y que estas placas estaban asociadas con los primeros síntomas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo problemas de visión <sup>446,601</sup>. En conjunto, los hallazgos de esos estudios sugieren que ciertas anomalías en el cerebro podrían reflejarse en la retina como adelgazamiento de CFNR, CCG o CPI.

Por otro lado, también es posible que la apoptosis de las CGR pueda causar degeneración anterógrada, conduciendo a una CFNR más delgada y, eventualmente, dando lugar a volúmenes más pequeños de materia blanca y de materia gris, particularmente en las regiones cerebrales que cubren el tracto visual, como se ha demostrado mediante resonancia magnética <sup>365,602</sup>.

De la misma manera, la alteración de pTau altera el transporte axonal produciendo una disfunción neuronal inducida por tau mostrando que la degeneración axonal precede a la pérdida neuronal, al igual como se ha visto en modelos animales de tautopatía y glaucoma <sup>292,603,604</sup>.

Otros estudios muestran que la activación de la glía (astrocitos y microglía) comienza en la retina del ratón en la etapa pre-sintomática de la EA. Estos cambios incluyen microglía con morfología más ramificada y expresión de marcadores anti-inflamatorios, sugiriendo que la activación microglial produce un aumento de la monitorización del tejido y fagocitosis en respuesta de los depósitos situados en la CCG <sup>211</sup>. La activación microglial puede desencadenar una respuesta neuroinflamatoria, que puede contribuir a la desorganización de la retina y a la falta de funcionabilidad como se han demostrado en diferentes test psicofísicos y ERG <sup>359,605</sup>.

El incremento de grosor de en las etapas iniciales de la EA también puede ser debida a los depósitos de A $\beta$  y pTau típicos de esta patología, que como han demostrado los estudios histológicos; primeramente se depositan en las capas más internas de la retina, para depositarse posteriormente en las capas externas, sufriendo desde el primer momento un aumento de grosor <sup>211</sup>.

Los oligómeros de  $\beta$ -amiloide en el SNC son tóxicos y contribuyen a la apoptosis neuronal <sup>271,606</sup>. La inyección intravítrea de A $\beta$ <sub>42</sub> se ha demostrado que induce apoptosis en las células de la CNI y CNE <sup>271,326,607,608</sup> y una pronunciada reducción del número de CGR de mayor tamaño <sup>607-609</sup>.

Otros cambios estructurales de la retina también se han investigado en la EA, incluidos el EPR <sup>557</sup>. Se ha demostrado que la inyección subretiniana de A $\beta$ <sub>1-42</sub> en ratones C57BL/6 de 10 meses de edad induce la hipertrofia del EPR pero no su apoptosis y la pérdida de foterreceptores <sup>271,557</sup>. La presencia de A $\beta$  en la retina puede aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y apoyar la noción de que la hipertrofia del EPR está

mediada por el estrés oxidativo <sup>293</sup>. El A $\beta$  depositado en la retina altera la estructura y la función del EPR, tiene características proinflamatorias e induce un efecto citotóxico en las neuronas retinianas y un activación de la microglía <sup>271</sup>.

### 7.3.2 Estudio de la zona avascular foveal

En la retina de pacientes con EA se ha puesto de manifiesto con diferentes estudios que existe un estrechamiento vascular y una reducción del flujo sanguíneo <sup>390,396,610</sup>. En un pequeño estudio realizando OCTA comparando la red vascular de pacientes con DCL y EA se observó que existía una disminución de la densidad capilar en la red vascular profunda <sup>470</sup>.

En nuestro estudio al analizar la ZAF tanto superficial como profunda no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EA leve y los controles.

Actualmente, hay solo dos estudios donde se ha analizado la superficie de la ZAF en los pacientes con EA <sup>393,611</sup>. Ambos estudios fueron realizados con la OCTA Octovue, y en ambos los pacientes con EA tenían un aumento significativo de la ZAF. En uno de ellos, el estadio de la evolución de la EA es mucho mayor que en nuestro estudio, con MMSE de  $16,92 \pm 7,39$  (nuestros pacientes con EA tenían MMSE de  $24,00 \pm 5,32$ ) y en el otro estudio no se indica el grado de evolución de la demencia.

Nuestros resultados, donde no se ha observado cambios en la ZAF son coincidentes con nuestros resultados de los valores de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico, donde ambas pruebas muestran que la vascularización retiniana en estadios muy precoces de la EA aún no está alterada de forma significativa, sin embargo, cuando la enfermedad progresa, los cambios vasculares relacionados con la EA son visibles en la vascularización de la retina, como se ha visto en estudios con pacientes con mayor deterioro cognitivo.

Sin embargo, tal y como se ha visto en este estudio, en estadios precoces de la EA la red coroidea si se encuentra adelgazada de forma significativa.

Cabe destacar, que la vascularización de la retina y de la coroides, aunque ambas derivan de la arteria oftálmica, que es una rama de la carótida interna, los dos sistemas trabajan con una presión de perfusión diferente ya que el sistema de regulación es distinto.

La circulación retiniana se caracteriza por un flujo sanguíneo bajo, mientras que el flujo en la coroides es alto <sup>612</sup>.

En la mayoría de los tejidos, el flujo sanguíneo tiende a mantenerse constante, a pesar de las variaciones moderadas en la presión de perfusión, gracias al mecanismo de autorregulación <sup>613</sup>.

La circulación retiniana carece de inervación autónoma, muestra una autorregulación eficiente y está influenciada principalmente por factores locales producidos por una combinación de mecanismos metabólicos y miogénicos <sup>612,614</sup>.

Sin embargo, mayoritariamente la circulación coroidea no está controlada por ningún mecanismo de autorregulación <sup>614-622</sup>, sino que se controla principalmente por la inervación autónoma y sensitiva <sup>612</sup>. Es por ello, por lo que existe en la coroides gran cantidad de fibras nerviosas <sup>614</sup>. Estas fibras son más numerosas en la coroides central, sobre todo en la región submacular, que en la periferia <sup>623</sup>. Asimismo, las células ganglionares NPY+ y TH+ se observan con más frecuencia en la región central de la coroides <sup>624</sup>. La razón de un mayor número de células ganglionares y de la mayor densidad del plexo nervioso en la coroides submacular podría ser la regulación del flujo sanguíneo arteriolar en esta zona a la contribuyen estas neuronas <sup>614</sup>. La distribución mayoritaria de estas neuronas en la región submacular sugiere la posibilidad de que afecciones vasculares de ciertas enfermedades oculares, como son el edema macular diabético o la DMAE, estén relacionadas con la posible disfunción de estas células <sup>614</sup>. Por lo que no sería extraño que en la EA, que muchos estudios han relacionado con la DMAE <sup>300</sup>, las alteraciones coroideas se den de forma más precoz que las retinianas.

### 7.3.3 Disminución del espesor coroideo

La coroides es uno de los tejidos más vascularizados en el cuerpo, y su función principal es proveer a la retina externa de nutrientes y oxígeno. Cada vez hay más evidencias que sugieren que la red vascular ocular también se ve alterada en la EA, e incluso se ha especulado, que estos cambios comparten los mecanismos patogénicos que se producen en los vasos cerebrales. De hecho, algunos estudios han descrito en la EA alteraciones en la coroides <sup>399-401,403</sup>.

En nuestro estudio se ha demostrado que existe un adelgazamiento de la coroides en los pacientes con EA leve comparados con los controles. Este adelgazamiento, se encuentra en la zona subfoveal, en nasal (desde las 500  $\mu\text{m}$  hasta las 1500  $\mu\text{m}$ ) e inferior a 500  $\mu\text{m}$  de la fovea.

Estos resultados son concordantes con los estudios publicados hasta la fecha, donde también se han encontrado reducciones en los espesores coroides en estos pacientes, y donde los estudios con puntuación de MMSE más bajas, muestran que el adelgazamiento se extiende por la totalidad de la coroides <sup>399-401,403</sup>. En el único estudio de seguimiento realizado, se analizaron las coroides de nuevo tras 12 meses, encontrando que el adelgazamiento es más prominente en los pacientes con EA que en los controles. Este cambio mostraba, que además del causado por el proceso natural de envejecimiento, se adicionaba otro ligado a la EA <sup>399</sup>. Resultados similares de disminución del espesor coroides, también han sido observados en estudios histopatológicos en un modelo de rata con EA y en muestras humanas *postmortem* de donantes con EA <sup>322</sup>.

Este adelgazamiento de la coroides en la EA podría estar asociado con la hipoperfusión y/o los cambios atróficos de esta capa vascular. Estos cambios patológicos en la red vascular podrían ser causados por los depósitos locales de A $\beta$  similares a los que se pueden encontrar en el sistema vascular cerebral en la EA <sup>399</sup> y probablemente estos cambios en la coroides, vistos incluso en pacientes con EA leve, reflejan la importancia de los factores vasculares en su patogénesis <sup>403</sup>.

Estudios previos demostraron acúmulos de A $\beta$  en los vasos coroides en ratones modelo de envejecimiento normal y en un modelo transgénico de ratón de EA <sup>357,625</sup>. Al igual que en el cerebro, la acumulación de A $\beta$  en la coroides, podría inducir una respuesta inflamatoria y la activación del complemento, que conduce progresivamente a la neurodegeneración y a la vasoregresión de la vascularización coroides, a través de la misma cascada patológica que ya ha sido descrita en los cerebros con EA <sup>322,626-628</sup>

Por lo tanto, paralelamente a los cambios vasculares que tienen lugar en el cerebro, el adelgazamiento coroides puede contribuir al estudio de la severidad y progresión de la enfermedad.

#### **7.3.4 Valores de la oxihemoglobina en la cabeza del nervio óptico.**

La microcirculación cerebral ha sido ampliamente estudiada en la EA. A pesar de que la enfermedad de pequeño vaso está implicada en el desarrollo y progresión de la EA <sup>629</sup>, la microcirculación cerebral es muy complicada de evaluar *in vivo*. Los vasos sanguíneos pequeños de la retina y del cerebro comparten un origen embriológico, características anatómicas y propiedades fisiológicas similares (por ejemplo, arterias terminales no anastomóticas, y barrera) <sup>233,236</sup>. Los vasos retinianos, que miden de 100 a 300  $\mu$ m de tamaño, permiten una visualización no invasiva de la microcirculación humana *in vivo*, ofreciendo una "ventana" única y de fácil acceso para estudiar la patología microvascular cerebral <sup>396</sup>.

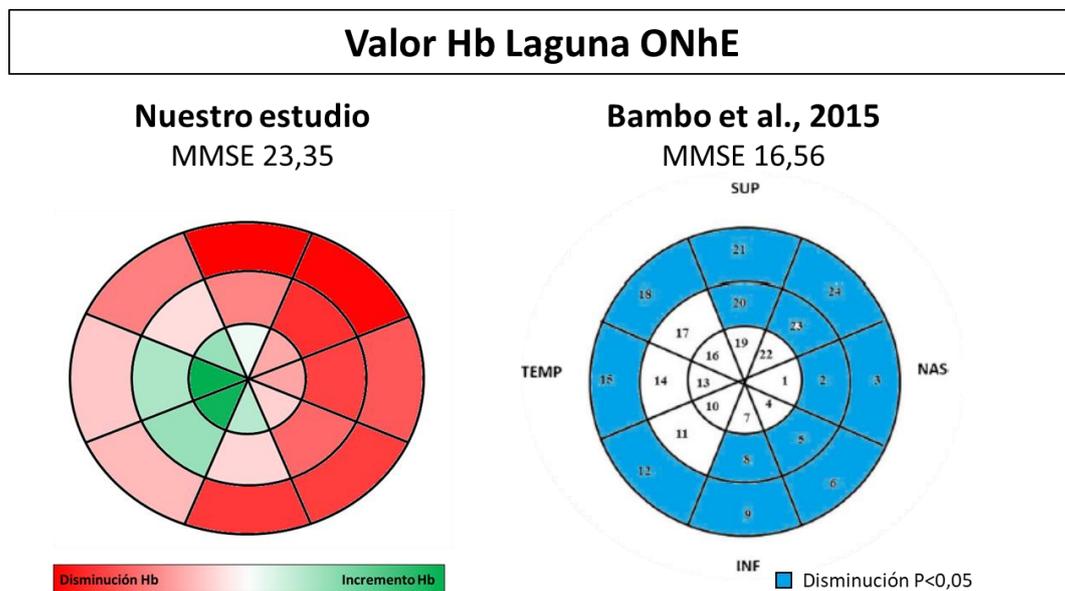
Algunos autores han sugerido la posibilidad de los cambios en la reflectancia de la cabeza del nervio óptico pueda detectar diferencias en la cantidad de Hb <sup>630</sup>. A pesar de que el nivel de Hb no puede medirse directamente, la perfusión del nervio óptico, al igual que en cualquier tejido, depende de 3 factores: velocidad de flujo sanguíneo, contenido de Hb y saturación de oxígeno. Por lo tanto, examinando estos factores, es posible identificar zonas en el disco que contienen mayor o menor cantidad de Hb <sup>631</sup>.

En este estudio se usó el software Laguna ONhE, diseñado y cedido para este estudio por el Prof. González de la Rosa, que analiza los cambios de color en el nervio óptico usando la Hb como pigmento de referencia, compensando diferentes variables como son la iluminación o la absorción y difusión del cristalino. El propósito de este programa no es medir simplemente la perfusión de la cabeza del nervio óptico, sino detectar la palidez causada por un descenso de la densidad capilar y consecuentemente una pérdida axonal. Se ha demostrado que el software Laguna ONhE tiene gran precisión y reproducibilidad en el diagnóstico precoz en pacientes con glaucoma incipiente comparado con los test clásicos funcionales y estructurales usados en el diagnóstico del glaucoma <sup>493,631-635</sup>. También hay estudios que refieren su utilidad para analizar pérdida axonal en pacientes con patología neuro-oftalmológica como son aquellos con esclerosis múltiple <sup>636</sup> o Enfermedad de Parkinson <sup>637</sup>.

En nuestro estudio, a pesar de no encontrar diferencias significativas en las medidas de la Hb en la cabeza del nervio óptico entre los pacientes con EA leve y controles, se encontraban zonas con menor cantidad de Hb y otras con un incremento respecto a los controles. Las zonas que presentaban un descenso no significativo en los valores de Hb fue el anillo exterior, sobre todo en la región nasal, y en el anillo intermedio e interior,

también la región nasal. Las zonas donde había un incremento no significativo de Hb en los pacientes con EA leve fue en el anillo intermedio e interior en la región temporal, donde el mayor incremento estaba marcado por S10 y S13, con un incremento de 4,31% y 4,45% respectivamente.

El único estudio publicado hasta la fecha usando este software en pacientes con EA muestra unos valores de disminución de Hb significativos en la cabeza del nervio óptico en los mismos sectores en los que en nuestro estudio hay un descenso de Hb. En las áreas donde ellos ven un descenso no significativo, en nuestro estudio se marca un aumento no significativo de Hb en los pacientes con EA leve <sup>638</sup>. Estos resultados, a pesar de parecer diferentes lo que nos están mostrando es la evolución de la patología cuando la EA progresa. El estudio de Bambo et al. está realizado en pacientes con un MMSE de 16,56. En nuestro estudio, sin embargo, los pacientes están examinados en un estadio más leve de la patología con MMSE de 23,35 y viendo las gráficas de ambos trabajos como se solapan nos da a pensar que la tendencia de nuestros pacientes seguirá hacia los resultados de Bambo et al. (Figura 61).



**Figura 61. Comparación de los valores de Hb en la cabeza del nervio óptico mediante el software Laguna ONhE en los pacientes con EA. Izquierda:** Gráfica de nuestro estudio, donde los colores rojos muestran un descenso de Hb y los verdes un incremento en los pacientes con EA leve respecto a los controles. Ninguno de los valores presenta significación estadística  $p > 0,05$ . **Derecha:** Gráfica del estudio de Bambo et al. donde se muestran un azul aquellos sectores con descenso significativo de Hb en los pacientes con EA respecto a los controles <sup>638</sup>. En ambos estudios se muestra la puntuación de MMSE de los pacientes. Hb: hemoglobina; MMSE: Mini Mental State Examination.

Comparando en nuestro estudio los niveles de Hb con lo observado en la OCT peripapilar se observa que en los pacientes con EA leve parece que hay un respeto en el haz papilomacular. Tanto a nivel de perfusión, donde aparece una tendencia a una mayor concentración de Hb, como a nivel de respeto del espesor peripapilar, donde no se observan cambios significativos en el espesor. En la EA la isquemia del disco óptico debe de producirse de una manera crónica y estable, y por esta razón puede que sea mejor tolerada por el nervio óptico. Bambo et al. explican que posiblemente debido a esta razón los bajos niveles de Hb en el anillo de los pacientes con EA no provoquen una consecuencia directa estructural manteniendo el espesor peripapilar sin cambios <sup>638</sup>, por lo tanto los valores bajos de Hb en pacientes con EA leve puede ser una consecuencia de los cambios microvasculares primarios de la retina que son concomitantes con los cambios cerebrales.

#### **7.4 Estudio de la población microglial en el modelo experimental 3xTgAD.**

La microglía, como células inmunes innatas residentes del SNC, en presencia de un daño adopta un fenotipo activado, cambia su forma (retrayendo sus prolongaciones y engrosando el cuerpo celular), proliferan y migran, acumulándose alrededor de las áreas dañadas. En su estado de mayor activación, la microglía adquiere una morfología ameboidea actuando como macrófagos <sup>639</sup>. Asociados a los cambios morfológicos, la microglía cambia la expresión de enzimas y receptores y libera factores inflamatorios. Una activación microglial excesiva podría causar la liberación de factores neurotóxicos que podrían provocar la muerte neuronal. En la EA se ha visto que el componente inflamatorio juega un importante papel, observándose una activación astrogliar y microglial, un aumento de la expresión de los factores inflamatorios y la activación del sistema del complemento, tanto de la vía clásica como de la alternativa <sup>640,641</sup>. La neuroinflamación puede estar relacionada con los depósitos de A $\beta$ , que producen una fuerte respuesta inflamatoria y alteran la fagocitosis microglial de los depósitos de A $\beta$  <sup>642</sup>. Estos hechos pueden llevar a una sobreexpresión mantenida de mediadores inflamatorios, que pueden inducir la muerte neuronal <sup>643</sup>. Además, como consecuencia de la apoptosis

se produce una nueva activación de la microglía para fagocitar y eliminar los restos celulares procedentes de las células que se están muriendo <sup>357</sup>. Dado que la activación microglial puede contribuir a la progresión de la EA, el desarrollo de estrategias para el control de la activación microglial podrían tener efectos beneficiosos que desaceleren la progresión de la enfermedad <sup>644</sup>.

Los estudios que han analizado la activación microglial en la retina son muy escasos realizándose en diferentes modelos de ratas y ratones con EA.

En un modelo de EA en rata TgF344-AD realizado en secciones de retina y coroides cuantifican el número de células Iba-1+ (marcador de microglía y macrófagos) en la coroides de los animales transgénicos de 14 y 19 meses con respecto a los controles, los autores no aportan datos de las células Iba-1+ de la retina <sup>322</sup>.

En los ratones transgénicos Tg2576AD utilizando secciones de retina marcadas con anti-Iba-1 se encontró un incremento significativo del número de microglías en la retina con respecto a los controles <sup>325</sup>.

En los ratones dobles transgénicos APP<sup>swe</sup>/PS11E9 utilizando secciones de retina marcadas con el anti F4/80 (que es un marcador de microglía y macrófagos) observan una activación de la microglía en los animales transgénicos (tanto en los de mediana edad 12-16 meses como en los viejos 19-21 meses) con respecto a los controles, basándose en el incremento en la densidad óptica relativa en los niveles de la inmunoreactividad F4/80 en un área concreta de la retina <sup>358</sup>. En este mismo modelo Ning et al., cuantificaron los perfiles celulares de las células ganglionares rodeadas por microglía F4/80+ encontrando un incremento significativo en los animales transgénicos (de 27 meses) con respecto a los controles, postulando que se producía una activación microglial <sup>357</sup>.

Otro modelo utilizado para el estudio de la EA es el ratón triple transgénico 3xTgAD, que portan las mutaciones humanas en los genes que codifican la presenilina 1 (PS1M146V), la proteína precursora amiloide (APP<sup>swe</sup>) y Tau (MAPTP301L) y recapitula la mayoría de las características de la EA, siendo uno de los mejores modelos para el estudio de la EA <sup>480</sup>. En este modelo, Grimaldi et al., estudiaron las células microgliales en secciones de retina y analizaron la densidad de tinción Iba-1+ por mm<sup>3</sup>, el área del soma de las células Iba-1+ así como el área de ramificación microglial. Observaron que en las etapas presintomáticas de la EA (5-10-20 semanas) solo se observaba en las células Iba-1+ una

morfología más ramificada comparándolas con los controles. Sin embargo, solo se encontraba un incremento de la densidad de tinción Iba-1+ por  $\text{mm}^3$  en las etapas más tardías (50-72 semanas) y además las células estaban menos ramificadas con respecto al control. Estos autores no encontraron diferencias en el tamaño de los somas<sup>211</sup>.

En nuestro estudio analizamos las células microgliales en el ratón 3xTgAD en etapa tardía de la EA (64 semanas - 16 meses) utilizando montajes planos de retina. Como hemos visto con anterioridad todos los estudios sobre la microglía de la retina han sido realizados en secciones histológicas, las cuales, al no poder analizar las células en toda su totalidad, no nos da una información muy precisa de la morfología celular. Sin embargo, los montajes planos de retina permiten la visualización de toda la célula microglial y su localización a lo largo de la extensión de la retina (en los ejes X, Y y Z), lo cual puede aportar datos morfológicos y de distribución celular mucho más precisos, tales como la forma celular, el engrosamiento del soma, el número de células, los desplazamientos de las células en la propia capa o hacia capas vecinas. Además, se puede obtener una información precisa del número de células que podemos encontrar en cada capa retiniana. Nuestro estudio ha sido realizado en una etapa tardía de la EA (64 semanas) en la que se observan los principales cambios en las células microgliales como ya reportaron con anterioridad Grimaldi et al.<sup>211</sup>.

En este modelo demostramos por primera vez que la microglía Iba-1+ en todas las capas de la retina (CPE, CPI y CCG-CFN) mostraba signos de activación. Esta activación ha sido puesta de manifiesto en nuestro estudio por el aumento del tamaño del soma, las alteraciones en el patrón del mosaico celular que forman las células microgliales (desplazamientos celulares), así como en el número de células microgliales, todo esto analizado en cada una de las capas donde se localiza la microglía y en los distintos sectores retinianos (superior, inferior, nasal y temporal).

Las células microgliales en las CPE y CPI en los animales control se disponen formando un mosaico regular por toda la extensión de la retina, sin que las células contacten entre sí. Sin embargo, en los animales transgénicos 3xTgAD la disposición en mosaico se pierde en algunas zonas de la retina, debido a que las células se aproximan en unos puntos determinados, dejando zonas con menor densidad celular. Estas aproximaciones pueden tener una forma en barrera, en las que las células se disponen formando hileras de células muy próximas, o muestran un patrón circular, en el que las células microgliales parecen

estar rodeando algo concreto y orientan muchas de sus prolongaciones hacia su interior. En el centro de estos círculos las microglías adquieren una morfología ameboide. En muchas ocasiones estas alteraciones aparecen co-localizándose en ambas capas (CPE y CPI). En este modelo triple transgénico Grimaldi et al observaron que en la retina se producen acúmulos de A $\beta$  a medida que la enfermedad progresa, de tal forma que a las 30-40 semanas, estas placas aumentan su tamaño y se localizan tanto en la CGR y como en la CPE. Además, en las secciones de retina estos autores han visto que algunas prolongaciones de la microglía contactan directamente con las placas de A $\beta$  <sup>211</sup>. Las agrupaciones en círculo o en barrera observadas en nuestro estudio podrían estar relacionados con los depósitos de A $\beta$ , de tal forma, que las células microgliales ameboides del interior de las agrupaciones circulares podrían estar fagocitando el amiloide de estas placas, así como los restos de células muertas que se hayan producido como consecuencia de la neurodegeneración inducida por estos depósitos.

De igual forma, en los cerebros de pacientes con EA se ha observado microglía activada que rodea las placas de A $\beta$  contribuyendo a la limpieza de estos depósitos <sup>212</sup>. También en secciones de retina de otros animales transgénicos se observaron depósitos de A $\beta$  en la CFN y alrededor de las células ganglionares acompañados de una población de microglía F4/80+ que rodeaba a las células ganglionares. Estos depósitos se incrementaban con la edad junto con un aumento en la expresión de MPC-1, el cual es un atrayente de las células microgliales <sup>357</sup>.

En los animales control, la mayor parte de las células microgliales se disponen paralelas a la superficie de la retina formando, como expusimos con anterioridad, estructuras en mosaico en la CPE y en la CPI. Sin embargo, en la CFN, aunque las células también se disponen paralelas a la superficie retiniana no forman un mosaico regular y su disposición está muy relacionada con el curso de los vasos sanguíneos. En nuestros animales 3xTgAD, observamos que en muchas zonas de las capas plexiformes las células Iba-1+ cambiaban su orientación disponiéndose perpendiculares a la superficie de la retina, localizándose parte de sus somas en las capas nucleares mientras que muchas de sus prolongaciones participaban en los plexos microgliales de ambas capas plexiformes, como hemos podido observar en el análisis 3D de los montajes planos de retina. Cuando esto ocurre, la inmunotinción Iba-1+ de los somas microgliales aumenta de forma considerable con respecto al resto de las microglías. Este cambio en la orientación de las células y el cambio en la disposición de los somas hacia las capas nucleares podría

ayudarnos a entender como en la OCT de nuestros pacientes con EA leve, al segmentar la retina en capas, encontramos zonas de adelgazamientos en determinadas zonas de las plexiformes que se correlacionan con engrosamientos en zonas equivalentes de las capas nucleares. Además, en otra enfermedad neurodegenerativa como el glaucoma <sup>208,645,646</sup>, que comparte con la EA algunos mecanismos patogénicos como la neuroinflamación, así como en degeneraciones retinianas <sup>647</sup> se han observado cambios en la orientación de las células microgliales adoptando una disposición vertical conectando varias capas entre sí. Esta disposición vertical, similar a la de las células de Müller, se ha postulado que podría contribuir a la distribución de señalización entre los diferentes plexos microgliales para comunicar al resto de la retina donde se ha producido un daño <sup>646</sup>.

En los animales control, la mayoría de las células microgliales Iba-1+ presentaban un cuerpo celular pequeño de forma triangular del que parten numerosas prolongaciones. Sin embargo, en nuestros animales 3xTgAD tanto en la CFN como en las capas plexiformes se observaba en general un incremento del tamaño de los cuerpos celulares y una retracción de sus prolongaciones. Este hecho, es corroborado por el incremento significativo en el área del tamaño del soma de las células Iba-1 + de la CPE y del complejo CPI y CCG+CFN en los animales transgénicos con respecto a los controles de edad. Este incremento se producía en todos los sectores retinianos analizados (superior, inferior, temporal y nasal) en todas las capas analizadas. Sin embargo, Grimaldi et al. utilizando este mismo modelo y en tiempos semejantes, no encuentran diferencias en el área del tamaño del soma <sup>211</sup>. Este hecho puede ser debido, a que estos autores utilizan secciones de tejido, y la medición del área del soma podría ser menos precisa, al no tener las células enteras, algo que no ocurre en los montajes planos usados en nuestro estudio.

Otro signo importante de activación microglial, es el aumento en el número de células. En nuestro estudio los ratones 3xTgAD mostraron un incremento significativo en el número total de células Iba-1 + de la retina con respecto a los animales control. Este incremento era significativo en todos los sectores retinianos analizados en el CCI (CPI+CCG-CFN) y solamente en el sector inferior en la CPE. El incremento de células podría deberse a una proliferación celular como mecanismo de activación ante el daño neuronal desencadenado tanto por las placas de amiloide, como por los procesos de neuroinflamación desencadenados por estos depósitos. Aunque la mayor parte de los estudios en los distintos modelos transgénicos no cuentan directamente el número de células microgliales de la retina, se utilizan métodos que permiten una estimación de las

mismas, encontrando, al igual que en nuestro estudio, un incremento significativo del número de células microgliales<sup>325,357,358</sup>. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se analiza el incremento de las células dependiendo de la capa y del sector retiniano.

El incremento en el número de microglías en las diferentes capas y sectores observados en nuestro estudio podría estar relacionado con los depósitos de amiloide los cuales, no se distribuyen de forma homogénea por toda la retina. En un modelo de EA en rata TgF344-AD<sup>322</sup> y en los ratones dobles transgénicos APP<sup>swe</sup>/PS11E9<sup>358</sup> estos depósitos se sitúan mayoritariamente en las capas plexiformes. Sin embargo, otros autores en este mismo modelo encontraron depósitos sobre todo en la CCG y en la CFNR<sup>357</sup>. En los ratones transgénicos Tg2576AD la mayoría de los depósitos de A $\beta$  se detectaron principalmente desde la CCG hasta la CPI, encontrando algunas placas en la CPE y en la capa de fotorreceptores<sup>325</sup>. En los ratones de nuestro modelo 3xTgAD los depósitos de A $\beta$  y los ovillos de pTau han sido descritos en la CCG y en el resto de las capas internas con el avance de la enfermedad<sup>211</sup>. En relación a esto, en nuestro estudio, en el que usamos el modelo 3xTgAD, también vemos que el mayor incremento en el número de células microgliales se produce en las capas más internas de la retina, donde en la mayoría de los modelos encuentran un incremento de A $\beta$ .

Se ha visto que, en la EA, la activación de la microglía puede desempeñar un doble papel, por un lado, la activación microglial aguda conduce a una disminución de la acumulación de A $\beta$  al aumentar su fagocitosis<sup>350</sup>. Sin embargo, la activación crónica de la microglía contribuye a la neurotoxicidad y la pérdida de sinapsis al desencadenar varias cascadas proinflamatorias. En nuestro estudio hemos encontrado que, en las retinas de los animales transgénicos, coexisten ambos tipos de activación. De tal forma que encontramos microglía ameboides fagocítica, que se dispone en zonas de agrupamiento microglial, las cuales podrían estar ejerciendo un papel en la limpieza del A $\beta$ . Mientras que el resto de las células microgliales, también presentan signos de activación, aunque de tipo más crónico, como son el engrosamiento de somas, la ligera retracción de las prolongaciones y los cambios en la orientación del cuerpo celular. La activación crónica de la microglía desvía sus funciones fisiológicas y beneficiosas, de tal forma, que la microglía activada en EA muestra una mayor proliferación<sup>350-352</sup>, como hemos visto en nuestro estudio, y una mayor expresión de marcadores inflamatorios como CD36, CD14, CD11c, MHC-II e iNOS, como se ha visto en el cerebro de pacientes con EA<sup>353,354</sup>. Esto también se ha visto en la retina del modelo 3xTgAD, donde se ha encontrado que en estadios precoces

de la enfermedad existe un incremento de marcadores antiinflamatorios (Ym1 y CD206), mientras que en las fases más avanzadas de la enfermedad hay un cambio a un perfil proinflamatorio, encontrándose un incremento de marcadores proinflamatorios (iNOS, IL-1 $\beta$ ), que van aumentando con el curso de la enfermedad <sup>211</sup>. Esta activación crónica de la microglía, con liberación constante de factores proinflamatorios, podría provocar por un lado una disminución en la fagocitosis del A $\beta$ , y por otro neurotoxicidad, la cual conduciría a la muerte neuronal <sup>641</sup>.

Aunque el A $\beta$  se localice en un determinado sector de una capa retiniana y pueda generar apoptosis neuronal en esa zona, la activación de la microglía puede ser transmitida al resto de las capas de la retina, por ejemplo, al cambiar su orientación y comunicar diferentes capas entre sí, como hemos visto en nuestros animales transgénicos. Esto podría inducir una activación crónica de toda la microglía, lo cual podría provocar daño neuronal a nivel de todas las capas retinianas. En el modelo transgénico APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>E9</sup> se ha encontrado alteraciones en las ondas a y b del ERG postulando una alteración de fotorreceptores y bipolares <sup>358</sup>. En el modelo Tg2576AD encuentran un adelgazamiento del espesor retiniano en comparación con el control <sup>325</sup>. Sin embargo, otros autores solo encuentran apoptosis neuronal en la CGR en los modelos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>E9</sup> y en el 3xTgAD. Como vemos, las alteraciones neuronales pueden implicar distintas capas de la retina, y esto en cierto modo podría explicar los adelgazamientos encontrados mediante OCT en algunos sectores de todas las capas retinianas en nuestros pacientes con EA leve.

En nuestro estudio hemos observado que existe tanto en los animales control como en los transgénicos un punteado Iba-1+ que podría originarse de algunas células marcadas con este anticuerpo. Este punteado podría corresponderse, en cierta medida, con microvesículas extracelulares, las cuales pueden ser producidas por la microglía siendo importantes mediadores de la comunicación intercelular <sup>646</sup>. Se ha postulado que los exosomas procedentes de las células microgliales podrían constituir una vía de transmisión de la proteína tau, distinta a la sináptica, la cual podría contribuir a la patogénesis de la EA <sup>355</sup>.

Las células microgliales contienen moléculas comunes con los leucocitos, entre otras las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), ante las cuales se han desarrollado anticuerpos como el OX-6 (anti-MHC-II). Esta molécula participa en la presentación de antígenos a los linfocitos T poniendo en marcha la respuesta inmune

de tipo adquirido. Se expresan de forma habitual en las células presentadoras de antígeno profesionales, tales como las células dendríticas, los macrófagos, las células de Langerhans, las células de Kupffer, y en los linfocitos B. Se ha visto, que en la retina y en el cerebro, la expresión de esta molécula es muy baja, expresándola la microglía de una forma constitutiva. Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias y neurodegenerativas la expresión del MHC-II aumenta tanto en la microglía activada como en la fagocítica<sup>648</sup> incrementando su capacidad para actuar como células presentadoras del antígeno, pudiendo estar implicadas en la puesta en marcha de procesos inflamatorios de tipo adaptativo. En el cerebro de ratones viejos se ha visto que se produce un incremento en la expresión de MHC-II en las células microgliales con respecto a los animales jóvenes. Además en el modelo TgAPP/PS1 a las 32- 64 semanas se ha observado un incremento en la expresión de MHC-II en las células microgliales<sup>354</sup>. En otro modelo de EA, el APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>, se ha visto en el cerebro que las únicas células microgliales que expresan MHC-II es una subpoblación que rodea las placas de A $\beta$ <sup>353</sup>.

En nuestro estudio hemos visto, que tanto en los animales transgénicos como en sus controles pareados por edad presentan una tinción OX-6+ similar, observándose en las células microgliales un acúmulo OX-6+ en el soma, lo que implica una expresión MHC-II+. Esta expresión puede ser debida a que los ratones de nuestro estudio, así como sus controles pareados de edad, son individuos viejos y que como se ha dicho anteriormente, los individuos mayores presentan un incremento de la expresión de MHC-II en la microglía. Sin embargo, las células profesionales presentadoras del antígeno, como las células dendríticas y las perivasculares presentaban una expresión por todo el soma y las prolongaciones siendo semejante en los transgénicos que en los controles.

Podríamos especular, que estas observaciones en animales transgénicos trasladadas a los hallazgos encontrados en los pacientes con EA leve y EA moderado, podrían explicar que los cambios celulares a nivel de la retina podrían apoyar los hallazgos psicofísicos encontrados en humanos, siendo conscientes de las diferencias entre el modelo animal y el humano, en los que una alteración en las capas plexiformes podría conducir a una disminución de la calidad en el procesamiento visual, debido a una alteración en los diferentes campos receptores. Estas alteraciones justificarían la pérdida de agudeza visual precoz en estos pacientes, así como la bajada de la sensibilidad al contraste, la peor percepción cromática y los problemas para realizar el test digital de percepción encontrados en este trabajo.



## **8. CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

### 8.1 Conclusiones en español

En esta tesis doctoral, se ha estudiado la implicación de la vía visual en la demencia tipo Alzheimer. Se ha trabajado en pacientes con EA leve y EA moderada analizando tanto métodos psicofísicos oftalmológicos como pruebas estructurales. También se ha empleado para el análisis de la población microglial de la retina un modelo experimental de ratón transgénico con EA. A la vista de los resultados, concluimos que:

1. La agudeza visual de los pacientes con EA está disminuida respecto a los controles. La bajada de agudeza visual se da en estadios tempranos de la enfermedad y se mantiene estable en la EA en el estadio moderado.
2. La sensibilidad al contraste en los pacientes con EA sufre una bajada en todas las frecuencias espaciales cuando debuta la enfermedad. Esta bajada es mayor cuanto mayor es la frecuencia espacial examinada. Cuando la EA evoluciona al estadio moderado, la sensibilidad al contraste se mantiene estable.
3. Los pacientes con EA presentan una peor percepción cromática. Se ha encontrado una alteración inespecífica tanto en el eje tritán, como en el eje deután. Cuando la EA evoluciona al estadio moderado los pacientes cometen un mayor número de errores.
4. El test digital de percepción muestra una peor integración visual en los pacientes con EA cuando debuta la neurodegeneración. Esta alteración se mantiene estable cuando avanza la patología al estadio moderado.
5. El espesor total de la mácula sufre un adelgazamiento cuando la EA está en estadio leve. Cuando la enfermedad progresa al estadio moderado se encuentran engrosamientos en la región central.
6. En los pacientes con EA leve existe un adelgazamiento en la mácula en las capas retinianas CFNR, CCG, CPI, CPE y EPR, mientras que en la CNI y CNE, por el contrario, existe un engrosamiento.

7. En los pacientes con EA leve, en el espesor peripapilar de la CFNR no hay cambios significativos, mientras que, en la EA moderada existe un adelgazamiento significativo en los sectores superonasal e inferotemporal.
8. Los pacientes con EA leve presentan una disminución de la coroides circunscrita a la coroides subfoveal, nasal e inferior.
9. La zona avascular foveal en los pacientes con EA leve no existen cambios significativos.
10. Los valores de la oxihemoglobina de la papila en pacientes con EA leve no tienen cambios significativos.
11. El mejor valor predictivo lo muestran la medida del espesor coroideo, en nasal e inferior, y todas las frecuencias de la sensibilidad al contraste, siendo mejor cuanto más alta es la frecuencia examinada.
12. Todas las pruebas psicofísicas se correlacionan con la puntuación de MMSE.
13. Los cambios en el grosor de la capa de fibras peripapilar se correlacionan mejor con el avance de la enfermedad, dado por la puntuación del MMSE.
14. La mejor correlación entre la sensibilidad al contraste y la OCT se encuentra en el área macular.
15. En las retinas de ratón transgénico de EA existen signos de activación microglial. Los animales transgénicos presentan un aumento del número de células, engrosamiento del soma, retracción de sus prolongaciones y movimientos en la misma capa y entre capas. Esta reactividad glial da como consecuencia una alteración del plexo microglial en los ratones transgénicos de EA.
16. En las retinas de ratón transgénico de EA hay agrupaciones circulares de microglía, con reorientación y polarización de sus prolongaciones hacia el interior del círculo, posiblemente como consecuencia a los acúmulos proteicos típicos de esta neurodegeneración.
17. Las alteraciones morfológicas observadas en las retinas de pacientes con EA podrían estar causadas por una gliosis reactiva debida a la patología asociada a los depósitos característicos de esta neurodegeneración.

## 8.2 Conclusiones en inglés

In this doctoral thesis, involvement of visual pathway in AD was studied. Patients with mild or moderate AD were analyzed using psychophysical ophthalmological methods and structural tests. To begin to examine cells and processes involved in AD-associated retinal degradation, we analyzed retina microglia in a mouse model of AD. Our data lead us to the following conclusions:

1. Patients with AD show lower visual acuity than healthy controls. Loss of visual acuity occurs in early stages of AD and remains stable as the disease progresses to moderate severity.
2. Patients with AD show lower contrast sensitivity at all spatial frequencies in early stages of the disease, with greater loss of contrast sensitivity at higher spatial frequencies. Loss of contrast sensitivity remains stable as the disease progresses to moderate severity.
3. Patients with AD have lower chromatic perception than controls, which is associated with nonspecific alteration of the tritan and deutan axes. Loss of perception increases as the disease progresses to moderate severity.
4. Patients with mild AD perform worse on the digital perception test than controls, indicating worse visual integration. This loss of integration remains stable as disease progresses to moderate severity.
5. Mild AD is associated with macular thinning, while moderate AD is associated with thickening of the central region of the macula.
6. Mild AD is associated with thinning of the macula in several retinal layers (RNFL, GCL, IPL, OPL and RPE), but with thickening of the macula in some other retinal layers (INL and ONL).
7. Mild AD is associated with significant changes in the peripapillary thickness of the RNFL, while moderate AD is associated with significant thinning in the superonasal and inferotemporal sectors.
8. Mild AD is associated with a thinning of the subfoveal, nasal and inferior choroids.
9. The foveal avascular zone in patients with mild AD does not show significant differences from the corresponding zone in healthy controls.

- 10.** Papillary oxyhemoglobin levels are similar between patients with mild AD and healthy controls.
- 11.** The presence of mild or moderate AD is best predicted based on nasal and inferior choroidal thickness, or based on contrast sensitivity at any frequencies (though higher frequencies are better).
- 12.** Results on all psychophysical ophthalmological tests correlate with the Mini Mental State Examination (MMSE) score.
- 13.** In OCT analysis, changes in the thickness of the peripapillary fiber layer correlate better than macular changes with AD progression based on MMSE score.
- 14.** Contrast sensitivity and OCT results correlate best in the macular area.
- 15.** Retinas from a mouse model of AD show signs of microglial activation: increased number of microglia, thickening of their soma, retraction of their extensions, and their movements within and between layers. This glial reactivity alters the microglial plexus.
- 16.** Retinas from a mouse model of AD contain circular microglia clusters that show reorientation and polarization of their processes towards the interior of the circle. This may be a consequence of AD-associated protein aggregation.
- 17.** Reactive gliosis caused by AD-associated protein aggregation may trigger morphological changes in the retinas of AD patients.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging and the alzheimer's association workgroup. *Alzheimer's and Dementia*. 2011;7(3):263-269.
2. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA work group\* under the auspices of department of health and human services task force on alzheimer's disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-939.
3. Klafki H, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J. Therapeutic approaches to alzheimer's disease. *Brain*. 2006;129(11):2840-2855.
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Envejecimiento. <http://www.who.int/topics/ageing/es/>. Updated 2012. Accessed 12/07/2012, .
5. Millán Calenti JC. *Gerontología y geriatría : Valoración e intervención*. Madrid : Médica Panamericana,; 2010.
6. Calenti M, Carlos J. *Principios de geriatría y gerontología*. McGraw-Hill Interamericana de España; 2006.
7. Grupo del Banco Mundial. <http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.DYN.LE00.IN>. Updated 2012. Accessed 07/18, 2012.
8. Instituto Nacional de Estadística. Esperanza de vida. [http://www.ine.es/ss/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=attachment%3B+filename%3D4\\_1\\_Esperanza\\_de\\_vid.pdf&blobkey=urldata&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1259926380048%2F300%2F4.1+Esperanza+de+vid.pdf&ssbinary=true](http://www.ine.es/ss/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=attachment%3B+filename%3D4_1_Esperanza_de_vid.pdf&blobkey=urldata&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1259926380048%2F300%2F4.1+Esperanza+de+vid.pdf&ssbinary=true). Updated 2017. Accessed 6/10/2017, 2017.
9. Franco Y, Mendoza-Fernández V, Lemini C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. *Rev Fac Med UNAM*. 2003;46(3).
10. Roush W. Live long and prosper? *Science*. 1996;273(5271):42-46.
11. Holden C. The developing world: New populations of old add to poor nations' burdens. *Science*. 1996;273(5271):46-40.
12. Birren JE, Zarit JM. Concepts of health, behavior, and aging. *Cognition, stress, and aging*. 1985:1-20.
13. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217.
14. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of koch-like criteria. *Ageing research reviews*. 2012;12(2), 661-684..
15. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-1485.
16. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585-621.
17. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350(6319):569.
18. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: The path from maize, tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006;12(10):1133-1138.
19. Robbins SL, Kumar V, Abbas AK, Cotran RS, Fausto N. *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. WB Saunders Company; 2010.
20. Talens RP, Christensen K, Putter H, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: Cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Ageing Cell*. 2012;11(4):694-703.
21. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:959-991.

22. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-1075.
23. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-332.
24. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing research reviews*. 2011;10(2):205-215.
25. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009;325(5937):201-204.
26. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*. 2010;328(5976):321-326.
27. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012;489(7415):318-321.
28. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-395.
29. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011;333(6046):1109-1112.
30. Harman D. The free radical theory of aging: Effect of age on serum copper levels. *J Gerontol*. 1965;20(2):151-153.
31. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10):569-576.
32. Campisi J, di Fagagna Fd. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(9):729-740.
33. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223-233.
34. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-2479.
35. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-352.
36. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell*. 2012;148(1):46-57.
37. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-293.
38. Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):681-691.
39. Zhang G, Li J, Purkayastha S, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211-216.
40. Reuter-Lorenz PA. New visions of the aging mind and brain. *Trends Cogn Sci (Regul Ed)*. 2002;6(9):394-400.
41. Creasey H, Rapoport SI. The aging human brain. *Ann Neurol*. 1985;17(1):2-10.
42. Hedden T, Gabrieli JDE. Insights into the ageing mind: A view from cognitive neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(2):87-96.
43. Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Terry R. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology*. 1993;43(1 Part 1):192-192.
44. Hof PR, Morrison JH. The aging brain: Morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci*. 2004;27(10):607-613.
45. Pappolla M, Omar R, Saran B. The “normal” brain. “abnormal” ubiquitinated deposits highlight an age-related protein change. *The American journal of pathology*. 1989;135(4):585.

46. Nakano M, Oenzil F, Mizuno T, Gotoh S. Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology*. 1995;41(2):69-80.
47. Coria F, Moreno A, Rubio I, Garcia M, Morato E. The cellular pathology associated with alzheimer  $\beta$ -amyloid deposits in non-demented aged individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1993;19(3):261-268.
48. Morris JC, McKeel Jr D, Storandt M, et al. Very mild alzheimer's disease informant-based clinical, psychometric, and pathologic distinction from normal aging. *Neurology*. 1991;41(4):469-469.
49. Boone KB, Miller BL, Lesser IM, et al. Neuropsychological correlates of white-matter lesions in healthy elderly subjects: A threshold effect. *Arch Neurol*. 1992;49(5):549.
50. Zeffass R, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Besthorn C, Hentschel F. Brain atrophy in normal ageing and alzheimer's disease. volumetric discrimination and clinical correlations. *The British Journal of Psychiatry*. 1995;167(6):739-746.
51. Reed BR, Eberling JL, Mungas D, Weiner M, Kramer JH, Jagust WJ. Effects of white matter lesions and lacunes on cortical function. *Arch Neurol*. 2004;61(10):1545.
52. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, et al. Vascular cognitive impairment. *The Lancet Neurology*. 2003;2(2):89-98.
53. Fratiglioni L, Mangialasche F, Qiu C. Brain aging: Lessons from community studies. *Nutr Rev*. 2010;68:S119-S127.
54. Grammas P, Martinez J, Miller B. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011;13(1).
55. Mrazek RE, Griffin S, Graham DI. Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(12):1269.
56. Li L, Lundkvist A, Andersson D, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2007;28(3):468-481.
57. Frith CD, Frith U. Implicit and explicit processes in social cognition. *Neuron*. 2008;60(3):503-510.
58. Sander M, Bergersen LH, Storm-Mathisen J. Molecular approaches to understanding neural network plasticity and memory: The kavli prize inaugural symposium on neuroscience. *Neuroscience*. 2009;163(4):965-976.
59. Santiago DC, Viadero CF. Cambios cerebrales en el envejecimiento normal y patológico. . 2012;12(1):21-36.
60. Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)*. 1973;232(2):331-356.
61. Alvarez VA, Sabatini BL. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:79-97.
62. VanGuilder HD, Farley JA, Yan H, et al. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):201-12.
63. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 2010;10;221(2):555-63.
64. Oh SR, Chokthaweesak W, Annunziata CC, Priel A, Korn BS, Kikkawa DO. Analysis of eyelid fat pad changes with aging. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*. 2011;27(5):348-351.
65. Shore JW. Changes in lower eyelid resting position, movement, and tone with age. *Am J Ophthalmol*. 1985;99(4):415-423.
66. Van Haeringen N. Aging and the lacrimal system. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(10):824-826.
67. Gipson IK. Age-related changes and diseases of the ocular surface and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(14):ORSF48-ORSF53.
68. Rada JA, Achen VR, Penugonda S, Schmidt RW, Mount BA. Proteoglycan composition in the human sclera during growth and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(7):1639-1648.

69. Grossniklaus HE, Nickerson JM, Edelhauser HF, Bergman LA, Berglin L. Anatomic alterations in aging and age-related diseases of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(14):ORSF23-ORSF27.
70. Barteselli G, Chhablani J, El-Emam S, et al. Choroidal volume variations with age, axial length, and sex in healthy subjects: A three-dimensional analysis. *Ophthalmology*. 2012;119(12):2572-8.
71. Ramrattan RS, van der Schaft, Theo L, Mooy CM, De Bruijn W, Mulder P, De Jong P. Morphometric analysis of bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(6):2857-2864.
72. Zhu W, Hong J, Zheng T, Le Q, Xu J, Sun X. Age-related changes of human conjunctiva on in vivo confocal microscopy. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(11):1448-1453.
73. Faragher R, Mulholland B, Tuft S, Sandeman S, Khaw P. Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(10):814-817.
74. McMenamin PG, Lee WR, Aitken DA. Age-related changes in the human outflow apparatus. *Ophthalmology*. 1986;93(2):194-209.
75. Salvi S, Akhtar S, Currie Z. Ageing changes in the eye. *Postgrad Med J*. 2006;82(971):581-587.
76. Birren JE, Casperson RC, Botwinick J. Age changes in pupil size. *J Gerontol*. 1950;5(3):216-221.
77. Sebag J. Ageing of the vitreous. *Eye*. 1987;1(2):254-262.
78. Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2001;73(5):601-615.
79. Grunwald JE, Piltz J, Patel N, Bose S, Riva CE. Effect of aging on retinal macular microcirculation: A blue field simulation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(13):3609-3613.
80. Moya FJ, Brigatti L, Caprioli J. Effect of aging on optic nerve appearance: A longitudinal study. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(5):567-572.
81. Dagnelie G. Age-related psychophysical changes and low vision. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(14):ORSF88-ORSF93.
82. Haegerstrom-Portnoy G, Schneck ME, Brabyn JA, Lott LA. Development of refractive errors into old age. *Optometry & Vision Science*. 2002;79(10):643-649.
83. Laycock R, Crewther SG, Crewther DP. A role for the 'magnocellular advantage' in visual impairments in neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007;31(3):363-376.
84. Martin PR, White AJ, Goodchild AK, Wilder HD, Sefton AE. Evidence that blue-on cells are part of the third geniculocortical pathway in primates. *Eur J Neurosci*. 1997;9(7):1536-1541.
85. Solomon SG, Lennie P. The machinery of colour vision. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(4):276-286.
86. Derefeldt G, Lennerstrand G, Lundh B. Age variations in normal human contrast sensitivity. *Acta Ophthalmol*. 1979;57(4):679-690.
87. Leat SJ, Chan LL, Maharaj P, et al. Binocular vision and eye movement disorders in older adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(5):3798-3805.
88. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G, Wu Y, Prina M. World alzheimer report 2015. the global impact of dementia. an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International, London*. 2015;2016(05/14).
89. Ackerknecht EH. *Breve historia de la psiquiatría*. Vol 2. Publicacions de la Universitat de València; 1993.
90. Puigbó JJ. Aulus cornelius celsus (25 aC-50 dC)" de medicina". *Gaceta Médica de Caracas*. 2002;110(4):517-539.
91. Philippe P. *Traité médico-philosophique sur l'aliénation mentale, ou la manie*. Paris, Editions Richard-Caille et Ravier. 1800.
92. Cacabelos R. Enfermedad de alzheimer: Etiopatogenia, neurobiología y genética molecular, diagnóstico y terapéutica. JR Prous. 1991.

93. Alzheimer A. *A characteristic disease of the cerebral cortex: Meeting of south-west germany psychiatrists held in tuingen on november 3rd and 4th, 1906*; 1907.
94. De la Vega R, Zambrano A. La demencia en la historia . *Circunvalación del Hipocampo*. 2012;Junio.
95. WHO, ed. *Dementia: A public health priority*. World Health Organization. 2012.
96. Alberca Serrano R, ed. *Enfermedad de alzheimer y otras demencias*. 4a. ed. Madrid: Médica Panamericana; 2010.
97. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2007;3(3):186-191.
98. Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Kawas CH, Jagust W. Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2005;229:43-49.
99. Hofman A, Ott A, Breteler M, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and alzheimer's disease in the rotterdam study. *The Lancet*. 1997;349(9046):151-154.
100. Luchsinger J, Reitz C, Honig LS, Tang M, Shea S, Mayeux R. Aggregation of vascular risk factors and risk of incident alzheimer disease. *Neurology*. 2005;65(4):545-551.
101. Ott A, Slioter A, Hofman A, et al. Smoking and risk of dementia and alzheimer's disease in a population-based cohort study: The rotterdam study. *Lancet*. 1998;351(9119):1840.
102. Juan D, Zhou D, Li J, Wang J, Gao C, Chen M. A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *European Journal of Neurology*. 2004;11(4):277-282.
103. Whitmer R, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology*. 2005;64(2):277-281.
104. Tyas SL, White LR, Petrovitch H, et al. Mid-life smoking and late-life dementia: The honolulu-asia aging study. *Neurobiol Aging*. 2003;24(4):589-596.
105. Ott A, Stolk R, Van Harskamp F, Pols H, Hofman A, Breteler M. Diabetes mellitus and the risk of dementia the rotterdam study. *Neurology*. 1999;53(9):1937-1937.
106. Skoog I, Nilsson L, Persson G, et al. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *The Lancet*. 1996;347(9009):1141-1145.
107. Kivipelto M, Helkala E, Laakso MP, et al. Midlife vascular risk factors and alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001;322(7300):1447-1451.
108. Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. . 2011;86(9):876.
109. Barnes DE, Whitmer RA, Yaffe K. Physical activity and dementia: The need for prevention trials. *Exerc Sport Sci Rev*. 2007;35(1):24-29.
110. Valenzuela MJ. Brain reserve and the prevention of dementia. *Current opinion in psychiatry*. 2008;21(3):296-302.
111. Li G, Shen Y, Chen C, Zhou Y, Li S, Lu M. A three-year follow-up study of age-related dementia in an urban area of beijing. *Acta Psychiatr Scand*. 1991;83(2):99-104.
112. Nitrini R, Caramelli P, Herrera Jr E, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling brazilian population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. 2004;18(4):241.
113. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *The British Journal of Psychiatry*. 1982;140(6):566-572.
114. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T. The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*. 1982;139(9):1136-1139.
115. Reisberg B. Functional assessment staging (FAST). *Psychopharmacol Bull*. 1987;24(4):653-659.
116. Reisberg B, Schneider L, Doody R, et al. Clinical global measures of dementia. position paper from the international working group on harmonization of dementia drug guidelines. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1997;11:8.

117. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2011;7(3):137-152.
118. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1449-1457.
119. Möller H. *Psiquiatria und psychotherapie: Duale reihe*. 2009;4.
120. CFAS M. Neuropathology group of the medical research council cognitive function and aged study. pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in england and wales. *Lancet*. 2001;357:169-175.
121. Jellinger KA. Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly-an update. *J Alzheimer's Dis*. 2006;9:61-70.
122. Viswanathan A, Rocca WA, Tzourio C. Vascular risk factors and dementia how to move forward? *Neurology*. 2009;72(4):368-374.
123. Gil Gregorio MS. *Tratado de geriatría para residentes*. Madrid: Sociedad Española de Geriatría y Gerontología; 2007.
124. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(1):56-67.
125. Jalbert JJ, Daiello LA, Lapane KL. Dementia of the alzheimer type. *Epidemiol Rev*. 2008;30(1):15-34.
126. Jack Jr CR, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*. 2010;9(1):119-128.
127. Vemuri P, Wiste H, Weigand S, et al. MRI and CSF biomarkers in normal, MCI, and AD subjects diagnostic discrimination and cognitive correlations. *Neurology*. 2009;73(4):287-293.
128. Ridha BH, Barnes J, Bartlett JW, et al. Tracking atrophy progression in familial alzheimer's disease: A serial MRI study. *The Lancet Neurology*. 2006;5(10):828-834.
129. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-356.
130. Small SA, Duff K. Linking a $\beta$  and tau in late-onset alzheimer's disease: A dual pathway hypothesis. *Neuron*. 2008;60(4):534-542.
131. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science; Science*. 1992; 256(5054), 184.
132. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298(5594):789-791.
133. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging and the alzheimer's association workgroup. *Alzheimer's and Dementia*. 2011.
134. Heron MP, Hoyert DL, Xu J, Scott C, Tejada-Vera B. Deaths: Preliminary data for 2006. *National vital statistics reports*. 2008;56(16):1-52.
135. Alzheimer's Association. 2018 alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2018;14(3):367-429.
136. Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: A delphi consensus study. *The Lancet*. 2006;366(9503):2112-2117.
137. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8):10.1101/cshperspect.a006239.
138. Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, et al. The lifetime risk of stroke estimates from the framingham study. *Stroke*. 2006;37(2):345-350.
139. Alzheimer's Association. 2010 alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2010;6(2):158-194.
140. Gurland BJ, Wilder DE, Lantigua R, et al. Rates of dementia in three ethnorracial groups. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999;14(6):481-493.

141. Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia diagnostic criteria for research studies: Report of the NINDS-AIREN international workshop\*. *Neurology*. 1993;43(2):250-250.
142. Román GC. Vascular dementia: Distinguishing characteristics, treatment, and prevention. *J Am Geriatr Soc*. 2003;51(5s2):S296-S304.
143. Xu W, Ferrari C, Wang H. Epidemiology of alzheimer's disease. En *Understanding Alzheimer's Disease*. InTech. 2013.
144. Korczyn AD, Vakhapova V. The prevention of the dementia epidemic. *J Neurol Sci*. 2007;257(1):2-4.
145. Virués-Ortega J, de Pedro-Cuesta J, Vega S, et al. Prevalence and european comparison of dementia in a ≥ 75-year-old composite population in spain. *Acta Neurol Scand*. 2011;123(5):316-324.
146. Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: Prevalence, management, and risk factors. *The Lancet Neurology*. 2008;7(9):812-826.
147. Lopez OL, Kuller LH, Fitzpatrick A, Ives D, Becker JT, Beauchamp N. Evaluation of dementia in the cardiovascular health cognition study. *Neuroepidemiology*. 2003;22(1):1-12.
148. Meites J, Goya R, Takahashi S. Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol*. 1987;22(1):1-15.
149. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189-198.
150. Lobo A, Escobar V, Ezquerro J, Seva Díaz A. " El mini-examen cognoscitivo"(un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos). *Revista de psiquiatría y Psicología Médica*. 1980.
151. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *The British Journal of Psychiatry*. 1968;114(512):797-811.
152. Besga Basterra A. *Neuroimagen estructural y funcional en pacientes con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer*. 2009. (Doctoral dissertation, UCM, Servicio de Publicaciones).
153. Kazemifar S, Manning KY, Rajakumar N, et al. Spontaneous low frequency BOLD signal variations from resting-state fMRI are decreased in alzheimer disease. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178529.
154. Maestú C, Gómez-Utrero E, Piñeiro R, Sola R. Magnetoencefalografía: Una nueva técnica de diagnóstico funcional en neurociencia. *Rev Neurol*. 1999;28(1077):90.
155. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(1):44-53.
156. Ramachandran VS. *Encyclopedia of the human brain*. Vol 4. Academic Press; 2002.
157. Berson D. Retinal ganglion cell types and their central projections. *The senses: a comprehensive reference*. 2008;1:491-520.
158. Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:29-35.
159. Schwartz M, Belkin M, Yoles E, Solomon A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: Neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma*. 1996;5(6):427-432.
160. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Crowe MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*. 1997;3(1):73-76.
161. Yoles E, Schwartz M. Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: Implications for optic nerve neuropathies. *Exp Neurol*. 1998;153(1):1-7.
162. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, D'Anna SA, Kerrigan D, Pease ME. Optic nerve transection in monkeys may result in secondary degeneration of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(5):975-982.
163. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Zack DJ, Pease ME, Valenta DF. A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(8):3388-3393.

164. Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez M, Thanos S, Aguayo AJ. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *The Journal of neuroscience*. 1987;7(9):2894-2909.
165. Villegas-Perez M, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *The Journal of neuroscience*. 1988;8(1):265-280.
166. Keirstead S, Rasminsky M, Fukuda Y, Carter D, Aguayo A, Vidal-Sanz M. Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science*. 1989;246(4927):255-257.
167. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*. 1999;5(1):49-55.
168. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, et al. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: Possible therapy for optic neuropathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(13):7446-7451.
169. Lingor P, Teusch N, Schwarz K, et al. Inhibition of rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem*. 2007;103(1):181-189.
170. Benowitz L, Yin Y. Rewiring the injured CNS: Lessons from the optic nerve. *Exp Neurol*. 2008;209(2):389-398.
171. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science*. 1981;214(4523):931-933.
172. Streilein JW. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(11):879-889.
173. Kaur C, Foulds W, Ling E. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(6):622-647.
174. Willbanks GA, Wayne Streilein J. Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor- $\beta$ . *Eur J Immunol*. 1992;22(4):1031-1036.
175. Taylor A, Streilein J. Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3(2-3):112-118.
176. Ramón y Cajal S. *La rétine des vertébrés. La cellule*, 9, 119-259.
177. Reichenbach A, Bringmann A. Müller cells in the healthy retina. In: *Müller cells in the healthy and diseased retina*. Springer; 2010:35-214.
178. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. Neuronas y conducta. *Principios de neurociencia*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España. 2001:19-35.
179. de Hoz R, Rojas B, Ramirez AI, et al. Retinal macroglial responses in health and disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2954721.
180. Del Río-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. la microglia en estados normal. II. intervencio de la microglia en los processos patologicas. III. naturaleza probable de la microglia. *Bol Soc Espanola Biol*. 1919;9:69-120.
181. Wang M, Wong WT. Microglia-muller cell interactions in the retina. *Adv Exp Med Biol*. 2014;801:333-338.
182. Trivino A, Ramirez JM, Salazar JJ, Ramirez AI, Garcia-Sanchez J. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res*. 1996;36(14):2015-2028.
183. Ramirez JM, Salazar JJ. Implications of astroglia in glaucomatous damage. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83(6):339-342.
184. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25(4):397-424.

185. Newman EA. A dialogue between glia and neurons in the retina: Modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biol.* 2004;1(3):245-252.
186. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
187. Gallego B, Ramírez A, Salazar J, et al. Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa. *Rev.Esp.Glaucoma Hipert.Ocular.* 2013;3(2):197-211.
188. Pena JD, Taylor AW, Ricard CS, Vidal I, Hernandez MR. Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(2):209-218.
189. Pena JD, Agapova O, Gabelt BT, et al. Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2303-2314.
190. Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. The role of muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* 1993;55(1):291-301.
191. Ridet J, Privat A. Reactive astrocytes, their roles in CNS injury, and repair mechanisms. *Advances in structural biology.* 2000;6:147-185.
192. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation.* 2012;9(92):1742-2094.
193. Tezel G, Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group. The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1001-1012.
194. Karageuzyan KG. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(1):85-98.
195. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor-alpha: A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia.* 2000;32(1):42-50.
196. Sappington RM, Calkins DJ. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(7):3004-3017.
197. 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):504-518.
198. Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol.* 1999;43 Suppl 1:S142-50.
199. Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(7):1940-1944.
200. Newman E, Reichenbach A. The muller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):307-312.
201. Kolb H. Glial cells of the retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The organization of the retina and visual system.* Salt Lake City (UT); 1995. NBK11516.
202. Labin AM, Safuri SK, Ribak EN, Perlman I. Muller cells separate between wavelengths to improve day vision with minimal effect upon night vision. *Nat Commun.* 2014;5:4319.
203. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of muller cells. *Glia.* 2013;61(5):651-678.
204. Schnitzer J. Astrocytes in mammalian retina. *Prog Retinal Res.* 1988;7:209-231.
205. Trivino A, Ramirez JM, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J. Retinal perivascular astroglia: An immunoperoxidase study. *Vision Res.* 1992;32(9):1601-1607.
206. Ramirez JM, Trivino A, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J. Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.* 1994;34(15):1935-1946.
207. Boya J, Calvo J, Prado A. The origin of microglial cells. *J Anat.* 1979;129(Pt 1):177-186.
208. Rojas B, Gallego BI, Ramirez AI, et al. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation.* 2014;11:133-2094-11-133.

209. Rieck J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):2393-2409.
210. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:219-240.
211. Grimaldi A, Brighi C, Peruzzi G, et al. Inflammation, neurodegeneration and protein aggregation in the retina as ocular biomarkers for alzheimer's disease in the 3xTg-AD mouse model. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):685-018-0740-5.
212. Jung YJ, Chung WS. Phagocytic roles of glial cells in healthy and diseased brains. *Biomol Ther (Seoul).* 2018;26(4):350-357.
213. Nassi JJ, Callaway EM. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nature Reviews Neuroscience.* 2009;10(5):360-372.
214. Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience.* 2010;11(8):563-576.
215. Mandal PK, Joshi J, Saharan S. Visuospatial perception: An emerging biomarker for alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2012;31:117-135.
216. Livingstone MS, Hubel DH. Psychophysical evidence for separate channels for the perception of form, color, movement, and depth. *The Journal of Neuroscience.* 1987;7(11):3416-3468.
217. Maunsell JH, Newsome WT. Visual processing in monkey extrastriate cortex. *Annu Rev Neurosci.* 1987;10(1):363-401.
218. Chatterjee S, Callaway EM. Parallel colour-opponent pathways to primary visual cortex. *Nature.* 2003;426(6967):668-671.
219. Roe AW, Ts'o DY. Visual topography in primate V2: Multiple representation across functional stripes. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3689-3715.
220. Braddick OJ, O'Brien JM, Wattam-Bell J, Atkinson J, Hartley T, Turner R. Brain areas sensitive to coherent visual motion. *Perception-London.* 2001;30(1):61-72.
221. Possin KL. Visual spatial cognition in neurodegenerative disease. *Neurocase.* 2010;16(6):466-487.
222. Zeki S. The disunity of consciousness. *Prog Brain Res.* 2007;168:11-268.
223. Van Essen DC, Gallant JL. Neural mechanisms of form and motion processing in the primate visual system. *Neuron.* 1994;13(1):1-10.
224. Mapstone M, Dickerson K, Duffy CJ. Distinct mechanisms of impairment in cognitive ageing and alzheimer's disease. *Brain.* 2008;131(Pt 6):1618-1629.
225. Prvulovic D, Hubl D, Sack A, et al. Functional imaging of visuospatial processing in alzheimer's disease. *Neuroimage.* 2002;17(3):1403-1414.
226. Rizzo M, Anderson SW, Dawson J, Nawrot M. Vision and cognition in alzheimer's disease. *Neuropsychologia.* 2000;38(8):1157-1169.
227. Tippett WJ, Black SE. Regional cerebral blood flow correlates of visuospatial tasks in alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society.* 2008;14(06):1034-1045.
228. Cronin-Golomb A, Sugiura R, Corkin S, Growdon JH. Incomplete achromatopsia in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1993;14(5):471-477.
229. Kurylo DD, Corkin S, Dolan RP, Rizzo JF, Parker SW, Growdon JH. Broad-band visual capacities are not selectively impaired in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1994;15(3):305-311.
230. Rizzo M, Anderson S, Dawson J, Myers R, Ball K. Visual attention impairments in alzheimer's disease. *Neurology.* 2000;54(10):1954-1959.
231. Cheung N, Mosley T, Islam A, et al. Retinal microvascular abnormalities and subclinical magnetic resonance imaging brain infarct: A prospective study. *Brain.* 2010;133(7):1987-1993.

232. Wong TY, Klein R, Couper DJ, et al. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: The atherosclerosis risk in communities study. *The Lancet*. 2001;358(9288):1134-1140.
233. Wong TY, Klein R, Klein BE, Tielsch JM, Hubbard L, Nieto FJ. Retinal microvascular abnormalities and their relationship with hypertension, cardiovascular disease, and mortality. *Surv Ophthalmol*. 2001;46(1):59-80.
234. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, et al. Cerebral white matter lesions, retinopathy, and incident clinical stroke. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2002;288(1):67-74.
235. Kalesnykas G, Tuulos T, Uusitalo H, Jolkkonen J. Neurodegeneration and cellular stress in the retina and optic nerve in rat cerebral ischemia and hypoperfusion models. *Neuroscience*. 2008;155(3):937-947.
236. Patton N, Aslam T, MacGillivray T, Pattie A, Deary IJ, Dhillon B. Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: A rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures. *J Anat*. 2005;206(4):319-348.
237. Baker ML, Hand PJ, Wang JJ, Wong TY. Retinal signs and stroke revisiting the link between the eye and brain. *Stroke*. 2008;39(4):1371-1379.
238. Wardlaw JM, Doubal F, Armitage P, et al. Lacunar stroke is associated with diffuse blood-brain barrier dysfunction. *Ann Neurol*. 2009;65(2):194-202.
239. Leibowitz U, Alter M. Optic nerve involvement and diplopia as initial manifestations of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1968;44(1):70-80.
240. McDonald W, Barnes D. The ocular manifestations of multiple sclerosis. 1. abnormalities of the afferent visual system. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1992;55(9):747.
241. Sørensen T, Frederiksen J, Brønnum-Hansen H, Petersen H. Optic neuritis as onset manifestation of multiple sclerosis A nationwide, long-term survey. *Neurology*. 1999;53(3):473-473.
242. Patel SJ, Lundy DC. Ocular manifestations of autoimmune disease. *Am Fam Physician*. 2002;66(6):991-998.
243. Gundogan FC, Tas A, Erdem U, Sobaci G. Retinal pathology in multiple sclerosis: Insight into the mechanisms of neuronal pathology. *Brain*. 2011;134(5):e171-e171.
244. Ghezzi A, Martinelli V, Torri V, et al. Long-term follow-up of isolated optic neuritis: The risk of developing multiple sclerosis, its outcome, and the prognostic role of paraclinical tests. *J Neurol*. 1999;246(9):770-775.
245. Söderström M. Optic neuritis and multiple sclerosis. *Acta Ophthalmol Scand*. 2001;79(3):223-227.
246. Regan D, Silver R, Murray TJ. Visual acuity and contrast sensitivity in multiple sclerosis--hidden visual loss: An auxiliary diagnostic test. *Brain*. 1977;100(3):563-579.
247. Balcer L, Baier M, Cohen J, et al. Contrast letter acuity as a visual component for the multiple sclerosis functional composite. *Neurology*. 2003;61(10):1367-1373.
248. Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, et al. Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to alzheimer dementia. *Neurology*. 2007;68(4):288-291.
249. Monteiro ML, Fernandes DB, Apóstolos-Pereira SL, Callegaro D. Quantification of retinal neural loss in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis with or without optic neuritis using fourier-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(7):3959-3966.
250. Frohman E, Costello F, Zivadinov R, et al. Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2006;5(10):853-863.
251. Zaveri MS, Conger A, Salter A, et al. Retinal imaging by laser polarimetry and optical coherence tomography evidence of axonal degeneration in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65(7):924.
252. Tátrai E, Simó M, Iljicsov A, Németh J, DeBuc DC, Somfai GM. In vivo evaluation of retinal neurodegeneration in patients with multiple sclerosis. *PloS one*. 2012;7(1):e30922.
253. Hu SJ, You YA, Zhang Y. A study of retinal parameters measured by optical coherence tomography in patients with multiple sclerosis. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(6):1211-1214.

254. Fisher JB, Jacobs DA, Markowitz CE, et al. Relation of visual function to retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology*. 2006;113(2):324-332.
255. Burkholder BM, Osborne B, Loguidice MJ, et al. Macular volume determined by optical coherence tomography as a measure of neuronal loss in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66(11):1366-1372.
256. Bodis-Wollner I. Foveal vision is impaired in parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;19(1):1-14.
257. Adam CR, Shrier E, Ding Y, Glazman S, Bodis-Wollner I. Correlation of inner retinal thickness evaluated by spectral-domain optical coherence tomography and contrast sensitivity in parkinson disease. *Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 2013;33(2):137-142.
258. Masson G, Mestre D, Blin O. Dopaminergic modulation of visual sensitivity in man. *Fundam Clin Pharmacol*. 1993;7(8):449-463.
259. Inzelberg R, Ramirez JA, Nisipeanu P, Ophir A. Retinal nerve fiber layer thinning in parkinson disease. *Vision Res*. 2004;44(24):2793-2797.
260. Altıntaş Ö, Işeri P, Özkan B, Çağlar Y. Correlation between retinal morphological and functional findings and clinical severity in parkinson's disease. *Documenta Ophthalmologica*. 2008;116(2):137-146.
261. Moschos MM, Tagaris G, Markopoulos I, et al. Morphologic changes and functional retinal impairment in patients with parkinson disease without visual loss. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21(1):24.
262. Yu J, Feng Y, Xiang Y, et al. Retinal nerve fiber layer thickness changes in parkinson disease: A meta-analysis. *PLOS ONE*. 2014;9(1):e85718.
263. Archibald NK, Clarke MP, Mosimann UP, Burn DJ. The retina in parkinson's disease. *Brain*. 2009;132(5):1128-1145.
264. Onofrij M, Ghilardi M, Basciani M, Gambi D. Visual evoked potentials in parkinsonism and dopamine blockade reveal a stimulus-dependent dopamine function in humans. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1986;49(10):1150-1159.
265. Katz B, Rimmer S. Ophthalmologic manifestations of alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol*. 1989;34(1):31-43.
266. Holroyd S, Shepherd ML. Alzheimer's disease: A review for the ophthalmologist. *Surv Ophthalmol*. 2001;45(6):516-524.
267. Jackson GR, Owsley C. Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurol Clin*. 2003;21(3):709-728.
268. Denise A. V. Alzheimer's disease: Visual system review. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*. 2010;81(1):12-21.
269. Frost S, Martins RN, Kanagasingam Y. Ocular biomarkers for early detection of alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2010;22(1):1-16.
270. Kirby E, Bandelow S, Hogervorst E. Visual impairment in alzheimer's disease: A critical review. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(1):15-34.
271. Bruban J, Dinet V, Mascarelli F. The role of amyloid-beta in retinal degeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2012;723:67-74.
272. Chiu K, Chan T, Wu A, Leung IY, So K, Chang RC. Neurodegeneration of the retina in mouse models of alzheimer's disease: What can we learn from the retina? *Age*. 2012;34(3):633-649.
273. Ikram MK, Cheung CY, Wong TY, Chen CP. Retinal pathology as biomarker for cognitive impairment and alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2012;83(9):917-922.
274. Parnell M, Guo L, Abdi M, Cordeiro MF. Ocular manifestations of alzheimer's disease in animal models. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;2012(Article ID 786494):13 pages.
275. Chiu K, So K, Chang RC. Progressive neurodegeneration of retina in alzheimer's Disease—Are  $\beta$ -amyloid peptide and tau new pathological factors in glaucoma? In: Rumelt S, ed. *Glaucoma - basic and clinical aspects*. ; 2013:157-177. 10.5772/53428.

276. Sivak JM. The aging eye: Common degenerative mechanisms between the alzheimer's brain and retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):871-880.
277. Tzekov RT, Mullan M. Vision function abnormalities in alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol*. 2013;59(4):414-433.
278. Ong Y, Ong Y, Ikram MK, Chen CLH, Wong TY, Cheung CY. Potential applications of spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) in the study of alzheimer's disease. *Proceedings of Singapore Healthcare Volume*. 2014;23(1):74.
279. Dehabadi MH, Davis BM, Wong TK, Cordeiro MF. Retinal manifestations of alzheimer's disease. *Neurodegenerative disease management*. 2014;4(3):241-252.
280. Thomson KL, Yeo JM, Waddell B, Cameron JR, Pal S. A systematic review and meta-analysis of retinal nerve fiber layer change in dementia, using optical coherence tomography. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2015; 1(2): 136-143.
281. Kopishinskaya S, Svetozarskiy S. Retinal optical coherence tomography in neurodegenerative diseases (review). *Sovremennye Tehnologii w Medicine*. 2015;7(1 (eng)):116-123.
282. Meijuan W, Yinbo Z, Zhongyong S, Chunbo L, Yuan S. Meta-analysis of the relationship of peripheral retinal nerve fiber layer thickness to alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Shanghai archives of psychiatry*. 2015;27(5):263.
283. Cunha JP, Moura-Coelho N, Proenca RP, et al. Alzheimer's disease: A review of its visual system neuropathology. optical coherence tomography-a potential role as a study tool in vivo. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016.
284. Javaid FZ, Brenton J, Guo L, Cordeiro MF. Visual and ocular manifestations of alzheimer's disease and their use as biomarkers for diagnosis and progression. *Front Neurol*. 2016;7:55.
285. Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of alzheimer's: Exploring disease in the retina. *Acta Neuropathol*. 2016;132(6), 767-787.
286. Feng R, Li L, Yu H, Liu M, Zhao W. Melanopsin retinal ganglion cell loss and circadian dysfunction in alzheimer's disease (review). *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3397-3400.
287. Lim JK, Li QX, He Z, et al. The eye as a biomarker for alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2016;10:536.
288. Wijngaarden P, Hadoux X, Alwan M, Keel S, Dirani M. Emerging ocular biomarkers of alzheimer's disease. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2016.
289. McGrory S, Cameron JR, Pellegrini E, et al. The application of retinal fundus camera imaging in dementia: A systematic review. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2016.
290. Salobar-García E, Ramírez AI, de Hoz R, et al. The impact of the eye in dementia: The eye and its role in diagnosis and follow-up. In Update on Dementia. InTech. 2016.
291. Cheung CY, Ikram MK, Chen C, Wong TY. Imaging retina to study dementia and stroke. *Prog Retin Eye Res*. 2017;57:89-107.
292. Ramirez AI, de Hoz R, Salobar-Garcia E, et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, parkinson, and glaucoma. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:214.
293. Shariflou S, Georgevsky D, Mansour H, et al. Diagnostic and prognostic potential of retinal biomarkers in early on-set alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2017;14(9):1000-1007.
294. Liao H, Zhu Z, Peng Y. Potential utility of retinal imaging for alzheimer's disease: A review. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:188.
295. Cerquera-Jaramillo MA, Nava-Mesa MO, González-Reyes RE, Tellez-Conti C, de-la-Torre A. Visual features in alzheimer's disease: From basic mechanisms to clinical overview. *Neural Plast*. 2018;14;2018:2941783.
296. Vickers J. The cellular mechanism underlying neuronal degeneration in glaucoma: Parallels with alzheimer's disease. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1997;25(2):105-109.
297. McKinnon SJ. Glaucoma: Ocular alzheimer's disease. *Front Biosci*. 2003;8:s1140-s1156.

298. Guo L, Duggan J, Cordeiro M. Alzheimers disease and retinal neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*. 2010;7(1):3-14.
299. Wostyn P, Audenaert K, De Deyn PP. Alzheimer's disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;110(2):101-109.
300. Kaarniranta K, Salminen A, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? *J Alzheimer's Dis*. 2011;24(4):615-631.
301. Ghiso JA, Doudevski I, Ritch R, Rostagno AA. Alzheimer's disease and glaucoma: Mechanistic similarities and differences. *J Glaucoma*. 2013;22 Suppl 5:S36-8.
302. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(2):120-130.
303. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 2009;7(1):65-74.
304. Lee S, Van Bergen NJ, Kong GY, et al. Mitochondrial dysfunction in glaucoma and emerging bioenergetic therapies. *Exp Eye Res*. 2011;93(2):204-212.
305. Lascaratos G, Garway-Heath DF, Willoughby CE, Chau KY, Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in glaucoma: Understanding genetic influences. *Mitochondrion*. 2012;12(2):202-212.
306. Chrysostomou V, Rezaia F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(1):12-15.
307. Campello L, Esteve-Rudd J, Cuenca N, Martin-Nieto J. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease. *Mol Neurobiol*. 2013;47(2):790-810.
308. Gazullaa J, Cavero-Nagoreb M. Glutamato y enfermedad de alzheimer. *Rev Neurol*. 2006;42(7):427-432.
309. Guimaraes JS, Freire MA, Lima RR, et al. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage. *Rev Neurol*. 2009;48(6):304-310.
310. Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(5):1291-1301.
311. Brown GC, Vilalta A. How microglia kill neurons. *Brain Res*. 2015;1628(Pt B):288-297.
312. Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, et al. Cytosolic  $\beta$ -amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with alzheimer's disease. *The Lancet*. 2003;361(9365):1258-1265.
313. Grus FH, Joachim SC, Pfeiffer N. Proteomics in ocular fluids. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1(8):876-888.
314. Prakasam A, Muthuswamy A, Ablonczy Z, et al. Differential accumulation of secreted AbetaPP metabolites in ocular fluids. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1243-1253.
315. Jindal V. Interconnection between brain and retinal neurodegenerations. *Molecular Neurobiology*. 2014;51(3):1-8.
316. Bei L, Shui Y, Bai F, Nelson SK, Van Stavern GP, Beebe DC. A test of lens opacity as an indicator of preclinical alzheimer disease. *Exp Eye Res*. 2015;140:117-123.
317. Pang J, Wu SM. Morphology and immunoreactivity of retrogradely double-labeled ganglion cells in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4886-4896.
318. Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. Optic-nerve degeneration in alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 1986;315(8):485-487.
319. Curcio CA, Drucker DN. Retinal ganglion cells in alzheimer's disease and aging. *Ann Neurol*. 1993;33(3):248-257.
320. Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RHI. Retinal pathology in alzheimer's disease. I. ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging*. 1996;17(3):377-384.
321. Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in alzheimer's disease. II. regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging*. 1996;17(3):385-395.

322. Tsai Y, Lu B, Ljubimov AV, et al. Ocular changes in TgF344-AD rat model of alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):523-534.
323. Chidlow G, Wood JP, Manavis J, Finnie J, Casson RJ. Investigations into retinal pathology in the early stages of a mouse model of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(2):655-675.
324. Williams PA, Thirgood RA, Oliphant H, et al. Retinal ganglion cell dendritic degeneration in a mouse model of alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(7):1799-1806.
325. Liu B, Rasool S, Yang Z, et al. Amyloid-peptide vaccinations reduce  $\beta$ -amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of alzheimer's transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2009;175(5):2099-2110.
326. Guo L, Salt TE, Luong V, et al. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13444-13449.
327. Du LY, Chang LY, Ardiles AO, et al. Alzheimer's disease-related protein expression in the retina of octodon degus. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135499.
328. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Koronyo Y, et al. Melanopsin retinal ganglion cell loss in alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2016;79(1):90-109.
329. Schmidt TM, Chen SK, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: Many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. 2011;34(11):572-580.
330. Sadun AA, Schaechter JD, Smith LE. A retinohypothalamic pathway in man: Light mediation of circadian rhythms. *Brain Res*. 1984;302(2):371-377.
331. Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):73-88.
332. Hannibal J, Fahrenkrug J. Neuronal input pathways to the brain's biological clock and their functional significance. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2006;182:1-71.
333. Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG. Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci*. 2003;17(9):1793-1801.
334. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA, et al. Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain*. 2010;133(Pt 8):2426-2438.
335. Feigl B, Mattes D, Thomas R, Zele AJ. Intrinsically photosensitive (melanopsin) retinal ganglion cell function in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4362-4367.
336. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J, Montagna P, Sadun AA, Carelli V. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: Implications for human diseases. *Vision Res*. 2011;51(2):296-302.
337. Georg B, Ghelli A, Giordano C, et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are resistant to cell injury, but not always. *Mitochondrion*. 2017;36:77-84.
338. Hatfield CF, Herbert J, van Someren EJ, Hodges JR, Hastings MH. Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early alzheimer's dementia. *Brain*. 2004;127(Pt 5):1061-1074.
339. Oliveira-Souza FG, DeRamus ML, van Groen T, Lambert AE, Bolding MS, Strang CE. Retinal changes in the tg-SwDI mouse model of alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2017;354:43-53.
340. Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):399-412.
341. Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:180-195.
342. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Glial cytokines in alzheimer's disease: Review and pathogenic implications. *Hum Pathol*. 1995;26(8):816-823.
343. Wyss-Coray T. Inflammation in alzheimer disease: Driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*. 2006;12(9):1005-1015.

344. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 2003;9(4):453-457.
345. Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. an immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 1982;57(2-3):239-242.
346. McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987;79(1-2):195-200.
347. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in down syndrome and alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(19):7611-7615.
348. Tooyama I, Kimura H, Akiyama H, McGeer PL. Reactive microglia express class I and class II major histocompatibility complex antigens in alzheimer's disease. *Brain Res*. 1990;523(2):273-280.
349. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, et al. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*. 1998;152(1):307-317.
350. Sarlus H, Heneka MT. Microglia in alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3240-3249.
351. Kamphuis W, Orre M, Kooijman L, Dahmen M, Hol EM. Differential cell proliferation in the cortex of the APPswPS1dE9 alzheimer's disease mouse model. *Glia*. 2012;60(4):615-629.
352. Olmos-Alonso A, Schettters ST, Sri S, et al. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of alzheimer's-like pathology. *Brain*. 2016;139(Pt 3):891-907.
353. Kamphuis W, Kooijman L, Schettters S, Orre M, Hol EM. Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1847-1860.
354. Martin E, Boucher C, Fontaine B, Delarasse C. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in alzheimer's disease models: Effects of aging and amyloid pathology. *Aging Cell*. 2017;16(1):27-38.
355. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. 2015;18(11):1584-1593.
356. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-487.
357. Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J. Amyloid- $\beta$  deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of alzheimer disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):5136-5143.
358. Perez SE, Lumayag S, Kovacs B, Mufson EJ, Xu S. B-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APPsw/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):793-800.
359. Krasodomska K, Lubiński W, Potemkowski A, Honczarenko K. Pattern electroretinogram (PERG) and pattern visual evoked potential (PVEP) in the early stages of alzheimer's disease. *Documenta ophthalmologica*. 2010;121(2):111-121.
360. Veerhuis R. Histological and direct evidence for the role of complement in the neuroinflammation of AD. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8(1):34-58.
361. Alexandrov PN, Pogue A, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Retinal amyloid peptides and complement factor H in transgenic models of alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2011;22(12):623-627.
362. Ratnayaka JA, Serpell LC, Lotery AJ. Dementia of the eye: The role of amyloid beta in retinal degeneration. *Eye (Lond)*. 2015;29(8):1013-1026.
363. Wang J, Zhu C, Xu Y, Liu B, Wang M, Wu K. Development and expression of amyloid-beta peptide 42 in retinal ganglion cells in rats. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(8):1401-1405.
364. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994;264(5163):1336-1340.
365. Ohno-Matsui K. Parallel findings in age-related macular degeneration and alzheimer's disease. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30(4):217-238.

366. Dutescu RM, Li QX, Crowston J, Masters CL, Baird PN, Culvenor JG. Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of alzheimer's disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(9):1213-1221.
367. Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH. The alzheimer's A beta - peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11830-11835.
368. Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA. Retinal ganglion cell degeneration in alzheimer's disease. *Brain Res*. 1989;501(2):364-372.
369. Ho CY, Troncoso JC, Knox D, Stark W, Eberhart CG. Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of alzheimer's and parkinson's disease patients. *Brain Pathol*. 2014;24(1):25-32.
370. Kerbage C, Sadowsky CH, Jennings D, Cagle GD, Hartung PD. Alzheimer's disease diagnosis by detecting exogenous fluorescent signal of ligand bound to beta amyloid in the lens of human eye: An exploratory study. *Front Neurol*. 2013;4:62.
371. Kerbage C, Sadowsky CH, Tariot PN, et al. Detection of amyloid beta signature in the lens and its correlation in the brain to aid in the diagnosis of alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2015;30(8):738-745.
372. Michael R, Rosandic J, Montenegro GA, et al. Absence of beta-amyloid in cortical cataracts of donors with and without alzheimer's disease. *Exp Eye Res*. 2013;106:5-13.
373. Gasparini L, Anthony Crowther R, Martin KR, et al. Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: Effects on axonal viability. *Neurobiol Aging*. 2011;32(3):419-433.
374. Schon C, Hoffmann NA, Ochs SM, et al. Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS One*. 2012;7(12):e53547.
375. Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage*. 2011;54:S204-S217.
376. Koronyo Y, Biggs D, Barron E, et al. Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in alzheimer's disease. *JCI Insight*. 2017;2(16):10.1172/jci.insight.93621.
377. Kayabasi U, Sergott R, Rispoli M. Retinal examination for the diagnosis of alzheimer's disease. *Int J Ophthalmol Clin Res*. 2014;3(4).
378. Campbell MC, DeVries D, Emptage L, et al. Polarization properties of amyloid beta in the retina of the eye as a biomarker of alzheimer's disease. 2015:BM3A. 4.
379. Zhao H, Chang R, Che H, et al. Hyperphosphorylation of tau protein by calpain regulation in retina of alzheimer's disease transgenic mouse. *Neurosci Lett*. 2013;551:12-16.
380. Attems J, Lauda F, Jellinger KA. Unexpectedly low prevalence of intracerebral hemorrhages in sporadic cerebral amyloid angiopathy: An autopsy study. *J Neurol*. 2008;255(1):70-76.
381. Thal DR, Griffin WS, de Vos RA, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2008;115(6):599-609.
382. Hainsworth AH, Oommen AT, Bridges LR. Endothelial cells and human cerebral small vessel disease. *Brain Pathol*. 2015;25(1):44-50.
383. Masuzzo A, Dinet V, Cavanagh C, Mascarelli F, Krantic S. Amyloidosis in retinal neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2016;7:127.
384. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(12):723-738.
385. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: Emerging concepts. *J Stroke*. 2015;17(1):17-30.
386. Vinters HV. Emerging concepts in alzheimer's disease. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:291-319.
387. Lai AY, Dorr A, Thomason LA, et al. Venular degeneration leads to vascular dysfunction in a transgenic model of alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 4):1046-1058.

388. de la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder: Nosological evidence. *Stroke*. 2002;33(4):1152-1162.
389. Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009;118(1):103-113.
390. Berisha F, Fekete GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL. Retinal abnormalities in early alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(5):2285-2289.
391. Frost S, Kanagasingam Y, Sohrabi H, et al. Retinal vascular biomarkers for early detection and monitoring of alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*. 2013;3(2):e233.
392. Williams MA, McGowan AJ, Cardwell CR, et al. Retinal microvascular network attenuation in alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015;1(2):229-235.
393. Bulut M, Kurtulus F, Gozkaya O, et al. Evaluation of optical coherence tomography angiographic findings in alzheimer's type dementia. *Br J Ophthalmol*. 2017;102(2), 233-237.
394. Fekete GT, Hyman BT, Stern RA, Pasquale LR. Retinal blood flow in mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015;1(2):144-151.
395. Mroczkowska S, Benavente-Perez A, Patel S, Qin L, Bentham P, Gherghel D. Retinal vascular dysfunction relates to cognitive impairment in alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2014;28(4):366-367.
396. Cheung CY, Ong YT, Ikram MK, et al. Microvascular network alterations in the retina of patients with alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(2):135-142.
397. Cheung CY, Ong YT, Ikram MK, Chen C, Wong TY. Retinal microvasculature in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;42 Suppl 4:S339-52.
398. More SS, Vince R. Hyperspectral imaging signatures detect amyloidopathy in alzheimer's mouse retina well before onset of cognitive decline. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(2):306-315.
399. Trebbastoni A, Marcelli M, Mallone F, et al. Attenuation of choroidal thickness in patients with alzheimer disease: Evidence from an italian prospective study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2017;31(2):128-134.
400. Gharbiya M, Trebbastoni A, Parisi F, et al. Choroidal thinning as a new finding in alzheimer's disease: Evidence from enhanced depth imaging spectral domain optical coherence tomography. *J Alzheimer's Dis*. 2014;40(4):907-917.
401. Bayhan HA, Aslan Bayhan S, Celikbilek A, Tanik N, Gürdal C. Evaluation of the chorioretinal thickness changes in alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2014;43(2):145-151.
402. Bulut M, Yaman A, Erol MK, et al. Choroidal thickness in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's type dementia. *J Ophthalmol*. 2016;2016:7291257.
403. Cunha JP, Proença R, Dias-Santos A, et al. Choroidal thinning: Alzheimer's disease and aging. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2017;30;8:11-17.
404. Trebbastoni A, D'Antonio F, Bruscolini A, et al. Retinal nerve fibre layer thickness changes in alzheimer's disease: Results from a 12-month prospective case series. *Neurosci Lett*. 2016;26;629:165-170. .
405. Lee EJ, Kim TW, Lee DS, et al. Increased CSF tau level is correlated with decreased lamina cribrosa thickness. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8:6-015-0169-3.
406. Sadun A, Bassi C. Optic nerve damage in alzheimer's disease. *Ophthalmology*. 1990;97(1):9-17.
407. Syed AB, Armstrong RA, Smith C. A quantitative analysis of optic nerve axons in elderly control subjects and patients with alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2005;43(1):1-6.
408. Kusbeci T, Kusbeci OY, Mas NG, Karabekir HS, Yavas G, Yucel A. Stereological evaluation of the optic nerve volume in alzheimer disease. *J Craniofac Surg*. 2015;26(5):1683-1686.
409. Nishioka C, Poh C, Sun SW. Diffusion tensor imaging reveals visual pathway damage in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(1):97-107.

410. Loeffler K, Edward D, Tso M. Tau-2 immunoreactivity of corpora amylacea in the human retina and optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(8):2600-2603.
411. Cuzzo LM, Ross-Cisneros FN, Yee KM, Wang MY, Sadun AA. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is decreased in optic neuropathy of alzheimer's disease. *J Neuroophthalmol.* 2011;31(2):139-146.
412. Wang MY, Ross-Cisneros FN, Aggarwal D, Liang C, Sadun AA. Receptor for advanced glycation end products is upregulated in optic neuropathy of alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(3):381-389.
413. Tsai CS, Ritch R, Schwartz B, et al. Optic nerve head and nerve fiber layer in alzheimer's disease. *Arch Ophthalmol.* 1991;109(2):199-204.
414. Hedges III TR, Galves RP, Speigelman D, Barbas NR, Peli E, Yardley CJ. Retinal nerve fiber layer abnormalities in alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol Scand.* 1996;74(3):271-275.
415. Kromer R, Serbecic N, Hausner L, Aboul-enein F, Froelich L, Beutelspacher S. Detection of retinal nerve fiber layer defects in alzheimer's disease using SD-OCT. *Front Psychiatry.* 2014;5(22).
416. Danesh-Meyer H, Birch H, Ku JYF, Carroll S, Gamble G. Reduction of optic nerve fibers in patients with alzheimer disease identified by laser imaging. *Neurology.* 2006;67(10):1852-1854.
417. Kergoat H, Kergoat M, Justino L, Chertkow H, Robillard A, Bergman H. An evaluation of the retinal nerve fiber layer thickness by scanning laser polarimetry in individuals with dementia of the alzheimer type. *Acta Ophthalmol Scand.* 2001;79(2):187-191.
418. Bayer A, Ferrari F, Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 2002;47(3):165-168.
419. Scholtz C, Swettenham K, Brown A, Mann D. A histoquantitative study of the striate cortex and lateral geniculate body in normal, blind and demented subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1981;7(2):103-114.
420. Leuba G, Saini K. Pathology of subcortical visual centres in relation to cortical degeneration in alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995;21(5):410-422.
421. Leuba G, Saini K, Zimmermann V, Giannakopoulos P, Bouras C. Mild amyloid pathology in the primary visual system of nonagenarians and centenarians. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001;12(2):146-152.
422. Dugger BN, Tu M, Murray ME, Dickson DW. Disease specificity and pathologic progression of tau pathology in brainstem nuclei of alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett.* 2011;491(2):122-126.
423. Wong-Riley M, Antuono P, Ho K, et al. Cytochrome oxidase in alzheimer's disease: Biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems. *Vision Res.* 1997;37(24):3593-3608.
424. Iseki E, Matsushita M, Kosaka K, Kondo H, Ishii T, Amano N. Distribution and morphology of brain stem plaques in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1989;78(2):131-136.
425. Parvizi J, Van Hoesen GW, Damasio A. The selective vulnerability of brainstem nuclei to alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2001;49(1):53-66.
426. Dai J, Vliet JVD, Swaab DF, Buijs RM. Human retinohypothalamic tract as revealed by in vitro postmortem tracing. *J Comp Neurol.* 1998;397(3):357-370.
427. Swaab DF, Fliers E, Partiman T. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res.* 1985;342(1):37-44.
428. Goudsmit E, Hofman M, Fliers E, Swaab F. The supraoptic and paraventricular nuclei of the human hypothalamus in relation to sex, age and alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1990;11(5):529-536.
429. Stopa EG, Volicer L, Kuo-Leblanc V, et al. Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 1999;58(1):29-39.
430. Harper DG, Stopa EG, Kuo-Leblanc V, et al. Dorsomedial SCN neuronal subpopulations subserve different functions in human dementia. *Brain.* 2008;131(6):1609-1617.
431. Sherman SM, Mumford JA, Schnyer DM. Hippocampal activity mediates the relationship between circadian activity rhythms and memory in older adults. *Neuropsychologia.* 2015;75:617-625.

432. Wu Y, Swaab DF. Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and alzheimer's disease. *Sleep Med.* 2007;8(6):623-636.
433. Tranah GJ, Blackwell T, Stone KL, et al. Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. *Ann Neurol.* 2011;70(5):722-732.
434. Kaas JH, Lyon DC. Pulvinar contributions to the dorsal and ventral streams of visual processing in primates. *Brain Res Rev.* 2007;55(2):285-296.
435. Kuljis RO. Lesions in the pulvinar in patients with alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 1994;53(2):202-211.
436. Van Essen DC. Corticocortical and thalamocortical information flow in the primate visual system. *Prog Brain Res.* 2005;149:173-185.
437. Wandell BA, Dumoulin SO, Brewer AA. Visual field maps in human cortex. *Neuron.* 2007;56(2):366-383.
438. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-259.
439. Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of alzheimer's disease. In: *Ageing and dementia.* Springer; 1998:127-140.
440. Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, et al. The cortical signature of alzheimer's disease: Regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cerebral cortex.* 2009;19(3):497-510.
441. Hof PR, Bouras C, Constandinidis J, Morrison JH. Balit's syndrome in alzheimer's disease: Specific disruption of the occipito-parietal visual pathway. *Brain Res.* 1989;493(2):368-375.
442. Hof PR, Morrison JH. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in alzheimer's disease: II. primary and secondary visual cortex. *J Comp Neurol.* 1990;301(1):55-64.
443. Buee L, Hof P, Bouras C, et al. Pathological alterations of the cerebral microvasculature in alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol.* 1994;87(5):469-480.
444. Pearson R, Esiri M, Hiorns R, Wilcock G, Powell T. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1985;82(13):4531-4534.
445. Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in alzheimer's disease: A quantitative study of visual and auditory cortices. *The Journal of neuroscience.* 1987;7(6):1799-1808.
446. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with alzheimer's disease. *Cerebral Cortex.* 1991;1(1):103-116.
447. Beach T, McGeer E. Lamina-specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in alzheimer's disease visual cortex. *Brain Res.* 1988;463(2):357-361.
448. Baloyannis S. Dendritic pathology in alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2009;283(1):153-157.
449. Mavroudis IA, Fotiou DF, Manani MG, et al. Dendritic pathology and spinal loss in the visual cortex in alzheimer's disease: A golgi study in pathology. *Int J Neurosci.* 2011;121(7):347-354.
450. Leuba G, Kraftsik R. Visual cortex in alzheimer's disease: Occurrence of neuronal death and glial proliferation, and correlation with pathological hallmarks. *Neurobiol Aging.* 1994;15(1):29-43.
451. Paquet C, Boissonnot M, Roger F, Dighiero P, Gil R, Hugon J. Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2007;420(2):97-99.
452. Iseri PK, Altinas Ö, Tokay T, Yüksel N. Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in alzheimer disease. *Journal of neuro-ophthalmology.* 2006;26(1):18.
453. Valenti DA. Neuroimaging of retinal nerve fiber layer in AD using optical coherence tomography. *Neurology.* 2007;69(10):1060-1060.

454. Kesler A, Vakhapova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M. Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113(7):523-526.
455. Moreno-Ramos T, Benito-León J, Villarejo A, Bermejo-Pareja F. Retinal nerve fiber layer thinning in dementia associated with parkinson's disease, dementia with lewy bodies, and alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2013;34(3):659-664.
456. He XF, Liu YT, Peng C, Zhang F, Zhuang S, Zhang JS. Optical coherence tomography assessed retinal nerve fiber layer thickness in patients with alzheimer's disease: A meta-analysis. *International Journal of Ophthalmology*. 2012;5(3):401-405.
457. Parisi V, Restuccia R, Fattapposta F, Mina C, Bucci MG, Pierelli F. Morphological and functional retinal impairment in alzheimer's disease patients. *Clinical neurophysiology*. 2001;112(10):1860-1867.
458. Chi Y, Wang YH, Yang L. The investigation of retinal nerve fiber loss in alzheimer's disease. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2010;46(2):134-139.
459. Lu Y, Li Z, Zhang X, et al. Retinal nerve fiber layer structure abnormalities in early alzheimer's disease: Evidence in optical coherence tomography. *Neurosci Lett*. 2010;480(1):69-72.
460. Miller N, Drachman DA. The optic nerve A window into diseases of the brain? *Neurology*. 2006;67(10):1742-1743.
461. M Moschos M, Markopoulos I, Chatziralli I, et al. Structural and functional impairment of the retina and optic nerve in alzheimers disease. *Current Alzheimer Research*. 2012;9(7):782-788.
462. Shen Y, Shi Z, Jia R, et al. The attenuation of retinal nerve fiber layer thickness and cognitive deterioration. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;19;7:142.
463. Kirbas S, Turkyilmaz K, Anlar O, Tufekci A, Durmus M. Retinal nerve fiber layer thickness in patients with alzheimer disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2013;33(1):58-61.
464. Warner CV, Syc SB, Stankiewicz AM, et al. The impact of utilizing different optical coherence tomography devices for clinical purposes and in multiple sclerosis trials. *PLoS One*. 2011;6(8):e22947.
465. Fernandes DB, Raza AS, Nogueira RG, et al. Evaluation of inner retinal layers in patients with multiple sclerosis or neuromyelitis optica using optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2013;120(2):387-394.
466. Tatrai E, Simo M, Iljicsov A, Nemeth J, Debuc DC, Somfai GM. In vivo evaluation of retinal neurodegeneration in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(1):e30922.
467. Marziani E, Pomati S, Ramolfo P, et al. Evaluation of retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer thickness in alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(9):5953-5958.
468. Cunha LP, Lopes LC, Costa-Cunha LVF, et al. Macular thickness measurements with frequency domain-OCT for quantification of retinal neural loss and its correlation with cognitive impairment in alzheimer's disease. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153830.
469. Dorr A, Sahota B, Chinta LV, et al. Amyloid-beta-dependent compromise of microvascular structure and function in a model of alzheimer's disease. *Brain*. 2012;135(Pt 10):3039-3050.
470. Jiang H, Wei Y, Shi Y, et al. Altered macular microvasculature in mild cognitive impairment and alzheimer disease. *J Neuroophthalmol*. 2017;38(3):292-298..
471. Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, et al. High frequency of open-angle glaucoma in japanese patients with alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2006;246(1):79-83.
472. Lee CS, Larson EB, Gibbons LE, et al. Associations between recent and established ophthalmic conditions and risk of alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;2. pii: S1552-5260(18)33034-6.
473. 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;9:479.
474. Gupta N, Fong J, Ang LC, Yucel YH. Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol*. 2008;43(1):53-60.

475. Yan Z, Liao H, Chen H, et al. Elevated intraocular pressure induces amyloid-beta deposition and tauopathy in the lateral geniculate nucleus in a monkey model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(12):5434-5443.
476. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(2):S38-S46.
477. Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmol*. 2009;87(4):450-454.
478. Bach-Holm D, Kessing SV, Mogensen U, Forman JL, Andersen PK, Kessing LV. Normal tension glaucoma and alzheimer disease: Comorbidity? *Acta Ophthalmol*. 2012;90(7):683-685.
479. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(8):1063-1070.
480. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409-421.
481. Shimazawa M, Inokuchi Y, Okuno T, et al. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling. *J Neurochem*. 2008;107(1):279-290.
482. Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, et al. Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic alzheimer's disease mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e15477.
483. Edwards MM, Rodriguez JJ, Gutierrez-Lanza R, Yates J, Verkhatsky A, Luty GA. Retinal macroglia changes in a triple transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Exp Eye Res*. 2014;127:252-260.
484. Spires TL, Hyman BT. Transgenic models of alzheimer's disease: Learning from animals. *NeuroRx*. 2005;2(3):423-437.
485. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, George L, Tung YC, Kim KS, Wisniewski HM. Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2853-2857.
486. Olabarria M, Noristani HN, Verkhatsky A, Rodriguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of alzheimer's disease. *Glia*. 2010;58(7):831-838.
487. Muyliaert D, Kremer A, Jaworski T, et al. Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behav*. 2008;7 Suppl 1:57-66.
488. Rami L, Serradell M, Bosch B, Villar A, Molinuevo JL. Perception digital test (PDT) for the assessment of incipient visual disorder in initial alzheimer's disease. *Neurologia*. 2007;22(6):342-347.
489. Campbell FW, Robson JG. Application of fourier analysis to the visibility of gratings. *J Physiol*. 1968;197(3):551-566.
490. Roth A. Test-28 hue de roth selon Farnsworth-Munsell (manual). *Luneau, Paris*. 1966.
491. Verriest G. Further studies on acquired deficiency of color discrimination. *JOSA*. 1963;53(1):185-197.
492. Steinschneider T. A new method for presenting the results of the 28-hue test by means of numerical scores. In: *Colour vision deficiencies VIII*. Springer; 1987:151-155.
493. de la Rosa, Manuel Gonzalez, Gonzalez-Hernandez M, Sigut J, et al. Measuring hemoglobin levels in the optic nerve head: Comparisons with other structural and functional parameters of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):482-489.
494. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*. 1974;37(2):247-248.
495. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012;(65). pii: 3564. doi(65):10.3791/3564.
496. de Gracia P, Gallego BI, Rojas B, et al. Automatic counting of microglial cells in healthy and glaucomatous mouse retinas. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143278.
497. Geldmacher DS. Differential diagnosis of dementia syndromes. *Clin Geriatr Med*. 2004;20(1):27-44.

498. Salobar-Garcia E, Hoyas I, Leal M, et al. Analysis of retinal peripapillary segmentation in early alzheimer's disease patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015:636548.
499. Viggiano MP, Gori G, Zaccara G, Righi S, Vannucci M, Giovannelli F. Category-specific visual identification of filtered objects in alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007;44(2):125-139.
500. Van Hoesen GW, Hyman BT, Damasio AR. Entorhinal cortex pathology in alzheimer's disease. *Hippocampus*. 1991;1(1):1-8.
501. Aggleton JP, Shaw C. Amnesia and recognition memory: A re-analysis of psychometric data. *Neuropsychologia*. 1996;34(1):51-62.
502. Mayes AR, Holdstock JS, Isaac CL, Hunkin NM, Roberts N. Relative sparing of item recognition memory in a patient with adult-onset damage limited to the hippocampus. *Hippocampus*. 2002;12(3):325-340.
503. Greene JD, Hodges JR. Identification of famous faces and famous names in early alzheimer's disease. relationship to anterograde episodic and general semantic memory. *Brain*. 1996;119 ( Pt 1)(Pt 1):111-128.
504. Done DJ, Hajilou BB. Loss of high-level perceptual knowledge of object structure in DAT. *Neuropsychologia*. 2005;43(1):60-68.
505. Glosser G, Baker KM, de Vries JJ, Alavi A, Grossman M, Clark CM. Disturbed visual processing contributes to impaired reading in alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 2002;40(7):902-909.
506. Mendez M, Chekrier M, Meadows R. Depth perception in alzheimer's disease. *Percept Mot Skills*. 1996;83(3):987-995.
507. Sjostrand J, Laatikainen L, Hirvela H, Popovic Z, Jonsson R. The decline in visual acuity in elderly people with healthy eyes or eyes with early age-related maculopathy in two scandinavian population samples. *Acta Ophthalmol*. 2011;89(2):116-123.
508. Schlotterer G, Moscovitch M, Crapper-McLachlan D. Visual processing deficits as assessed by spatial frequency contrast sensitivity and backward masking in normal ageing and alzheimer's disease. *Brain*. 1984;107(1):309-325.
509. Wright CE, Drasdo N, Harding GF. Pathology of the optic nerve and visual association areas information given by the flash and pattern visual evoked potential, and the temporal and spatial contrast sensitivity function. *Brain*. 1987;110(1):107-120.
510. Mendez MF, Tomsak RL, Remler B. Disorders of the visual system in alzheimer's disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 1990;10(1):62-69.
511. Cronin-Golomb A, Corkin S, Rizzo JF, Cohen J, Growdon JH, Banks KS. Visual dysfunction in alzheimer's disease: Relation to normal aging. *Ann Neurol*. 1991;29(1):41-52.
512. Levine DN, Lee JM, Fisher C. The visual variant of alzheimer's disease A clinicopathologic case study. *Neurology*. 1993;43(2):305-305.
513. Lakshminarayanan V, Lagrave J, Kean ML, Dick M, Shankle R. Vision in dementia: Contrast effects. *Neurol Res*. 1996;18(1):9-15.
514. Martinelli V, Locatelli T, Comi G, et al. Pattern visual evoked potential mapping in alzheimers disease correlations with visuospatial impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1996;7(2):63-68.
515. Rizzo M, Nawrot M. Perception of movement and shape in alzheimer's disease. *Brain*. 1998;121(12):2259-2270.
516. Polo V, Rodrigo MJ, Garcia-Martin E, et al. Visual dysfunction and its correlation with retinal changes in patients with alzheimer's disease. *Eye (Lond)*. 2017;31(7):1034-1041.
517. Sadun A, Borchert M, DeVita E, Hinton D, Bassi C. Assessment of visual impairment in patients with alzheimer's disease. *Am J Ophthalmol*. 1987;104(15):113-120.
518. Liu D, Zhang L, Li Z, et al. Thinner changes of the retinal nerve fiber layer in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *BMC neurology*. 2015(1):14.
519. Chapman FM, Dickinson J, McKeith I, Ballard C. Association among visual hallucinations, visual acuity, and specific eye pathologies in alzheimer's disease: Treatment implications. *Am J Psychiatry*. 1999;156(12):1983-1985.

520. Murgatroyd C, Prettyman R. An investigation of visual hallucinosis and visual sensory status in dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2001;16(7):709-713.
521. Chiu P, Hsu M, Wang C, Tsai C, Pai M. Visual hallucinations in alzheimer's disease is significantly associated with clinical diagnostic features of dementia with lewy bodies. *PLoS one*. 2017;12(10):e0186886.
522. Leroi I, Voulgari A, Breitner JC, Lyketsos CG. The epidemiology of psychosis in dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2003;11(1):83-91.
523. Bernardin F, Schwan R, Lalanne L, et al. The role of the retina in visual hallucinations: A review of the literature and implications for psychosis. *Neuropsychologia*. 2017;99:128-138.
524. Uhlmann RF, Larson EB, Koepsell TD, Rees TS, Duckert LG. Visual impairment and cognitive dysfunction in alzheimer's disease. *Journal of general internal medicine*. 1991;6(2):126-132.
525. Schneider GE. Two visual systems. *Science*. 1969;163(3870):895-902.
526. Derrington AM, Lennie P. The influence of temporal frequency and adaptation level on receptive field organization of retinal ganglion cells in cat. *J Physiol*. 1982;333:343-366.
527. Webster MA. Evolving concepts of sensory adaptation. *F1000 Biol Rep*. 2012;4:21-21. Epub 2012 Nov 1.
528. Trick GL, Barris MC, Bickler-Bluth M. Abnormal pattern electroretinograms in patients with senile dementia of the alzheimer type. *Ann Neurol*. 1989;26(2):226-231.
529. Cronin-Golomb A, Rizzo J, Corkin S, Growdon J. Visual function in alzheimer's disease and normal aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;640:28-35.
530. Gilmore GC, Whitehouse PJ. Contrast sensitivity in alzheimer's disease: A 1-year longitudinal analysis. *Optometry & Vision Science*. 1995;72(2):83-91.
531. Bassi CJ, Solomon K, Young D. Vision in aging and dementia. *Optometry & Vision Science*. 1993;70(10):809-813.
532. Cormack FK, Tovee M, Ballard C. Contrast sensitivity and visual acuity in patients with alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2000;15(7):614-620.
533. Crow RW, Levin LB, LaBree L, Rubin R, Feldon SE. Sweep visual evoked potential evaluation of contrast sensitivity in alzheimer's dementia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(2):875-878.
534. Hutton JT, Morris JL, Elias JW, Poston JN. Contrast sensitivity dysfunction in alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43(11):2328-2328.
535. Baker D, Mendez M, Townsend J, Ilse P, Bright D. Optometric management of patients with alzheimer's disease. *J Am Optom Assoc*. 1997;68(8):483-494.
536. Cronin-Golomb A, Gilmore GC, Neargarder S, Morrison SR, Laudate TM. Enhanced stimulus strength improves visual cognition in aging and alzheimer's disease. *Cortex*. 2007;43(7):952-966.
537. Neargarder SA, Stone ER, Cronin-Golomb A, Oross S. The impact of acuity on performance of four clinical measures of contrast sensitivity in alzheimer's disease. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*. 2003;58(1):P54-P62.
538. Gilmore GC, Cronin-Golomb A, Neargarder SA, Morrison SR. Enhanced stimulus contrast normalizes visual processing of rapidly presented letters in alzheimer's disease. *Vision Res*. 2005;45(8):1013-1020.
539. Marmor MF. Contrast sensitivity versus visual acuity in retinal disease. *Br J Ophthalmol*. 1986;70(7):553-559.
540. Ward ME, Gelfand JM, Lui LY, et al. Reduced contrast sensitivity among older women is associated with increased risk of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2018;83(4):730-738.
541. Dargent-Molina P, Hays M, Breart G. Sensory impairments and physical disability in aged women living at home. *Int J Epidemiol*. 1996;25(3):621-629.
542. Lord SR, Clark R, Webster I. Visual acuity and contrast sensitivity in relation to falls in an elderly population. *Age Ageing*. 1991;20(3):175-181.

543. Luo H, Lin M, Castle N. Physical restraint use and falls in nursing homes: A comparison between residents with and without dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2011;26(1):44-50.
544. Wood S, Mortel KF, Hiscock M, Breitmeyer BG, Caroselli JS. Adaptive and maladaptive utilization of color cues by patients with mild to moderate alzheimer's disease. *Archives of Clinical Neuropsychology*. 1997;12(5):483-489.
545. Massoud F, Chertkow H, Whitehead V, Overbury O, Bergman H. Word-reading thresholds in alzheimer disease and mild memory loss: A pilot study. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. 2002;16(1):31-39.
546. Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH. Visual dysfunction predicts cognitive deficits in alzheimer's disease. *Optometry & Vision Science*. 1995;72(3):168-176.
547. Wijk H, Berg S, Sivik L, Steen B. Colour discrimination, colour naming and colour preferences among individuals with alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999;14(12):1000-1005.
548. Rizzo III JF, Cronin-Golomb A, Growdon JH, et al. Retinocalcarine function in alzheimer's disease: A clinical and electrophysiological study. *Arch Neurol*. 1992;49(1):93-101.
549. Pache M, Smeets CH, Gasio PF, et al. Colour vision deficiencies in alzheimer's disease. *Age Ageing*. 2003;32(4):422-426.
550. Pelak VS, Hills W. Vision in alzheimer's disease: A focus on the anterior afferent pathway. *Neurodegener Dis Manag*. 2018;8(1):49-67.
551. Salamone G, Di Lorenzo C, Mosti S, et al. Color discrimination performance in patients with alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;27(6):501-507.
552. Dacey DM, Lee BB. The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature*. 1994;367(6465):731-735.
553. Chan D, Crutch SJ, Warrington EK. A disorder of colour perception associated with abnormal colour after-images: A defect of the primary visual cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;71(4):515-517.
554. Brewer AA, Barton B. Changes in visual cortex in healthy aging and dementia. In: *Update on dementia*. InTech; 2016.
555. Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, et al. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(4):519-526.
556. Marchiafava PL, Longoni B. Melatonin as an antioxidant in retinal photoreceptors. *J Pineal Res*. 1999;26(3):184-189.
557. Bruban J, Glotin AL, Dinet V, et al. Amyloid-beta(1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells. *Aging Cell*. 2009;8(2):162-177.
558. Uchida A, Pillai JA, Bermel R, et al. Outer retinal assessment using spectral-domain optical coherence tomography in patients with alzheimer's and parkinson's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(7):2768-2777.
559. Hayes T, Morrone MC, Burr DC. Recognition of positive and negative bandpass-filtered images. *Perception*. 1986;15(5):595-602.
560. Braje WL, Tjan BS, Legge GE. Human efficiency for recognizing and detecting low-pass filtered objects. *Vision Res*. 1995;35(21):2955-2966.
561. Hughes HC, Nozawa G, Kitterle F. Global precedence, spatial frequency channels, and the statistics of natural images. *J Cogn Neurosci*. 1996;8(3):197-230.
562. Parker DM, Lishman JR, Hughes J. Role of coarse and fine spatial information in face and object processing. *J Exp Psychol Hum Percept Perform*. 1996;22(6):1448-1466.
563. Olds ES, Engel SA. Linearity across spatial frequency in object recognition. *Vision Res*. 1998;38(14):2109-2118.
564. Saumier D, Chertkow H, Arguin M, Whatmough C. Establishing visual category boundaries between objects: A PET study. *Brain Cogn*. 2005;59(3):299-302.

565. Bar M. A cortical mechanism for triggering top-down facilitation in visual object recognition. *J Cogn Neurosci*. 2003;15(4):600-609.
566. Simao LM. The contribution of optical coherence tomography in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013;24(6):521-527.
567. Loh EH, Ong YT, Venketasubramanian N, et al. Repeatability and reproducibility of retinal neuronal and axonal measures on spectral-domain optical coherence tomography in patients with cognitive impairment. *Front Neurol*. 2017;8:359.
568. Ferrari L, Huang SC, Magnani G, Ambrosi A, Comi G, Leocani L. Optical coherence tomography reveals retinal neuroaxonal thinning in frontotemporal dementia as in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(3):1101-1107.
569. Ko F, Muthy ZA, Gallacher J, et al. Association of retinal nerve fiber layer thinning with current and future cognitive decline: A study using optical coherence tomography. *JAMA Neurol*. 2018;75(10):1198-1205.
570. Lad EM, Mukherjee D, Stinnett SS, et al. Evaluation of inner retinal layers as biomarkers in mild cognitive impairment to moderate alzheimer's disease. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192646.
571. Oktem EO, Derle E, Kibaroglu S, Oktem C, Akkoyun I, Can U. The relationship between the degree of cognitive impairment and retinal nerve fiber layer thickness. *Neurological Sciences*. 2015:1-6.
572. Mendez-Gomez J, Rougier M, Tellouck L, et al. Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness and the evolution of cognitive performance in an elderly population. *Frontiers in Neurology*. 2017;8:93.
573. Garcia-Martin ES, Rojas B, Ramirez AI, et al. Macular thickness as a potential biomarker of mild alzheimer's disease. *Ophthalmology*. 2014;121(5):1149-1151.
574. Ascaso FJ, Cruz N, Modrego PJ, et al. Retinal alterations in mild cognitive impairment and alzheimer's disease: An optical coherence tomography study. *J Neurol*. 2014:1-9.
575. Gao L, Liu Y, Li X, Bai Q, Liu P. Abnormal retinal nerve fiber layer thickness and macula lutea in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr*. 2015;60(1):162-167.
576. Giménez-Castejón D, Gómez-Gallego M, Martínez-Martínez ML, Dudekova M, Lajara-Blesa J. ¿ Hasta dónde llega la precocidad de la tomografía de coherencia óptica en el deterioro cognitivo? *Revista de Neurología*. 2016;63(1):5-10.
577. Choi SH, Park SJ, Kim NR. Macular ganglion cell -inner plexiform layer thickness is associated with clinical progression in mild cognitive impairment and alzheimers disease. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162202.
578. Garcia-Martin E, Bambo MP, Marques ML, et al. Ganglion cell layer measurements correlate with disease severity in patients with alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol*. 2016;96(2):e265-e266.
579. Jiang H, Liu Y, Wei Y, et al. Impaired retinal microcirculation in patients with alzheimer's disease. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192154.
580. Mutlu U, Bonnemaier PWM, Ikram MA, et al. Retinal neurodegeneration and brain MRI markers: The rotterdam study. *Neurobiol Aging*. 2017;60:183-191.
581. Cheung CY, Ong YT, Hilal S, et al. Retinal ganglion cell analysis using high-definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;45(1):45-56.
582. Pillai JA, Bermel R, Bonner-Jackson A, et al. Retinal nerve fiber layer thinning in alzheimer's disease: A case-control study in comparison to normal aging, parkinson's disease, and non-alzheimer's dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. 2016;31(5):430-436.
583. Knoll B, Simonett J, Volpe NJ, et al. Retinal nerve fiber layer thickness in amnesic mild cognitive impairment: Case-control study and meta-analysis. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2016;19(4):85-93.
584. Snyder PJ, Johnson LN, Lim YY, et al. Nonvascular retinal imaging markers of preclinical alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2016;4:169-178.

585. Santos CY, Johnson LN, Sinoff SE, Festa EK, Heindel WC, Snyder PJ. Change in retinal structural anatomy during the preclinical stage of alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2018;10:196-209.
586. Masland RH, Mills JW. Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *J Cell Biol*. 1979;83(1):159-178.
587. Massey SC, Neal MJ. The light evoked release of acetylcholine from the rabbit retina in vivo and its inhibition by gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem*. 1979;32(4):1327-1329.
588. Bowen DM, Benton JS, Spillane JA, Smith CC, Allen SJ. Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J Neurol Sci*. 1982;57(2-3):191-202.
589. Pike KE, Savage G, Villemagne VL, et al. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: Evidence for preclinical alzheimer's disease. *Brain*. 2007;130(Pt 11):2837-2844.
590. Reiman EM, Chen K, Liu X, et al. Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6820-6825.
591. Ong YT, Hilal S, Cheung CY, et al. Retinal neurodegeneration on optical coherence tomography and cerebral atrophy. *Neurosci Lett*. 2015;584:12-16.
592. Casaleto KB, Ward ME, Baker NS, et al. Retinal thinning is uniquely associated with medial temporal lobe atrophy in neurologically normal older adults. *Neurobiol Aging*. 2017;51:141-147.
593. Jindahra P, Petrie A, Plant GT. Retrograde trans-synaptic retinal ganglion cell loss identified by optical coherence tomography. *Brain*. 2009;132(Pt 3):628-634.
594. Malik M, Simpson JF, Parikh I, et al. CD33 alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci*. 2013;33(33):13320-13325.
595. Villegas-Llerena C, Phillips A, Garcia-Reitboeck P, Hardy J, Pocock JM. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2016;36:74-81.
596. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014;34(36):11929-11947.
597. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 2007;53(3):337-351.
598. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(4):193-201.
599. Jiang T, Yu JT, Tan L. Novel disease-modifying therapies for alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(3):475-492.
600. Li JW, Zong Y, Cao XP, Tan L, Tan L. Microglial priming in alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. 2018;6(10):176.
601. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*. 2004;62(11):1984-1989.
602. Kim M, Park KH, Kwon JW, Jeoung JW, Kim TW, Kim DM. Retinal nerve fiber layer defect and cerebral small vessel disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6882-6886.
603. Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci*. 2006;7:66-2202-7-66.
604. Leroy K, Bretteville A, Schindowski K, et al. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 2007;171(3):976-992.
605. Salobarra-Garcia E, de Hoz R, Rojas B, et al. Ophthalmologic psychophysical tests support OCT findings in mild alzheimer's disease. *Journal of Ophthalmology*. 2015;2015:Article ID 736949, 10 pages.
606. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6448-6453.
607. Walsh DT, Montero RM, Bresciani LG, et al. Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2002;10(1):20-27.

608. Walsh DT, Bresciani L, Saunders D, et al. Amyloid beta peptide causes chronic glial cell activation and neuro-degeneration after intravitreal injection. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005;31(5):491-502.
609. Anderson PJ, Watts H, Hille C, et al. Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):801-816.
610. Golzan SM, Goozee K, Georgevsky D, et al. Retinal vascular and structural changes are associated with amyloid burden in the elderly: Ophthalmic biomarkers of preclinical alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1):13-017-0239-9.
611. O'Bryhim BE, Apte RS, Kung N, Coble D, Van Stavern GP. Association of preclinical alzheimer disease with optical coherence tomographic angiography findings. *JAMA Ophthalmol*. 2018;136(11):1242-1248.
612. Delaey C, Van De Voorde J. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res*. 2000;32(6):249-256.
613. Cioffi G, Granstam E, Alm A. Circulación ocular. *Adler Fisiología del ojo (Aplicación clínica)(Décima Edición)(PL Kaufman, A Alm, Eds).Elsevier.Madrid*. 2004:747-784.
614. Ramírez J, Ramírez A, Salazar J, De Hoz R, Rojas B, Triviño A. Anatomofisiología de la úvea posterior: Coroides. *Degeneración macular asociada a la edad. Barcelona: Prous Science*. 2005;2005:128.
615. Yu DY, Alder VA, Cringle SJ, Brown MJ. Choroidal blood flow measured in the dog eye in vivo and in vitro by local hydrogen clearance polarography: Validation of a technique and response to raised intraocular pressure. *Exp Eye Res*. 1988;46(3):289-303.
616. Alm A, Bill A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (macaca irus): A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res*. 1973;15(1):15-29.
617. Alm A, Bill A. Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol Scand*. 1970;80(1):19-28.
618. Armaly MF, Araki M. Effect of ocular pressure on choroidal circulation in the cat and rhesus monkey. *Invest Ophthalmol*. 1975;14(8):584-591.
619. Bill A. Effects of acetazolamide and carotid occlusion on the ocular blood flow in unanesthetized rabbits. *Invest Ophthalmol*. 1974;13(12):954-958.
620. Friedman E. Choroidal blood flow. pressure-flow relationships. *Arch Ophthalmol*. 1970;83(1):95-99.
621. Geijer C, Bill A. Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18(10):1030-1042.
622. Takats I, Leiszter F. Relationship between blood flow velocity in the choroid and intraocular pressure in rabbits. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979;57(1):48-54.
623. Trivino A, De Hoz R, Salazar JJ, Ramirez AI, Rojas B, Ramirez JM. Distribution and organization of the nerve fiber and ganglion cells of the human choroid. *Anat Embryol (Berl)*. 2002;205(5-6):417-430.
624. Trivino A, de Hoz R, Rojas B, Salazar JJ, Ramirez AI, Ramirez JM. NPY and TH innervation in human choroidal whole-mounts. *Histol Histopathol*. 2005;20(2):393-402.
625. Kam JH, Lenassi E, Jeffery G. Viewing ageing eyes: Diverse sites of amyloid beta accumulation in the ageing mouse retina and the up-regulation of macrophages. *PLoS One*. 2010;5(10):e13127.
626. Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, Hof PR. The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and alzheimer's disease. *Neurol Res*. 2004;26(5):573-578.
627. Marchesi VT. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: Implications for early detection and therapy. *FASEB J*. 2011;25(1):5-13.
628. Miao J, Xu F, Davis J, Otte-Höller I, Verbeek MM, Van Nostrand WE. Cerebral microvascular amyloid  $\beta$  protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid  $\beta$  precursor protein. *The American journal of pathology*. 2005;167(2):505-515.

629. Diomedi M, Misaggi G. Vascular contribution to alzheimer disease: Predictors of rapid progression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12(4):532-537.
630. Crittin M, Riva CE. Functional imaging of the human papilla and peripapillary region based on flicker-induced reflectance changes. *Neurosci Lett*. 2004;360(3):141-144.
631. Mendez-Hernandez C, Garcia-Feijoo J, Arribas-Pardo P, et al. Reproducibility of optic nerve head hemoglobin measures. *J Glaucoma*. 2016;25(4):348-354.
632. Pena-Betancor C, Gonzalez-Hernandez M, Fumero-Batista F, et al. Estimation of the relative amount of hemoglobin in the cup and neuroretinal rim using stereoscopic color fundus images. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(3):1562-1568.
633. Medina-Mesa E, Gonzalez-Hernandez M, Sigut J, et al. Estimating the amount of hemoglobin in the neuroretinal rim using color images and OCT. *Curr Eye Res*. 2016;41(6):798-805.
634. Mendez-Hernandez C, Rodriguez-Una I, Gonzalez-de-la Rosa M, Arribas-Pardo P, Garcia-Feijoo J. Glaucoma diagnostic capacity of optic nerve head haemoglobin measures compared with spectral domain OCT and HRT III confocal tomography. *Acta Ophthalmol*. 2016;94(7):697-704.
635. Gonzalez-Hernandez M, Sigut Saavedra J, Gonzalez de la Rosa M. Relationship between retinal nerve fiber layer thickness and hemoglobin present in the optic nerve head in glaucoma. *J Ophthalmol*. 2017;2017:2340236.
636. Bambo MP, Garcia-Martin E, Perez-Olivan S, et al. Diagnostic ability of a new method for measuring haemoglobin levels in the optic nerve head in multiple sclerosis patients. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(12):1543-1548.
637. Bambo MP, Garcia-Martin E, Satue M, et al. Measuring hemoglobin levels in the optic disc of parkinson's disease patients using new colorimetric analysis software. *Parkinsons Dis*. 2014;2014:946540.
638. Bambo MP, Garcia-Martin E, Gutierrez-Ruiz F, et al. Analysis of optic disk color changes in alzheimer's disease: A potential new biomarker. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;132:68-73.
639. Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. Macro-and microglial responses in the fellow eyes contralateral to glaucomatous eyes. *Prog Brain Res*. 2015;220:155-172.
640. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
641. Madeira MH, Ambrosio AF, Santiago AR. Glia-mediated retinal neuroinflammation as a biomarker in alzheimer's disease. *Ophthalmic Res*. 2015;54(4):204-211.
642. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. 2012;121(1):4-27.
643. Pan XD, Zhu YG, Lin N, et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: Implications for alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011;6:45-1326-6-45.
644. Mizuno T. The biphasic role of microglia in alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:737846.
645. Bosco A, Crish SD, Steele MR, et al. Early reduction of microglia activation by irradiation in a model of chronic glaucoma. *PLoS One*. 2012;7(8):e43602.
646. de Hoz R, Ramirez AI, Gonzalez-Martin R, et al. Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. *Exp Eye Res*. 2018;171:12-29.
647. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res*. 2015;45:30-57.
648. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):89-105.



# 10. ANEXOS



## 10. ANEXOS

### 10.1 Carta de aceptación del proyecto de investigación por el comité de ética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.



#### Informe Dictamen Favorable Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. 11/372-E

9 de diciembre de 2011

CEIC Hospital Clínico San Carlos

#### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

#### CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "**Estudio clínico de detección precoz de demencia, mediante test visuales no invasivos como prueba complementaria**" con código interno nº 11/372-E del que es Investigadora Principal la **Dra. Elena Salobrar García Martín** del Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Universidad Complutense de Madrid, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Lo que firmo en Madrid, a 9 de diciembre de 2011

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

## 10.2 Hoja de recogida de datos.

Hospital Clínico San Carlos		 		Pegatina paciente
<b>TEST OFTALMOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE DETECCIÓN PRECOZ DE DETERIOROS COGNITIVOS</b>				
			<i>Fecha cita:</i>	<i>Hora:</i>
<b>Paciente:</b>				
Sexo:	Fecha de nacimiento:		Edad:	
<b>Grado educativo:</b>	<input type="checkbox"/> Básicos (< 8)	<input type="checkbox"/> Primarios (9-17)	<input type="checkbox"/> Superiores (>17)	
<b>Tipo de demencia:</b>	<input type="checkbox"/> EA	<input type="checkbox"/> Vascular	<input type="checkbox"/> Mixto (EA+Vascular)	
	<input type="checkbox"/> Parkinson	<input type="checkbox"/> Otro:	<input type="checkbox"/> Control	
<b>GSD:</b>	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3-4	<input type="checkbox"/> 4	<b>MMSE:</b> /30
<b>HxM:</b>	<input type="checkbox"/> HTA <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Hcolester <input type="checkbox"/> PIO ↑.		Tto demencia:	
	<input type="checkbox"/> Otros _____ En Tratamiento _____			
<b>Rx:</b>				
	OD:			AV:
	OI:			AV:
<b>TDP:</b>	<input type="checkbox"/> Pasa	<input type="checkbox"/> Falla		
<b>PIO:</b>				
	OD:			OI:
<b>Midriático:</b>	<input type="checkbox"/> Tropicamida	<input type="checkbox"/> Ciclopentolato		
<b>Farnsworth:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anómalo		
<b>Observaciones:</b>				

TEST OFTALMOLOGICOS EN EL ESTUDIO DE DETECCION PRECOZ DE DETERIOROS COGNITIVOS

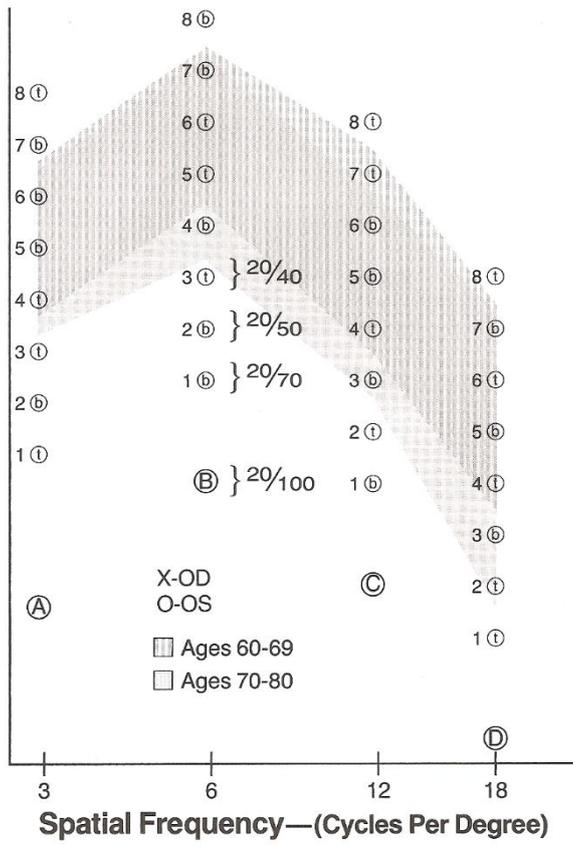
**TDP:**

A continuación le mostraré una fotografía borrosa colocada en 4 orientaciones diferentes. Tiene que indicarme cuál de ellas se encuentra en la posición correcta, teniendo en cuenta lo que cree que muestra la fotografía.

Item 1: la respuesta correcta es la número 3, puesto que la imagen que está fotografiada es la de un paisaje, donde el cielo se sitúa arriba.

Item	Respuesta	Correcta	Puntuación
1		3	0 - 1
2		1	0 - 1
3		2	0 - 1
4		4	0 - 1
5		2	0 - 1
6		4	0 - 1
7		1	0 - 1
8		3	0 - 1
9		2	0 - 1
10		4	0 - 1
11		1	0 - 1
12		3	0 - 1
13		2	0 - 1
14		1	0 - 1
15		4	0 - 1
<b>Total</b>			<b>/15</b>

### CSV-1000 Contrast Sensivity



Patient Name \_\_\_\_\_ Age \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Functional Acuity      OD \_\_\_\_\_ OS \_\_\_\_\_

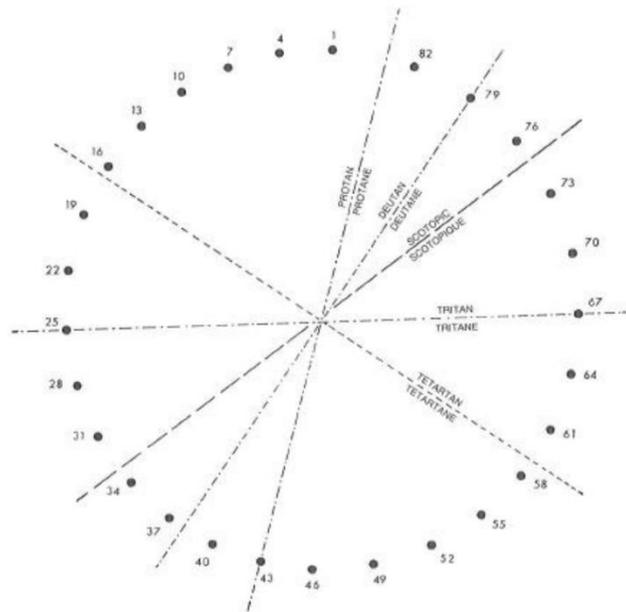
Standard Acuity      OD \_\_\_\_\_ OS \_\_\_\_\_

Comments \_\_\_\_\_

TEST OFTALMOLOGICOS EN EL ESTUDIO DE DETECCION PRECOZ DE DETERIOROS COGNITIVOS

**FARNSWORTH 28 HUE TEST**

TEST 28 HUE de ROTH selon FARNSWORTH-  
ROTH 28 HUE TEST according to FARNSWORTH-



Nom \_\_\_\_\_ Diagnostic \_\_\_\_\_  
Name

Age \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Ref. 15.86.99

LUNEAU OPHTALMOLOGIE - D.F. 00352 - 28005 CHARTRES CEDEX

## 10.3 Consentimiento informado



### Consentimiento Informado para Participantes de Investigación

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por D. José Manuel Ramírez Sebastián, D<sup>a</sup> Rosa de Hoz Montañana y D<sup>a</sup> Elena Salobar García Martín, de la Universidad Complutense de Madrid. La meta de este estudio es determinar el grado de afectación a nivel visual en pacientes con demencias orientado a una detección precoz de la demencia mediante test visuales como prueba complementaria.

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá realizar unos test no invasivos oftalmológicos. Esto tomará aproximadamente 60 minutos de su tiempo.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al examen visual serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso le perjudique en ninguna forma. Si alguno de los test durante la prueba le parecen incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no realizarlas.

Desde ya le agradecemos su participación.

---

Acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por D. José Manuel Ramírez Sebastián, D<sup>a</sup> Rosa de Hoz Montañana y D<sup>a</sup> Elena Salobar García Martín. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es detección precoz de la demencia mediante test visuales como prueba complementaria.

Me han indicado también que tendré que realizar unos test visuales, lo cual tomará aproximadamente 60 minutos.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona. De tener preguntas sobre mi participación en este estudio, puedo contactar a D<sup>a</sup> Elena Salobar García Martín al teléfono 913941669

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido. Para esto, puedo contactar al teléfono anteriormente mencionado.

Nombre del Participante  
(en letras de imprenta)

Firma del Participante

Fecha

## 10.4 Contrato predoctoral Formación al Profesorado Universitario (FPU).



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN, CULTURA  
Y DEPORTE



SECRETARÍA GENERAL DE  
UNIVERSIDADES

DIRECCIÓN GENERAL  
DE POLÍTICA UNIVERSITARIA

### MODELO DE ACTA DE ACEPTACIÓN DE AYUDA DE F.P.U

D./D<sup>a</sup>. Elena Salobar García Martín, nacido/a en [REDACTED] a el día, [REDACTED], domiciliado/a en, [REDACTED], con N.I.F. o Pasaporte nº 44402618Z.

Licenciado/Grado en Óptica y Optometría el día 24 de Julio de 2013, en la Universidad Complutense de Madrid, adjudicatario/a de una ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

#### DECLARO:

Que acepto la **Ayuda del Programa de Formación de Profesorado Universitario Referencia: FPU13/01910** en el centro de adscripción Universidad Complutense de Madrid, siendo el Director de la tesis el/la Dr./Dra. José Manuel Ramírez Sebastián. Aceptando las condiciones señaladas en la Convocatoria publicada por Resolución de 18 de noviembre de 2013 (BOE de 21 de noviembre):

#### CONOZCO:

- 1º Que la **Ayuda** citada tiene una duración máxima de 48 meses en régimen de contrato predoctoral, siendo requisito esencial estar matriculado en el periodo de investigación en un programa de doctorado.
- 2º Que del periodo máximo de la ayuda se descontarán los periodos en que se hubieran disfrutado de otras becas o ayudas similares en cuanto a objetivos y cuantías de acuerdo con los criterios establecidos en el artículo 21 de la Ley 14/2011 de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación.
- 3º Que la **ayuda** consta de una dotación mensual de 1.025 euros para los dos primeros años de contrato y de 1.173 euros para el tercero y cuarto año, más dos pagas extraordinarias cada año.
- 4º Que la presente **ayuda** está sujeta a las normas sobre incompatibilidades existentes que recoge la convocatoria y a las normas del centro al que se adscribe la misma.

En Madrid a, 1 de Julio de 2014  
EL/LA BENEFICIARIO/A DE LA AYUDA

EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA  
DE LA ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN

EL DIRECTOR DE TESIS,

Fdo. D/D<sup>a</sup>. José Francisco Tirado  
Fernández

Fdo. D/D<sup>a</sup>. José Manuel Ramírez Sebastián

## 10.5 Estancia internacional en la Universidad de Coimbra, Portugal

**Estancias breves en centros extranjeros a beneficiarios del subprograma de formación del profesorado universitario (FPU)** con resolución de 4 de abril de 2017, de la Secretaría de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades con referencia **EST16/00024**, con una beca para la estancia por valor de 3.480 € concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España.

- **Centro:** **IBILI** - *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences. Retinal Dysfunction & Neuroinflammation Lab. Universidad de Coimbra en Portugal.*
- **Duración:** **3 meses**, del 15 de Septiembre al 14 de Diciembre de 2017.

El **motivo** de la solicitud de una Estancia Breve en el marco del programa de formación del profesorado universitario (FPU) responde a que, en los últimos años, diferentes autores han observado adelgazamiento en la retina de los pacientes con EA. En nuestros estudios en humanos pudimos comprobar que no solo se producía un adelgazamiento en la retina, sino que en pacientes con una EA leve existían diversas áreas en las que se objetivaba un engrosamiento de la retina en comparación con los controles, cuando es analizada con la OCT. Este engrosamiento se creía que podía ser debido a un proceso inflamatorio microglial, en una etapa temprana de la EA, que precedería los procesos neurodegenerativos.

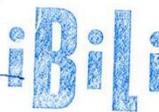
Por tanto, el **objetivo de la estancia** consistió en comprobar en los ratones triple transgénicos de EA (3xTgAD) con los que trabajaba el **Prof. Francisco Ambrosio**, del *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI)*, Facultad de Medicina, Universidad de Coimbra en Portugal, las alteraciones retinianas de las poblaciones microgliales Iba-1+ de la retina de este modelo animal comparándolos con los controles. En este trabajo, se pretendía dar explicación a las alteraciones de las capas de la retina obtenidas mediante OCT en nuestros pacientes con EA. El fin era comprender mejor el proceso de la neurodegeneración retiniana en la EA, para encontrar un biomarcador sencillo y en estadios tempranos, debido a la gran accesibilidad que tiene el examen de la retina.

Como **fruto de esta estancia** son los **resultados del capítulo 6.4 de esta Tesis Doctoral** y en estos momentos se está **escribiendo un artículo** colaborativo entre las dos instituciones (Universidad Complutense de Madrid y Universidad de Coimbra) para ser

enviado a una revista internacional de alto índice de impacto.

**PROGRAMA ESTATAL DE PROMOCIÓN DEL TALENTO  
Y SU EMPLEABILIDAD**

**CERTIFICADO DEL CENTRO RECEPTOR TRAS LA ESTANCIA BREVE O TRASLADO  
TEMPORAL**  
*CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION*

<b>1. Beneficiario/ Applicant:</b> FPU13/01910, <b>EST16/00024</b>
Nombre y apellidos/ <i>Name:</i> Elena Salobrar García Martín
D.N.I./ <i>National identity Card:</i> 44402618Z
Centro de adscripción de la beca/ <i>Home Institución:</i> Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid
<b>2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:</b>
Nombre/ <i>Name:</i> Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI). Faculty of Medicine. University of Coimbra
Dirección/ <i>Adress:</i> Polo III - Health Sciences Campus. Azinhaga Santa Comba, Celas. 3000-548 Coimbra
Localidad/ <i>Country:</i> Coimbra, Portugal
<b>3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host</b>
Institución/ <i>Institution:</i> Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI).
Nombre/ <i>Name:</i> António Francisco Rosa Gomes Ambrósio
Cargo/ <i>Post:</i> Investigador Principal en el <i>Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI)</i> , y líder del Grupo ' <i>Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab</i> '
<b>CERTIFICO:</b> que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde 15 / 09 / 2017 hasta 14 / 12/ 2017
<b>THIS IS TO CERTIFY:</b> <i>that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates:</i> <i>From: 15 / 09 / 2017 To: 14 / 12 / 2017</i>
Lugar y fecha: Coimbra, 14/12/2017 <i>City and date:</i>
Firma y Sello/ <i>Signature &amp; Stamp</i>
  <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; text-align: left; font-size: small;"> <p>Instituto de Imagem Biomédica &amp; Ciências da Vida — Faculdade de Medicina Universidade de Coimbra</p> </div>

## 10.6 Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral.

Este trabajo de investigación comienza en el año 2012. Se solicitó la ayuda predoctoral de beneficiarios del subprograma de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España, en la convocatoria del año 2013 en el área de Medicina Clínica y Epidemiología, la cual tuvo la resolución positiva el 22 de Agosto de 2014, con el código **FPU13/01910**.

El contrato predoctoral FPU comenzó el 15 de Septiembre de 2014 y terminó el 4 de Enero de 2019. La prórroga de 4 meses es debida a una baja por maternidad de Octubre de 2015 a Febrero de 2016.

A continuación se detallan las publicaciones y contribuciones a congresos que han dado lugar esta Tesis Doctoral, así como los premios obtenidos y la estancia de investigación.

### Publicaciones surgidas de los resultados de la tesis doctoral

1. **ES García-Martin**, B. Rojas, AI Ramírez, R. de Hoz, JJ. Salazar, R. Yubero, P. Gil, A. Triviño, JM. Ramírez.  
**“Macular thickness as a potential biomarker of mild Alzheimer’s Disease”**.  
*Ophthalmology*. Volume 121, Issue 5, Pages 1149-1151.e3, May 2014  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.12.023>. **Índice de impacto: 5.563, Q1**
2. **E. Salobar-García**, R. de Hoz, B. Rojas, AI. Ramirez, JJ. Salazar, R. Yubero, P. Gil, A. Triviño, JM. Ramirez  
**“Ophthalmologic Psychophysical Tests Support OCT Findings in Mild Alzheimer’s Disease”**. *Journal of Ophthalmology*. 2015, Volume 2015, Article ID 736949, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/736949>. **Índice de impacto: 1.684, Q3**
3. **E. Salobar-García**, I. Hoyas, M. Leal, R. de Hoz, B. Rojas, AI. Ramirez, JJ. Salazar, R. Yubero, P. Gil, A. Triviño, JM. Ramirez.  
**“Analysis of Retinal Peripapillary Segmentation in Early Alzheimer’s Disease Patients”**. *BioMed Research International*. 2015, Volume 2015, Article ID 636548. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/636548> **Índice de impacto: 2.149, Q3**
4. YM. García, C. Lostao, **E. Salobar-García**, L. Jañez Escalada, JM. Ramirez.  
**“Análisis topográfico del polo posterior maculopapilar en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve”**. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2017, 11 (1), p: 212-217.

---

## Publicaciones surgidas de la búsqueda bibliográfica para esta tesis doctoral, incluidas en los capítulos introducción y discusión

---

1. E. Salobrar-García, AI. Ramírez, R. De Hoz, P. Rojas, JJ. Salazar, B. Rojas, R. Yubero, P. Gil, A. Triviño and JM. Ramirez.  
*“The Impact of the Eye in Dementia: The Eye and Its Role in Diagnosis and follow up”* En: Update on dementia. 2016. Chapter 15. In Tech. 2016 ISBN 978-953-51-4833-3. <http://dx.doi.org/10.5772/64490>  
Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/update-on-dementia/the-impact-of-the-eye-in-dementia-the-eye-and-its-role-in-diagnosis-and-follow-up>
2. AI. Ramírez, R. de Hoz, E. Salobrar-García, JJ. Salazar, B. Rojas, D. Ajoy, I. López-Cuenca, P. Rojas, A. Triviño; JM. Ramírez.  
*“The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer’s disease, Parkinson, and Glaucoma”* Front. Aging Neurosci. 2017 doi: 10.3389/fnagi.2017.00214. *Índice de impacto: 4.504; Q1 (7/49)*.
3. JA .Fernández-Albarral\*,E. Salobrar-García\*, R. Martínez-Páramo, AI. Ramírez, R. de Hoz, JM. Ramírez, JJ. Salazar.  
*“Retinal glial changes in Alzheimer’s Disease. A review”*. Journal of Optometry. 2018. Oct 27. pii: S1888-4296(18)30080-3 DOI: 10.1016/j.optom.2018.07.001  
\*Ambos autores contribuyen por igual.

## 10.7 Comunicaciones en congresos con resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral.

### CONGRESOS INTERNACIONALES

#### 2013 y 2014-2015 (Primer año contrato predoctoral)

1. **ES. García-Martin**, B Rojas, R de Hoz, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
**“Contrast sensitivity in patients with Alzheimer’s dementia in initial stages”**  
*(Comunicación oral)*  
 III Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación de retina y Ciencias de la visión (SIRCOVA) 2013. Valencia. 6-8 Junio 2013  
 Abstract publicado en: Ophthalmic Res 2013;50: 29  
**Primer premio a la mejor comunicación de Investigación Clínica**
2. **ES. García-Martin**, R de Hoz, B Rojas, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
**“Macular nerve fiber layer measurement in initial Alzheimer’s Disease through optical coherence tomography”** *(Comunicación oral)*  
 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European Association for Vision and Eye Research (EVER-2013). Nice (Francia). 18-21 Septiembre 2013  
 Abstract publicado en: Acta Ophthalmologica; 2013; 91 (Suppl 252): 0
3. **ES. García-Martin**, B Rojas, R de Hoz, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
**“Relevance of contrast sensitivity for the diagnosis and monitoring of Alzheimer’s Disease in initial stages”** *(Comunicación en panel)*  
 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European Association for Vision and Eye Research (EVER-2013). Nice (Francia). 18-21 Septiembre 2013  
 Abstract publicado en: Acta Ophthalmologica; 2013; 91 (Suppl 252): 0
4. **ES. García-Martin**, R de Hoz, B Rojas, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
**“Disminución del espesor macular en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer leve medido con Tomografía de Coherencia Óptica”** *(Comunicación oral)*.  
 OPTOM 2014. 23º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 4-6 Abril 2014  
**Premio especial a la mejor comunicación científica presentada**
5. **ES. García-Martín**; R. de Hoz, B. Rojas; P. Gil; R. Yubero; A. Triviño; JM. Ramírez  
**“Usefulness of ophthalmology psychophysical test for diagnosis and monitoring support in Mild Alzheimer’s Disease”** *(Comunicación en panel)*

Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European Association for Vision and Eye Research (EVER-2014). Nice (Francia). 1-4 Octubre 2014 Abstract publicado en: *Acta Ophthalmologica*; 2014 92: 0. doi: 10.1111/j.1755-3768.2014.3675.x. **Seleccionado para la sesión especial de Rapid fire**

6. **ES. García-Martín; B. Rojas; R. de Hoz; AI. Ramirez; JJ Salazar; P. Gil; JM. Ramirez**  
***“Predictability of Visual Function Tests in the Alzheimer’s Neurodegeneration.”*** (Comunicación oral).  
 IV Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación de retina y Ciencias de la visión (SIRCOVA) 2014. Valencia. 7-8 Noviembre 2014  
 Abstract publicado en: *Ophthalmic Res* 2014; 52:175-197.  
 DOI:10.1159/000369084.

## 2016 (Segundo año contrato predoctoral)

7. **E. Salobrar-Garcia, Irene Hoyas, Blanca Rojas, Ana I Ramirez, Rosa de Hoz, Juan J Salazar, Pedro Gil, Raquel Yubero, Alberto Triviño, Jose M Ramirez**  
***“Variabilidad del espesor peripapilar de la retina en enfermedad de Alzheimer leve medido mediante OCT”*** (Comunicación oral).  
 OPTOM 2016. 24º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 8-10 Abril 2016.
8. **Elena Salobrar-Garcia, Rosa de Hoz, Juan J Salazar, Blanca Rojas, Ana I Ramirez, Pedro Gil, Raquel Yubero, Alberto Triviño, Jose M Ramirez**  
***“Los test optométricos psicofísicos apoyan los hallazgos de adelgazamiento en la retina observados mediante tomografía de coherencia óptica en pacientes con Alzheimer leve”*** (Comunicación oral).  
 OPTOM 2016. 24º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 8-10 Abril 2016.
9. **Elena Salobrar-Garcia, Irene Hoyas, Mercedes Leal, Rosa de Hoz, Pedro Gil, Raquel Yubero, Jose M Ramirez**  
***“Early changes in neuroretinal rim in mild Alzheimer’s Disease”***  
 (Comunicación oral).  
 V Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación de retina y Ciencias de la visión (SIRCOVA). Valencia. 30 de Junio a 2 de Julio de 2016  
**Premio a la mejor comunicación**
10. **E. Salobrar-García; M. Leal; I. Hoyas; JJ. Salazar; AI. Ramírez; R. de Hoz; B. Rojas; P. Gil; R. Yubero; A. Triviño; JM. Ramirez**  
***“Early changes in mild Alzheimer’s Disease in the neuroretinal rim segmentation”*** (Comunicación en panel)

European Association for Vision and Eye Research (EVER 2016). Nice (Francia).  
5-8 Octubre 2016

11. **E. Salobrar-García**; Y. García; C. Lostao; L. Jañez; R. de Hoz; B. Rojas; JJ. Salazar; AI. Ramírez; P. Gil; R. Yubero; A. Triviño; JM. Ramirez  
***“Maculopapillary analysis in the posterior pole in patients with mild Alzheimer’s disease”*** (Comunicación en panel).  
European Association for Vision and Eye Research (EVER 2016). Nice (Francia).  
5-8 Octubre 2016

### 2017 (Tercer año contrato predoctoral)

---

12. **E. Salobrar-García**, L. Hurtado, I. Lopez-Cuenca, R. de Hoz, J.J. Salazar, A.I. Ramirez, R. Yubero, P. Gil, J.M. Ramirez  
***“Assessment of the visual acuity, contrast sensitivity, color vision and visual integration in the Alzheimer’s disease progression according to the scale GDS”***  
(Comunicación en panel)  
European Association for Vision and Eye Research (EVER 2017). Nice (Francia).  
27-30 Septiembre 2017. Publicado como abstract en Acta Ophthalmologica, 2017,  
vol. 95, no S259.

### 2018 (Cuarto año contrato predoctoral)

---

13. **E. Salobrar-García**, L. Hurtado, I. López-Cuenca, R. de Hoz, AI. Ramirez, JJ Salazar, R. Yubero P. Gil, JM. Ramirez.  
***“Empeoramiento de la agudeza visual, sensibilidad al contraste, visión de color e integración visual en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer”***  
(Comunicación oral).  
OPTOM 2018. 25º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 13-15 Abril 2018.
14. JA. Fernandez-Albarral, **E. Salobrar-García**, AI. Ramirez, R. de Hoz, R. Martinez, JM Ramirez, JJ Salazar.  
***“Papel de la glía retiniana en la Enfermedad de Alzheimer”***  
OPTOM 2018. 25º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 13-15 Abril 2018.
15. **E. Salobrar-García**, I. López-Cuenca, R. de Hoz, R. Yubero, P. Gil, JM. Ramirez.  
***“OCT changes in the progression of Alzheimer’s Disease”*** (Comunicación oral).  
SIREV 2018. VI International Congress of Research in Retina and Vision. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 29-30 Junio 2018.

Publicado como abstract en Ophthalmic Res. 2018 Jun 27. doi: 10.1159/000490556

**Premiado con la 1ª Mención de Honor en Investigación Clínica.**

16. R. Vazirani Ballesteros, C. Amarante Cuadrado, **E. Salobar-García**, J.M. Ramirez.  
*“Retinal Vascular Parameters on Alzheimer’s Early Diagnosis and the Promising OCT Angiography”* (Comunicación oral).  
 SIREV 2018. VI International Congress of Research in Retina and Vision. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 29-30 Junio 2018.  
 Publicado como abstract en Ophthalmic Res. 2018 Jun 27. doi: 10.1159/000490556
17. **E. Salobar-García**, R. de Hoz, JJ. Salazar, AI. Ramirez, I. López-Cuenca, R. Yubero, P. Gil, JM. Ramírez  
*“Changes in the retina in the evolution of Alzheimer’s Disease”* (Comunicación en panel)  
 European Association for Vision and Eye Research (EVER 2018). Nice (Francia). 4-6 Octubre 2018.  
 Publicado como abstract en Acta Ophthalmologica, 2018.

## CONGRESOS NACIONALES

### 2013 y 2014-15 (Primer año contrato predoctoral)

18. **ES. García-Martin**  
*“Exploración oftalmológica en pacientes con deterioro cognitivo y demencia incipiente”* (Comunicación oral).  
 XI Simposio de Oftalmología Geriátrica “Enfermedades Neurodegenerativas y Visión” 2013. Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Madrid.
19. **ES. García-Martin**, B Rojas, R de Hoz, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
*“Análisis de la capa de fibras de retina mediante tomografía de coherencia óptica en pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadio inicial”* (Comunicación en panel).  
 55 Congreso de la Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología. Valencia. 12-14 Junio 2013. Abstract publicado en: Rev Esp Geriatr Gerontol. 2013; 48 (Espec Cong):1-36 (p-006).
20. **ES. García-Martin**, R de Hoz, B Rojas, R Yubero, P Gil, JM Ramírez  
*“Estudio de la sensibilidad al contraste en pacientes con Alzheimer en estadios iniciales”* (Comunicación en panel)  
 55 Congreso de la Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología. Valencia. 12-14 Junio 2013

Abstract publicado en: Rev Esp Geriatr Gerontol. 2013; 48(Espec Cong): 1-36 (p-239).

21. **ES. García-Martín.**

***“Medida de la capa de fibras nerviosas de retina en Enfermedad de Alzheimer leve mediante tomografía de coherencia óptica” (Comunicación oral).***

Jornada RETICS. Reunión Intergrupala OFTARED. Universidad de Murcia. Murcia (España). 18 de Diciembre 2013.

22. **ES. García-Martín, B. Rojas, R. De Hoz, P. Gil, R. Yubero, J.M. Ramírez Sebastián**

***“Métodos de examen en oftalmología para apoyo del diagnóstico y seguimiento en EA leve” (Comunicación oral).***

56 Congreso de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. SEGG 2014. Barcelona. 21-23 de Mayo de 2014. Abstract publicado en: Rev Esp Geriatr Gerontol. 2014; 49 (Espec Cong): 1-37 (CO-011)

23. **ES. García-Martín; B. Rojas; R. de Hoz, AI. Ramirez; JJ. Salazar; P. Gil; R. Yubero; A. Triviño; JM. Ramirez**

***“Alteración morfológica y funcional de la retina en Enfermedad de Alzheimer leve” (Comunicación oral).***

I Jornadas de Investigación Integral en Ciencias Ómicas y Estilo de Vida (JICOVA 2014). Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. Valencia 11-13 de Junio de 2014

**Premio Prof. Antonio Sabater a la mejor comunicación oral**

24. **ES. García-Martín; A. Triviño; B. Rojas; R. de Hoz, P. Gil; R. Yubero; JM. Ramirez**

***“Uso de la OCT macular como apoyo al diagnóstico en la Enfermedad de Alzheimer en estadios iniciales” (Comunicación en panel).***

90 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Bilbao. 1-4 de Octubre de 2014.

25. **ES. García-Martín**

***“Afectación visual en la Enfermedad de Alzheimer” (Comunicación oral)***

**Conferencia invitada**

Jornadas sobre Alzheimer y otras demencias. Puebla de la Calzada (Badajoz). 26-28 Noviembre 2014.

26. **E. Salobar-García Martín**

***“¿Se pueden detectar cambios en la función oftalmológica de todas las enfermedades neurodegenerativas?” (Comunicación oral)***

**Conferencia invitada**

X Curso de Glaucoma de Algeciras. Algeciras (Cádiz). 20-21 Marzo 2015.

27. **E. Salobrar-García Martín**

*“Innovaciones diagnósticas en oftalmología de Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson”* (Comunicación oral)

XII Simposio de Oftalmología Geriátrica. Innovaciones diagnósticas y terapéuticas en la patología ocular más frecuente del anciano. Universidad Complutense de Madrid.

Madrid. 21 Mayo 2015

**2016 (Segundo año contrato predoctoral)**

---

28. M. Leal, E. Salobrar-García, I. Hoyas, B. Rojas, R. Yubero, JM. Ramirez  
*“Cambios en el espesor de la segmentación peripapilar mediante OCT en Alzheimer leve”* (Comunicación en panel).

92 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Málaga. 21-24 de Septiembre de 2016.

29. E. Salobrar-García, R de Hoz, AI Ramirez, JJ Salazar, Pedro Gil, Jose M Ramirez

*“Test psicofísicos vs cambios de la capa de fibras nerviosas en enfermedad de Alzheimer leve”* (Comunicación en panel).

92 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Málaga. 21-24 de Septiembre de 2016.

**2017 (Tercer año contrato predoctoral)**

---

30. **E. Salobrar-García Martín**

*“Sensibilidad al contraste y caídas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas”* (Comunicación oral)

**Conferencia invitada**

XIII Simposio de Oftalmología Geriátrica. Alteraciones oftalmológicas y caídas en personas mayores. Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 4 Mayo 2017.

31. **E. Salobrar-García**

*“Alteraciones en la retina y en pruebas psicofísicas oftalmológicas en la Enfermedad de Alzheimer en estadio leve”*. (Comunicación oral)

1ª Jornada PhD-Biomedicina. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 9 de Junio de 2017

**2018 (Cuarto año contrato predoctoral)**

---

32. **E. Salobrar-García.**

*“La retina como biomarcador en la Enfermedad de Alzheimer”* (Comunicación oral)

**Conferencia invitada**

I Jornadas de Neurocientíficas. Centro de Tecnología Biomédica. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. 12 de Febrero de 2018.

33. C. Amarante; R. Vazirani; **E. Salobrar-García**; JM, Ramírez Sebastián.  
*“Parámetros vasculares retinianos en el diagnóstico precoz del Alzheimer y la prometedora Angiografía OCT.” (Comunicación en panel).*  
*Tutorización del trabajo. Premio a la mejor comunicación del congreso.*  
XIII Congreso de Investigación para Estudiantes Pregraduados de Ciencias de la Salud. XVII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. Madrid. (España) 19-21 Abril de 2018.
34. **E. Salobrar-García**; R. de Hoz; JJ. Salazar; AI. Ramirez; R. Yubero; P. Gil; JM. Ramirez.  
*“Cambios en la retina en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer”*  
2º Jornadas PhDay Biomedicina. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 22 de Junio de 2018.
35. JM. Ramírez; **E. Salobrar-García**; R. de Hoz; R. Yubero; P. Gil  
*“Evaluación de los cambios precoces de la retina en la Enfermedad de Alzheimer y contribución de la papila en la evolución de la enfermedad” (Comunicación oral).*  
60 Congreso nacional de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. Las Palmas de Gran Canaria. (España) 13-15 Junio de 2018.  
Publicado como abstract en Revista Española de Geriatria y Gerontología 53:3 June 2018. DOI: 10.1016/j.regg.2018.04.007

## 10.8 Premios obtenidos de los resultados de esta tesis doctoral

### PREMIOS INTERNACIONALES

1. **Primer premio** a la mejor comunicación de Investigación Clínica “*Contrast sensitivity in patients with Alzheimer’s dementia in initial stages*” III Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación de retina y Ciencias de la visión (SIRCOVA) 2013. Valencia 2013. Dotación económica: 400€
2. **Premio especial a la mejor comunicación científica presentada** con la comunicación oral: “*Disminución del espesor macular en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer leve medido con Tomografía de Coherencia Óptica*” OPTOM 2014. 23º Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid. (España) 4-6 Abril 2014. Dotación económica: 900€
3. **Premio a la mejor comunicación** con la comunicación oral “*Early changes in neuroretinal rim in mild Alzheimer’s Disease*”, V Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación de Retina y Ciencias de la Visión (SIRCOVA 2016). Valencia 30 de Junio a 2 de Julio de 2016. Dotación económica: 500€
4. **1ª Mención de Honor en Investigación Clínica** con la comunicación “*OCT changes in the progression of Alzheimer’s Disease*) en el Congreso Internacional de la Sociedad de Investigación en Retina y Visión (SIREV 2018). Madrid 30 Junio 2018.

### PREMIOS NACIONALES

5. **Premio Prof. Antonio Sabater a la mejor comunicación oral** de las Jornadas de Investigación Integral en Ciencias Ómicas y Estilo de Vida (JICOVA 2014) con la comunicación oral: “*Alteración morfológica y funcional de la retina en Enfermedad de Alzheimer leve*”. Valencia 11-13 de Junio de 2014.
6. **Premio a la mejor comunicación** con la comunicación en panel: “*Alteraciones oftalmológicas en enfermedades neurodegenerativas: Enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Múltiple*”. X Jornadas Complutenses, IX Congreso Nacional Investigación alumnos pregraduados en CC. de la salud y XIV Congreso CC. veterinarias y biomédicas Madrid. (España) 23-25 Abril de 2015
7. **Premio a la mejor comunicación** con la comunicación en panel: “*Análisis topográfico del polo posterior maculopapilar en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve*”. XI Jornadas Complutenses, X Congreso Nacional Investigación alumnos pregraduados en CC. de la salud y XI Congreso CC. veterinarias y biomédicas. Madrid. (España) 21-23 Abril de 2016.
8. **Premio a la mejor comunicación científica** en el XIII Congreso de Investigación para Estudiantes Pregraduados de Ciencias de la Salud. “*Parámetros vasculares retinianos en el diagnóstico precoz del Alzheimer y la prometedora Angiografía OCT.*” (Comunicación en panel). Madrid. (España) 19-21 Abril de 2018



# **11. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**



## Reports

### Macular Thickness as a Potential Biomarker of Mild Alzheimer's Disease

Although several postmortem findings in the retina of patients with Alzheimer's disease (AD) are available,<sup>1</sup> new biomarkers for early diagnosis and follow-up of AD are still lacking. It has been postulated that the defects in the retinal nerve fiber layer (RNFL) may be the earliest sign of AD, even before damage to the hippocampal region that affects memory.<sup>2</sup> This fact may reflect retinal neuronal-ganglion cell death and axonal loss in the optic nerve in addition to aging.<sup>1</sup>

Changes in longitudinal optical coherence tomography (OCT) measurements of RNFL can act as a surrogate marker of axonal health, making OCT an invaluable tool for measuring axonal loss as a biomarker.<sup>2</sup> The goal of this study was to examine the thickness of the macular and peripapillary RNFL with OCT to determine the most predictive area affected in patients with mild AD, Geriatric Depression Scale-4, Reisberg scale, and make comparisons using normal subjects.

Twenty patients with mild AD and 28 age-matched control subjects from the Geriatric Unit in the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, were studied. The AD patients met the criteria for AD according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke—Alzheimer's Disease and Related Disorders Association and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, having mild cognitive impairment according to the Clinical Dementia Rating scale. Informed consent was obtained from both groups. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the local ethics committee.

The inclusion criteria for patients were: being free of ocular disease and systemic disorders affecting vision; best-corrected visual acuity (BCVA) of 20/40;  $\pm 5$  spherocylindrical refractive error; and intraocular pressure of  $< 20$  mmHg. All the subjects underwent a complete ophthalmologic examination, including visual acuity, refraction, anterior and posterior segment biomicroscopy, intraocular pressure measurement, dilated fundus examination, and OCT. The RNFL thickness and macular thickness were measured by OCT Model 3D OCT-1000 (Topcon, Japan) after pupil dilatation. The analysis area was centered manually and the absence of segmentation errors was confirmed for each scan. One eye of each patient assigned at random was analyzed. In the peripapillary area the average thickness ( $360^\circ$ ) and the temporal ( $316^\circ\text{--}45^\circ$ ), superior ( $46^\circ\text{--}135^\circ$ ), nasal ( $136^\circ\text{--}225^\circ$ ), and inferior ( $226^\circ\text{--}315^\circ$ ) quadrant thicknesses were evaluated. Macular RNFL thickness data were displayed in 3 concentric rings centered in the foveola, distributed as follows: A central macular ring, 1 mm from the fovea; an inner macular ring, 3 mm from the fovea; and an outer macular ring, 6 mm from the fovea. The inner and outer rings were each divided into 4 quadrants (superior, inferior, nasal, and temporal (Fig 1).

The data are reported as mean values  $\pm$  standard deviations. The differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. Sensitivity at 90% specificity and receiver operating characteristics (ROCs) analysis for discriminating between healthy and mild AD patients were calculated for the RNFL thickness in all the areas studied. Data were processed in a SPSS 19.0.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

There were no statistically significant differences in age or gender between the groups. The Mini-Mental State Examination (MMSE) scores in mild AD patients significantly decreased in comparison to control subjects. All the patients had MMSE values of  $> 17$  (Table 1; available at [www.aaajournal.org](http://www.aaajournal.org)).

**OCT.** Compared with controls, in patients with mild AD: (1) the thickness values for the central ring and the 4 inner quadrants were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); (2) the RNFL thickness of the outer macular quadrants were diminished; (3) only the values of the outer temporal quadrant were significantly lower ( $P < 0.05$ ); (4) the total macular volume was significantly reduced ( $P < 0.05$ ); (5) peripapillary RNFL-thickness values and signal strength did not differ between groups ( $P > 0.05$ ; Fig 2A-D; Table 2; available at [www.aaajournal.org](http://www.aaajournal.org)).

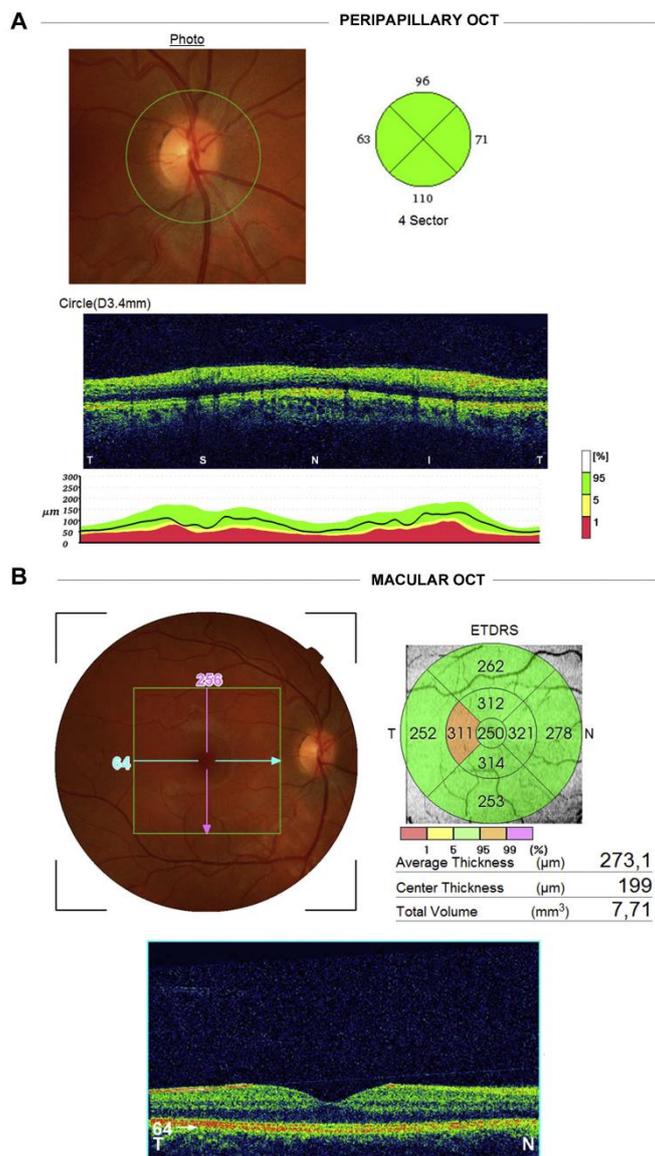
**ROCs Curves.** A significant relationship was found between the central and inner macular RNFL thickness in all areas. The analysis of the ROCs curves showed that, for AD, the RNFL thickness in the central and inner macular quadrants had the widest areas under the ROCs curves for all the parameters analyzed ( $0.743\text{--}0.771$ ;  $P < 0.05$ ). The inner superior quadrant had the strongest correlation ( $r = 0.821$ ;  $P < 0.01$ ) followed by inner temporal quadrant ( $r = 0.806$ ;  $P < 0.01$ ). With respect to the total macular area, the analysis revealed a strong correlation ( $r = 0.742$ ;  $P < 0.01$ ; Fig 2E-H; available at [www.aaajournal.org](http://www.aaajournal.org)).

Widespread axonal degeneration in the optic nerve had been found both in postmortem and in vivo studies of AD patients.<sup>1,3</sup> In the present study, our mild AD patients, compared with a control group, had a statistically significant decrease in RNFL thickness, of some macular regions and in the total macular volume. These data are consistent with histopathologic studies<sup>1,3</sup> demonstrating a decrease of 25% of neurons in the ganglion-cell layer of the macula; the greatest decrease being detected in the temporal region of the fovea (52%).<sup>3</sup>

The first reports on retinal involvement in AD stated that retinal alterations occur as a consequence of a retrograde pathway. However, it has recently been reported that neuroinflammation induced by beta-amyloid-, APP- and tau deposits in the RGC- and IPL layers could be causing direct retinal degeneration that may account, at least in part, for the OCT alterations reported here. On the other hand, the macular region contains the highest RGC concentration of the retina, among which parvocellular RGC is the predominant cell type. Notably, psychophysical exploration of the parvocellular pathway are affected in AD.<sup>3,5</sup>

Our data showed values for the macular RNFL thickness and total macular volume measured by OCT to have highly significant sensitivity and specificity for differentiating mild AD patients from healthy subjects. The most sensitive area was the superior inner macula, followed by the temporal inner macula, with ROCs values of 85% and 80%, respectively. Thus, according to our data, the superior inner macular RNFL thickness seems to have the highest diagnostic value in AD neurodegeneration. To our knowledge, this is the first available report on the area of the central retina that has a higher predictive ability in mild AD patients. Further studies to confirm this preliminary data are needed.

In comparison with other studies on histopathology and on RNFL analysis by OCT in AD, our patients had: (1) similar mean



**Figure 1.** Retinal nerve fiber layer thickness analysis (RNFL). Optical coherence tomography (OCT) study. (A) Peripapillary OCT. Upper left: Peripapillary retinography with a green circle marking the retinal tissue considered for analysis. Upper right: diagram of the peripapillary quadrants analyzed: temporal quadrant (316° to 45°), superior quadrant (46° to 135°), nasal quadrant (136° to 225°), inferior quadrant (226° to 315°). Bottom: retinal b-scan and diagram of thickness normality. (B) Macular OCT. Upper left: Central retinography with a green square marking the retinal tissue considered for analysis. Upper right: diagram showing the concentric rings and quadrants considered for analysis of the macular RNFL thickness and measurements automatically provided by the analyser. Bottom: retinal b-scan of the macula. ETDRS = Early Treatment Diabetic Retinopathy Study.

## Reports

age values, so differences in OCT findings seems not to be attributable to aging and, (2) higher mean MMSE values seem to indicate that they are taking place in early stages of AD.

Based on our data, we propose that the first affected area of the retina in mild AD may be the macular area. As the neurodegeneration progresses, a significant decline in peripapillary RNFL thickness becomes apparent. However, whether or not the macula is really the first area involved in early AD, or simply the first place with enough RGCs to discern an effect deserves further investigation.

We suggest that with OCT we can detect consistent macular changes that can be of significant value for evaluating AD patients. The retina, being part of the central nervous system and offering easy accessibility, encourages its use as a potential biomarker for AD diagnosis and progression.

ELENA S. GARCIA-MARTIN, MSc<sup>1</sup>

BLANCA ROJAS, MD, PhD<sup>1,2</sup>

ANA I. RAMIREZ, PhD<sup>1,3</sup>

ROSA DE HOZ, MD, PhD<sup>1,3</sup>

JUAN J. SALAZAR, PhD<sup>1,3</sup>

RAQUEL YUBERO, PhD<sup>4</sup>

PEDRO GIL, MD, PhD<sup>2,4</sup>

ALBERTO TRIVIÑO, MD, PhD<sup>1,2</sup>

JOSE M. RAMIREZ, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Financial Support: Redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RETICS) Prevención, detección precoz y tratamiento de la patología ocular prevalente degenerativa y crónica (grant ISCIII RD12/0034/0002, Spanish Ministry of Science and Innovation). The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

## References

1. Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, et al. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1986;315:485-7.
2. He XF, Liu YT, Peng C, et al. Optical coherence tomography assessed retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 2012;5:401-5.
3. Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, et al. Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging* 1996;17:377-84.
4. Tzekov RT, Mullan M. Vision function abnormalities in Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol* 2013; In press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.10.002>.
5. Koronyo Y, Salumbides BC, Black KL, et al. Alzheimer's disease in the retina: Imaging retinal aβ plaques for early diagnosis and therapy assessment. *Neurodegener Dis* 2012;10:285-93.

### LAPTOP Study: A 24-Month Trial of Verteporfin Versus Ranibizumab for Polypoidal Choroidal Vasculopathy



Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of vision loss in developed countries. Polypoidal choroidal

vasculopathy (PCV) is a subtype of AMD characterized by polypoidal lesions and a branching vascular network visualized with indocyanine green angiography. Although the first-line treatment for AMD is well-established, the optimal treatment for PCV can differ from that of AMD and remains under debate.<sup>1</sup>

The administration of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) agents such as ranibizumab or aflibercept is the mainstay of the treatment of AMD. Meanwhile, the use of photodynamic therapy (PDT) alone or in combination with anti-VEGF agents is sometimes favored for patients with PCV because PDT efficiently induces regression of polyps that should be beneficial for long-term outcome.<sup>2</sup> Although the previous randomized study (EVEREST study) compared the use of ranibizumab and PDT for the treatment of PCV and concluded that PDT is more effective than ranibizumab in achieving regression of polyps,<sup>3</sup> the visual outcome was better in the ranibizumab monotherapy arm than in the PDT arm despite the lack of statistical power. Thus, no clear evidence exists for the treatment that yields the best visual outcome.

To address the issue, we conducted a 24-month trial: Ranibizumab (Lucentis) And Photodynamic Therapy On Polypoidal choroidal vasculopathy (LAPTOP) study and compared the vision-enhancing effect of ranibizumab and PDT in PCV. At 12 months, ranibizumab yielded a better visual outcome than did PDT.<sup>4</sup> We have now completed the 24-month study and report the results herein.

The methods used for the LAPTOP study have been reported previously.<sup>4</sup> Institutional review board/ethics committee approval was obtained at each institution. The study design adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and guidelines of Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare. Patients provided written, informed consent for participating in the study. The trial was registered with the Japan Medical Association Center for Clinical Trials on 2009-06-22 (ID: JMA-ILA00028). We randomized 97 patients with treatment-naïve PCV to either PDT or ranibizumab. In the PDT arm, we performed standard verteporfin PDT at baseline and applied retreatment when persistent fluorescein leakage was noted. In the ranibizumab arm, we performed 3 monthly intravitreal injections of ranibizumab 0.5 mg and additional treatments were given based on retreatment criteria as suggested in the previous study<sup>5</sup> (Fig 1, available at [www.aaojournal.org](http://www.aaojournal.org)).

Two patients in each arm did not complete the initial 3-month treatment and were excluded from the analysis. Mean numbers of treatment in ranibizumab arm were 4.4 and 1.4 times in the first and the second years, respectively. The numbers in PDT arm were 1.8 and 0.4 times, respectively. Approximately 20% of the patients switched or discontinued treatment. The main reason for switching treatment was refractoriness to the initial treatment. Three patients in the ranibizumab arm wanted to discontinue or switch to PDT because of treatment burden. Four patients in the PDT arm switched to ranibizumab owing to the development of massive subretinal hemorrhage or type 2 choroidal neovascularization or they received vitrectomy owing to the development of vitreous hemorrhage or vitreomacular traction syndrome. We applied intention-to-treat analysis for these patients and the last observation carried forward approach was used for missing data.

The 24-month visual and anatomic course is shown in Figure 2 (available at [www.aaojournal.org](http://www.aaojournal.org)). Whereas patients in the ranibizumab arm showed visual gain compared with the baseline at several time points, patients in the PDT arm did not show improvement in vision. Baseline and final logarithm of minimum angle resolution (logMAR) was 0.48±0.27 and 0.40±0.37 in the

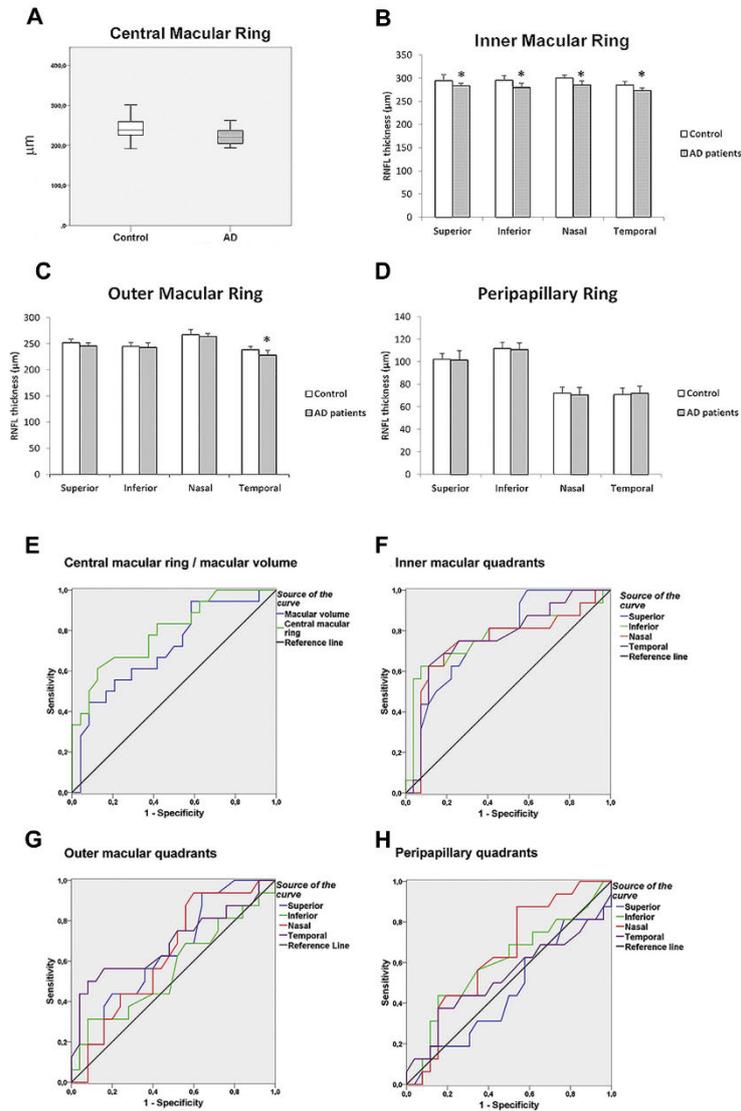
## Ophthalmology Volume 121, Number 5, May 2014

Table 1. Demographic and Clinical Data of the Study Groups

Variable	AD (n = 20)	Control (n = 28)	P
Age (y), mean $\pm$ SD	79.3 $\pm$ 4.1	72.1 $\pm$ 5.1	0.274
Gender			0.874
Male	8	9	
Female	12	19	
Race	Caucasian	Caucasian	
MMSE (mean $\pm$ SD)	23.7 $\pm$ 3.3	28.1 $\pm$ 2.1	0.009*

AD = Alzheimer's disease; MMSE = Mini-Mental State Examination;  
SD = standard deviation.  
\*P < 0.01.

Reports



**Figure 2.** Mean data of retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness against eye quadrants assessed with optical coherence tomography and areas under the receiver operating characteristics (ROCs) curve. (A-D) Central macular ring (1 mm from the fovea). Horizontal lines, bottom to top: 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles (A). Inner macular ring (3 mm from the fovea) (B). Outer macular ring (6 mm from the fovea) (C). Peripapillary retinal nerve-fiber layer (D). (E-F) Areas under the ROCs curves in discriminating between mild Alzheimer disease patients and control subjects, from the central macular ring and total macular volume (E), inner macular quadrants (F), outer macular quadrants (G) and peripapillary quadrants (H). \* $P < 0.01$ .

## Ophthalmology Volume 121, Number 5, May 2014

Table 2. RNFL Thickness and Total Macular Volume

Retinal area of study	AD group (mean $\pm$ SD)	Control group (mean $\pm$ SD)	% RNFL decrease	P
Foveal thickness ( $\mu\text{m}$ )	221.2 $\pm$ 21.6	243.7 $\pm$ 24.8	9.24	0.015*
Inner macular quadrant ( $\mu\text{m}$ )				
Superior area	283.4 $\pm$ 11.1	294.9 $\pm$ 18.1	3.91	0.002*
Inferior area	279.8 $\pm$ 18.1	295.8 $\pm$ 13.5	5.40	0.002*
Nasal area	285.6 $\pm$ 17.2	300.1 $\pm$ 15.1	4.83	0.007*
Temporal area	273.1 $\pm$ 12.7	285.2 $\pm$ 14.6	4.22	0.002*
Outer macular quadrant ( $\mu\text{m}$ )				
Superior area	245.4 $\pm$ 12.5	252.1 $\pm$ 13.7	2.65	0.084
Inferior area	242.8 $\pm$ 17.4	245.2 $\pm$ 13.9	0.99	0.531
Nasal area	263.7 $\pm$ 12.1	267.5 $\pm$ 19.1	1.41	0.110
Temporal area	228.0 $\pm$ 18.8	238.5 $\pm$ 12.3	4.43	0.009*
Peripapillary thickness ( $\mu\text{m}$ )				
Superior area	101.4 $\pm$ 16.5	102.2 $\pm$ 10.8	0.77	0.404
Inferior area	110.8 $\pm$ 11.1	111.8 $\pm$ 10.8	0.83	0.353
Nasal area	70.5 $\pm$ 12.8	72.3 $\pm$ 10.6	2.01	0.283
Temporal area	71.8 $\pm$ 12.5	70.6 $\pm$ 11.6	-1.67	0.616
Total macular volume (cubic mm)	7.1 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.3	9.34	0.024*
Signal strength				
Macula	70.83 $\pm$ 10.68	72.57 $\pm$ 6.11		0.551
Peripapillar	74.85 $\pm$ 8.61	73.13 $\pm$ 7.07		0.503

AD = Alzheimer's disease; RNFL = retinal nerve fiber layer; SD = standard deviation.  
\*P < 0.05.



## Research Article

# Ophthalmologic Psychophysical Tests Support OCT Findings in Mild Alzheimer's Disease

Elena Salobar-García,<sup>1</sup> Rosa de Hoz,<sup>1,2</sup> Blanca Rojas,<sup>1,3</sup> Ana I. Ramírez,<sup>1,2</sup> Juan J. Salazar,<sup>1,2</sup> Raquel Yubero,<sup>4</sup> Pedro Gil,<sup>3,4</sup> Alberto Triviño,<sup>1,3</sup> and José M. Ramírez<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Facultad de Óptica, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to José M. Ramírez; [ramirez@med.ucm.es](mailto:ramirez@med.ucm.es)

Received 19 February 2015; Accepted 20 May 2015

Academic Editor: Hermann Mucke

Copyright © 2015 Elena Salobar-García et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Purpose.** To analyze in mild Alzheimer's disease (MAD) patients, GDS-4 (Reisberg Scale), whether or not some psychophysical tests (PTs) support OCT macular findings in the same group of MAD patients reported previously. **Methods.** Twenty-three MAD patients and 28 age-matched control subjects with mean Mini Mental State Examination of 23.3 and 28.2, respectively, with no ocular disease or systemic disorders affecting vision were included. Best-corrected visual acuity (VA), contrast sensitivity (CS) (3, 6, 12, and 18 cpds), color perception (CP), and perception digital test (PDT) were tested in one eye of each patient. **Results.** In comparison with the controls, MAD patients presented (i) a significant decrease in VA, PDT, and CS for all spatial frequencies analyzed, especially the higher ones, and (ii) a significant increase in unspecific errors on the blue axis ( $P < 0.05$  in all instances). In MAD patients, a wide aROC curve was plotted in all PTs. **Conclusions.** In MAD, CS, VA, and the tritan axis in CP were impaired. The PTs with the greatest predictive value are the higher spatial frequencies in CS and tritan unspecific errors in CP. PT abnormalities are consistent with the structural findings reported in the same MAD patients using OCT.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of the central nervous system characterized by cortical atrophy most pronounced in the medial temporal and posterior temporoparietal regions [1]. Disturbances of short-term memory, judgment, and emotion are characteristic of the disease.

As an extension of the central nervous system, the retina displays similarities to the brain in terms of anatomy, functionality, response to insult, and immunology [2–4]. Furthermore, the retina presents manifestations of major neurodegenerative diseases, and it has been argued that several ocular diseases should be viewed as forms of neurodegenerative disorders [2]. This unique property makes the retina a valuable tool for *in vivo* visualization and study of retinal changes.

The first histopathologic evidence of postmortem retinal changes from AD patients was reported by Hinton et al., who found a significant axonal degeneration in the optic head nerve [5]. Further studies have demonstrated that a decrease in retinal ganglion cell numbers was associated with an array of intracellular injuries [6]. The analysis on the distribution of neuronal loss in the retina by Blanks et al. showed that the most pronounced areas of cell loss in the ganglion cell layer (GCL) were the superior and inferior retinal quadrants [7] and there was an extensive loss of RGC in the temporal foveal region [8]. These findings have been corroborated using the Optical Coherence Tomography (OCT), demonstrating the decrease of the RNFL and the macular thickness [9–16], even in early stages of mild cognitive impairment [12, 17–19].

Currently it is thought that RGC loss in AD might result from amyloid pathology in the retina. Both amyloid-beta

plaques and oligomers have been reported in the human retina [4, 20–25]. Therefore, amyloid accumulation in the retina of patients with AD may result in the degeneration of RGCs in parallel with amyloid-beta-related neurodegeneration in the brain [25]. However, retinal findings in AD could be also due to retrograde degeneration of RGCs secondary to AD pathology in the central visual pathways, given that AD patients show degeneration of the primary and secondary visual cortex [26].

In addition to the anatomical findings in AD patients, this disease can exert an impact on most aspects of visual processing, such as visual field abnormalities [27–29], color perception deficits [30–32], pattern electroretinogram changes [11, 33, 34], and reduced contrast sensitivity (CS) [35–38].

The M visual pathway appears to be particularly vulnerable to degeneration in AD [26]. Thus, degeneration of RGCs and/or visual pathways in the brain may underlie the functional deficits in CS seen in patients with AD [29]. CS function in humans diminishes with changes in the retina, the optic nerve, and lesions of the occipital, temporal, and/or parietal cortices [39].

Psychophysical investigations of CS in AD patients have rendered results consistent with the neuropathological evidence. However, studies of CS in patients with AD have yielded variable results. Some studies have reported no AD-related deficits in spatial CS [40, 41], while others have found deficits at all spatial frequencies tested [42].

OCT macular studies in AD by our group and others have recently reported that mild AD (MAD) patients with a high mean score ( $23.3 \pm 3.1$ ) on the Mini Mental State Examination (MMSE) had significantly reduced macular nerve fiber layer thickness with or without significant peripapillary involvement [9, 43, 44]. In the present study, to analyze whether these anatomical features coexist with alterations in the visual functional state in MAD patients, we include the same patients from the previous work [9]. To examine the visual pathway in this homogeneous group (in terms of disease stage) of MAD, we performed different psychophysical tests, specifically visual acuity (VA), CS, color perception, and perception digital test (PDT). The results are compared with those of an age-matched control group in order to (i) improve our understanding on how the visual pathway works in MAD and (ii) determine whether or not these tests support early macular findings on OCT in MAD.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Subjects.** To select patients, we reviewed the Database of the Memory Unit of the Hospital Clínico San Carlos in Madrid (Spain), consisting of a total of 2635 patients. First, we excluded the patients with a Global Deterioration Scale (GDS) over 4 [45] and then those with a mood or psychiatric disorder. Next, we took into account 87 patients with MAD. These patients, according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, had mild cognitive impairment according to the Clinical Dementia Rating Scale. Then ophthalmic medical records

of these patients were reviewed, excluding those patients who were previously diagnosed with an ophthalmic condition. After this analysis, 29 patients with AD had all the requirements to participate in the study (GDS over 4 and freedom of ocular disease and systemic disorders affecting vision in their medical record). Of the 29 MAD patients and 37 age-matched control subjects selected (normal MMSE scores), 6 MAD patients and 9 age-matched control subjects were subsequently excluded due to posterior pole pathology including macular degeneration, drusen, suspicion of glaucoma, glaucoma, epiretinal membrane, or cataract that prevented ocular examination. Because of this selection, 23 patients with MAD and 28 age-matched control subjects were considered for the study. Informed consent was obtained from both groups. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the local ethics committee.

**2.2. Methods.** The clinical evaluation of our MAD included a review of the medical records, a caregiver interview, physical and neurological examinations, a psychometric test, neuroimaging techniques, and routine laboratory testing for dementia.

For the ophthalmological part of the study only one eye of each patient was analyzed. All participants met the following inclusion criteria: being free of ocular disease, AREDS Clinical Lens Standards <2, retinal drusen and systemic disorders affecting vision, having a best-corrected VA of 20/40, having a  $\pm 5$  spherocylindrical refractive error, and having intraocular pressure of less than 20 mmHg. For screening, all AD patients and control subjects underwent a complete ophthalmologic examination, including assessment of VA, refraction, anterior segment biomicroscopy, applanation tonometry (Perkins MKII tonometer, Haag Streit, Reliance Medical, Switzerland), CS test CSV-1000E (VectorVision, Greenville, OH, USA), Roth 28-hue color test (Luneau, Paris, France), PDT [46], and dilated fundus examination. In the dilated fundus examination, no differences were found between MAD patients and age-matched control subjects. These tests were selected considering that in this developmental stage of the disease the results were not influenced by the patient's cognitive impairment.

**2.3. Visual Acuity.** Monocular best-corrected distant VA was determined using a standard clinical Snellen eye chart. The correction was based on the subjective refraction of the subject. The patients started to read each row from the top of the Snellen eye chart and proceeded toward the bottom. This was ended when the hit rate was less than five of eight (an approximation to 56.25%, the steepest point of the psychometric acuity function).

**2.4. Contrast Sensitivity Function.** The CS test was performed under the same conditions for all the patients and with the CSV-1000E system (VectorVision, Greenville, OH, USA) and in the presence of best-corrected VA for far vision. The CSV-1000E test provides a fluorescent luminance source that retroilluminates a translucent chart and is able to monitor

and autocalibrate the light level to 85 cd/m<sup>2</sup>. The CSV-1000E was performed at 98.5 inches as recommended by the manufacturer. The nonselected eye was occluded for each measurement. The translucent chart presents four spatial frequencies: 3, 6, 12, and 18 cyc/deg. Each spatial frequency was presented on a separate row of the test. Each row presented 17 circular patches 1.5 inches in diameter. The first patch in the row had a very high contrast grating (sample patch) on the far-left side of the row. The remaining 16 patches appeared in 8 columns presented across the row. In each column, one patch presented a grating while the other patch remained blank. The patches that presented gratings decreased in contrast from left to right across the row. The patient was directed to observe the first sample patch and to look for the grating pattern in each column. While reading across the row, the patient indicated whether the grating appeared in the top patch or the bottom patch of each column. If the grating was not visible in either patch, the patient was to report that both were blank. The patient was encouraged to guess whether a grating was at least partially visible as the threshold was approached. However, the patient was cautioned that if no gratings were visible, then the response should be "both blank." The contrast level of the last correct response was recorded as the threshold.

**2.5. Color Perception.** To administer a color-vision test that did not require a naming response, we used Roth 28-hue color test (Luneau, Paris), a quick and easy color arrangement test first described by Roth [47]. Color perception was assessed in the presence of best-corrected VA for near vision. The test uses the equivalent of every third color cap from the Farnsworth-Munsell 100 (F-M 100) as an abbreviated version. Subjects were instructed to select the cap most similar to the reference cap, then the cap most similar to the previously chosen one, and so on and to place them in sequential order until all 27 caps were arranged in a circular sequence. Test instructions were repeated by the examiner during test when necessary. The time to perform the test was not restricted and the subject was allowed to make corrections. The results were recorded on diagrams provided by the manufacturer which depict the direction of axes corresponding to several types of color-vision defects. Errors classified the observer as protanomalous, deuteranomalous, or tritanomalous (red-, green-, or blue-deficient, resp.). Following the manufacturer's manual [48] blue axis errors were considered when caps 43 to 64 were malpositioned. In this way, the tritan errors were quantified.

**2.6. Perception Digital Test (PDT).** The PDT, developed in 2007 [46], is an easy, fast, and sensitive method for evaluating disorders of visual perception in MAD patients. The aim of the test is to assess the visual recognition of familiar situations, masked by geometric special effects that hinder perception. The test includes 15 sheets. Each sheet shows the same picture at different positions in space. The pictures are distorted by the choice of special effects: geometric effect (tile) and effect of the frame 24/48 of MGI Photo Suite III program. The test includes five photographs of landscapes, six of common objects, two of people, one of an animal, and

TABLE 1: Demographic and clinical data of the study groups.

	AD (n = 23)	Control (n = 28)	P value
Age*	79.3 ± 4.6	72.3 ± 5.1	0.274
Gender			0.614
Men	9	9	
Female	14	19	
Race	Caucasian	Caucasian	
MMSE*	23.3 ± 3.1	28.2 ± 1.9	0.001 <sup>††</sup>
Range (17-29)	Range (17-29)	Range (25-31)	
Educational level*	1.43 ± 0.78	1.43 ± 0.79	0.950

\* Mean value ± SD; <sup>††</sup> P < 0.01 Mann-Whitney U test (AD: Alzheimer's disease; MMSE: Mini Mental State Examination; SD: standard deviation).

one of a letter. The patient had to identify the picture that was properly oriented in space.

**2.7. Statistical Analysis.** Data for the statistical analysis were introduced and processed in SPSS 19.0 (SPSS Inc.®, Inc., Chicago, IL, USA). The data are reported as mean values ± SD. The differences between MAD and control eyes were analyzed using the Mann-Whitney test. Sensitivity at 90% specificity and area under the receiver operator characteristic (aROC) analysis for discriminating between healthy and MAD patients were calculated for all the psychophysical tests analyzed. The association between the tests and MMSE was evaluated by Pearson's correlation coefficient. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

### 3. Results

Demographic and clinical data for the MAD patients and control group are shown in Table 1. There were no statistically significant differences in age, gender, or educational level between the study groups. The MMSE scores in MAD patients were significantly decreased in comparison with age-matched control subjects (Table 1). All MAD patients had MMSE values higher than 17.

**3.1. Visual Acuity.** The mean VA in MAD patients significantly decreased in comparison with the age-matched control group (Table 2; Figure 1(a)). VA showed a wide aROC (Table 3; Figure 2(a)). A positive and statistically significant linear association was found between VA and MMSE score (Table 4).

**3.2. Contrast Sensitivity.** All analyses were conducted with log CS values. 30.43% of the MAD patients (n = 7) were not able to report the orientation of the 18-cpd grating at the highest contrast level. Three of these 7 MAD patients were also unable to detect the 12-cpd grating at any contrast value. The analysis of CS of the MAD patients revealed a statistically significant reduction at all spatial frequencies tested (3, 6, 12, and 18 cpds) in comparison with age-matched control subjects (Table 2; Figure 1(b)). In addition, it was found that the higher the spatial frequency, the greater the loss of CS

TABLE 2: Mean data and P value of the psychophysical tests.

Test	AD group	Control group	% difference	P value
Visual acuity (dec)*	0.78 ± 0.19	0.95 ± 0.06	-17.89	0.001 <sup>††</sup>
Contrast sensitivity*				
3 cpds	1.39 ± 0.27	1.62 ± 0.19	-14.61	0.001 <sup>††</sup>
6 cpds	1.58 ± 0.24	1.88 ± 0.22	-16.03	0.001 <sup>††</sup>
12 cpds	1.12 ± 0.33	1.46 ± 0.20	-23.05	0.001 <sup>††</sup>
18 cpds	0.61 ± 0.37	1.11 ± 0.27	-44.57	0.001 <sup>††</sup>
Rue 28-hue*				
Number of errors	7.41 ± 4.69	5.95 ± 4.06	24.54	0.18
Tritan unspecific errors	4.35 ± 2.40	2.52 ± 2.00	72.62	0.009 <sup>††</sup>
PDT (sheet)*				
Successful number of sheets	11.74 ± 2.39	13.79 ± 1.47	-14.87	0.01 <sup>†</sup>

\* Mean value ± SD; <sup>†</sup>P < 0.05, <sup>††</sup>P < 0.01 Mann-Whitney U test (AD: Alzheimer's disease; cpds: cycles per degree; PDT: perception digital test).

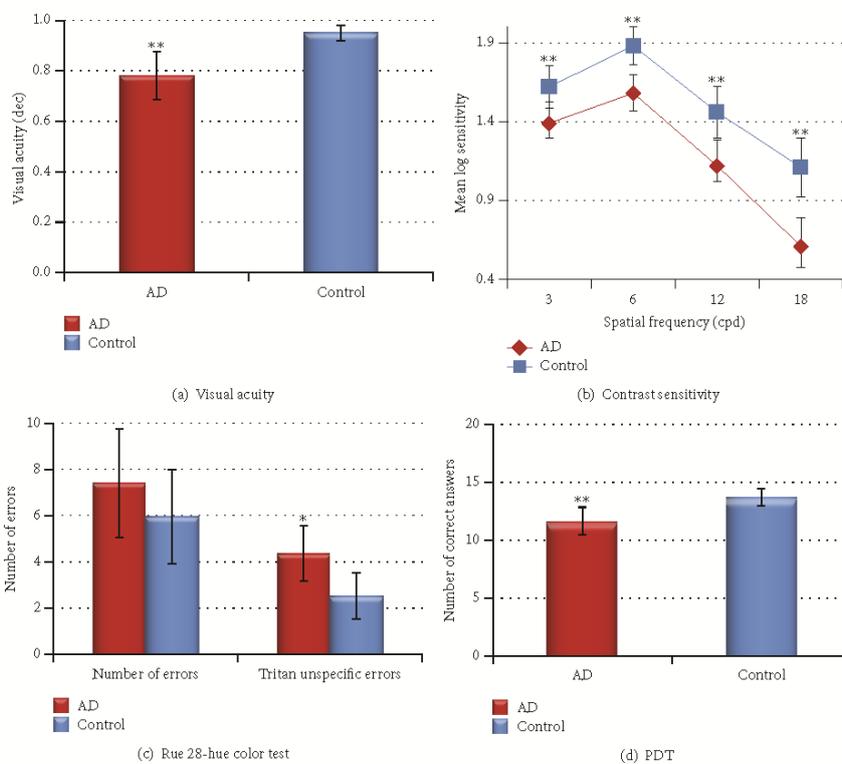


FIGURE 1: Mean data of the psychophysical tests. (a) Visual acuity, (b) contrast sensitivity, (c) desaturated Rue 28-hue color test, and (d) perception digital test. Each bar represents the mean ± SD. \*P < 0.05 versus control. \*\*P < 0.01 versus control. Mann-Whitney U test.

TABLE 3: aROC analysis of psychophysical tests in mild Alzheimer's disease.

Psychophysical test	aROC	SD	P value
Visual Acuity	0.771	0.072	0.001 <sup>††</sup>
Contrast sensitivity			
3 cpds	0.755	0.072	0.002 <sup>††</sup>
6 cpds	0.808	0.061	0.001 <sup>††</sup>
12 cpds	0.832	0.064	0.001 <sup>††</sup>
18 cpds	0.857	0.055	0.001 <sup>††</sup>
Rue 28-hue			
Number of errors	0.610	0.081	0.186
Tritan unspecific errors	0.714	0.074	0.01 <sup>†</sup>
PDT (sheet)			
Successful number of sheets	0.758	0.068	0.002 <sup>††</sup>

<sup>†</sup>P < 0.05, <sup>††</sup>P < 0.01 Mann-Whitney U test (aROC: area under the receiver operating characteristic; AD: Alzheimer's disease; cpds: cycles per degree; PDT: perception digital test; SD: standard deviation).

TABLE 4: Pearson's correlation between psychophysical tests and Mini Mental State Examination.

Psychophysical test	r	P value
Visual acuity	0.457	0.001 <sup>††</sup>
Contrast sensitivity		
3 cpds	0.366	0.011 <sup>††</sup>
6 cpds	0.516	0.001 <sup>††</sup>
12 cpds	0.451	0.001 <sup>††</sup>
18 cpds	0.468	0.001 <sup>††</sup>
Rue 28-hue		
Number of errors	-0.271	0.063
Tritan unspecific errors	-0.329	0.023 <sup>†</sup>
PDT		
Successful number of sheets	0.536	0.001 <sup>††</sup>

<sup>†</sup>P < 0.05, <sup>††</sup>P < 0.01 Pearson's test (AD: Alzheimer's disease; cpds: cycles per degree; PDT: perception digital test).

perception. Thus, in MAD patients the spatial frequency of 18 cpds showed the greatest decrease in CS (44.57%) compared with the age-matched control group. The analysis of the ROC curves (Table 3; Figure 2(b)) showed that, for MAD patients, the highest spatial frequencies analyzed (18 and 12 cpds) had the widest areas under the ROC curves for all the parameters analyzed. The 18-cpd frequency had the strongest correlation, followed by the 12-cpd frequency. A good correlation was detected also for the 6- and 3-cpd frequencies (Table 3; Figure 2(b)).

A positive and statistically significant linear association was found between CS for all spatial frequencies tested and MMSE score (Table 4).

**3.3. Color Perception.** The analysis of color vision with the Rue 28-hue test showed that there were no significant differences in the color perception between patients with MAD and age-matched control group based on the total error score (Table 2). However, the analysis of the tritan axis revealed that (i) the number of tritan unspecific errors was

significantly increased in MAD patients in comparison with age-matched control (Table 2; Figure 1(c)), (ii) aROC curve drawn for the total tritan unspecific errors was statistically significant (Table 3; Figure 2(c)), and (iii) there was a negative and statistically significant linear association between tritan unspecific errors and the MMSE score (Table 4).

**3.4. Perception Digital Test (PDT).** The PDT mean value found for the control group was significantly higher than that of the MAD group. The analysis of the individual sheets revealed a significant difference in sheets 2, 8, and 10 between MAD and age-matched control subjects (Table 2; Figure 1(d)).

The aROC curve for PDT showed a statistically significant wide area. However, when the analysis was calculated by individual sheets, no significant differences were found (Table 3; Figure 2(d)). A positive and statistically significant linear association was found between the PDT and MMSE score (Table 4).

#### 4. Discussion

AD patients reportedly manifest subjective visual complaints, including the inability to read, spatial deficits, or difficulty in recognizing faces despite having relatively good visual acuity values and visual fields. For this reason the patients in our study were carefully selected so that sample was quite uniform regarding VA and MMSE. In addition, between different SC tests available, the CSV-1000 was chosen because results are more independent with respect to the VA [37].

One of the relevant points of the present study concerns MMSE value. Our MAD patients were homogeneous in terms of their disease stage and had a high MMSE mean value (23.3 ± 3.1), higher than any value found in the literature [36, 37, 49–51]. This means that all MAD patients included in this study were in a very early stage of the disease.

**4.1. Visual Acuity.** VA values in the present study were within normal limits for this age range. However, mean VA in MAD patients was significantly decreased in comparison with age-matched control subjects. VA values in AD patients have been controversial. Thus, several studies reported no decrease in VA in patients with Alzheimer's neurodegeneration [36, 40, 41, 50, 52–54] while others showed a decrease in VA [55] which in some instances was associated with visual hallucinations [56].

**4.2. Contrast Sensitivity.** We found that, in comparison with age-matched control subjects, CS in MAD patients was significantly reduced in all spatial frequencies, the reduction being more pronounced at higher frequencies. Specifically, at a spatial frequency of 18 cpds, MAD patients showed a 44.57% CS reduction in comparison with age-matched control. High spatial frequencies are recorded in the P cells of the retina, which are more concentrated in the macular area. Low spatial frequencies are recorded by the M cells located over the entire retina [57]. Our CS results suggest that MAD patients undergo an impairment of both P- and M-cell function, P cells being the most affected. This finding

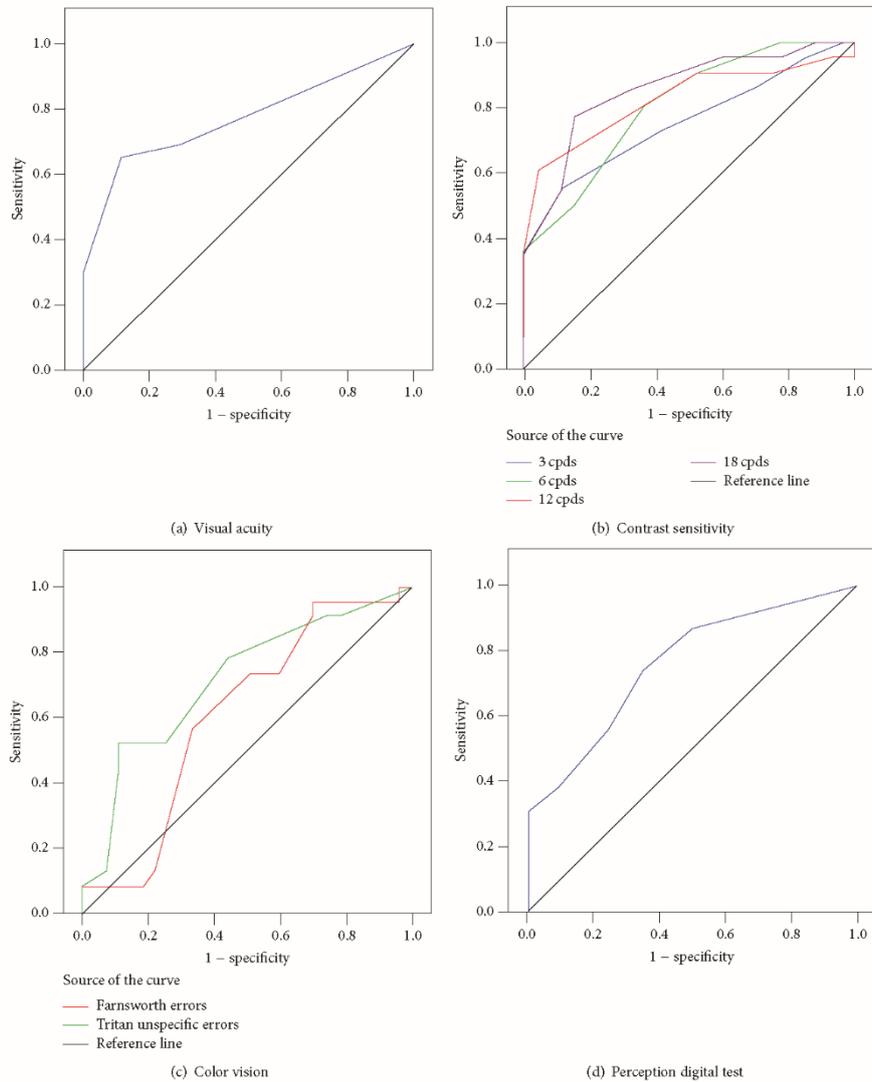


FIGURE 2: Areas under the ROC curves of the psychophysical tests in discriminating between mild AD patients and control subjects. (a) Visual acuity (dec), (b) contrast sensitivity, (c) Rue 28-hue color test, and (d) perception digital test.

correlates with data recently published by our group [9] in which patients with MAD had a significant decrease in the nerve fiber layer thickness in the macular area compared with age-matched controls. By contrast, the significant decrease

in CS for the lower spatial frequencies found here in MAD patients did not parallel OCT findings in the peripapillary region in the fact that the decrease in the nerve fiber layer thickness reported by our group in this retinal region did

not reach significance when compared with controls. These findings tempt us to postulate that, in MAD, CS seems to detect the M pathway impairment earlier than OCT does.

CS in AD has been analyzed for several years. Although in two studies no differences between AD and age-matched control were detected [40, 54], most reports found that CS function is impaired in AD patients. In some instances, CS was reduced at all spatial frequencies examined [34–36, 51, 53, 55, 58–60], while in others the greater decline corresponded to high spatial frequencies [34, 51, 61] and in still others the lower spatial frequencies were the most affected [49, 50, 52, 62]. Possible reasons for such discrepancies may lie in differences among samples and the CS test used [37]. Thus, the Regan chart, a low-contrast letter, and the Vistech VCTS 6500 are influenced by the VA value while the Pelli-Robson test and the Freiburg test are independent of VA [37]. In the present study, we use the CSV-1000 test which is based on the Pelli-Robson test and it can thus be assumed that it is not influenced by VA values.

In agreement with most studies on CS in AD, CS function was impaired in our cohort of early AD. However, the degree of involvement varied among spatial frequencies, the reduction being greater at the higher ones. Notably, in the studies reported in which CS was equally decreased in all spatial frequencies, AD patients were at a more advanced stage of the disease than were our MAD patients, as indicated by their lower MMSE values. There are only two studies with results consistent with ours, showing an increased decline at the higher spatial frequencies. However, both studies presented methodological differences with respect to ours. In the Neargarder et al. study [37], the results could have been influenced by the poorer VA of the patients, the test selected, and the great variability of MMSE (6–26) in the AD group. Meanwhile, the Gilmore et al. study [63] included only the participants who provided a valid response across all spatial frequencies, removing any patients who were not able to discriminate all checked spatial frequencies. Given these data, it seems that the 12- and 18-cpd spatial frequencies are the most affected in the early stages on the disease and thus as the disease progresses, all spatial frequencies become equally involved. According to our ROC values, the most sensitive spatial frequencies were 18 cpds (the highest), followed by the 12 cpds (85.7% and 83.2%, resp.); therefore, the highest spatial frequencies appear to have the highest diagnostic value in MAD neurodegeneration.

The fact that CS is impaired in AD patients in comparison with healthy elderly subjects has significant implications for cognitive abilities and daily function of AD patients [37], especially when the first spatial frequencies affected, according to our data, appear to be those corresponding to macular function.

**4.3. Color Perception.** When assessing color perception in our MAD patients, we found no significant differences in terms of color defects in comparison with age-matched control subjects. However, we found that our MAD patients made significantly more (72.62%) unspecific errors in the tritan (blue) axis than did the controls, which represented almost

a threefold increase in the errors committed by the MAD group.

Unlike subjects with a loss of color vision due to focal cortical lesions, patients with AD rarely complain of color-vision deficits. Color testing in patients with AD is controversial because these patients have a deficit in naming colors and therefore might have trouble verbalizing the colors or nominating numbers and shapes that are being viewed. The color test used in the present study does not require naming, although it should be taken into account that test performance depends on the memory of the patients and therefore, for appropriate testing, the instructions need to be repeated by the examiner during test session, when necessary.

Some studies using the Farnsworth and Ishihara tests have found no color perception differences between patients with AD and the control group [58, 64, 65]. On the other hand, several studies using the City University Color Test found defects in the tritan axis and reported a correlation with the degree of dementia [30, 50, 66]. These data are consistent with the results reported by other authors using the Ishihara test [55] and the City University Color Test [67, 68]. By contrast, Pache et al., using the Ishihara test and the PV-16, found that unspecific errors not associated with a specific axis were more prevalent in AD patients compared to controls; however, this finding was not related to the severity of the disease [31]. This discrepancy among color-vision results in AD patients may be due to differences in the color test applied, so that comparisons of the results are difficult to interpret.

Salamone et al. postulated that the problem of color discrimination in patients with AD is not purely cognitive but seems to be related to damage in the structures responsible for the perception of color stimuli [32]. This statement is consistent with the evidence that extrastriate lesions may result in tritanomalous color deficits [50] and that the extrastriate cortex is severely affected in AD. The fact that no tritanomaly was found in our MAD patients but an increment of unspecific errors appeared along the tritan axis leads us to postulate that, in addition to the general loss of M cells and P cells that seems to be taking place in our patients (as mentioned above), the K pathway may also be involved, given that the blue-yellow spectrum is associated with this pathway [69]. Bistratified ganglion cells receive blue-on/yellow-off color-opponent excitation signals from the short-wavelength sensitive S cones and project this information to the koniocellular layers in the LGN [70].

**4.4. Perception Digital Test (PDT).** The MAD patients of the present study made significantly more mistakes in PDT answers than did the age-matched control subjects. Given that no statistically significant differences in educational level were found among groups, the influence of this variable could be ruled out.

The part of the brain initially involved in AD is the temporal cortex, which is then followed by the temporoparietal association cortex [1, 71]. As a consequence, visual perception disorders are frequently associated with Alzheimer's neurodegeneration [71]. Before PDT development [46] visuoperceptual tests showed low sensitivity for detecting disorders in

the early stages of the disease [72]. The development of more sensitive neuropsychological tests such as PDT has enabled the assessment of visual perception disorders in initial AD [46]. In view of the good predictive value (aROC = 0.758,  $P < 0.01$ ) provided by the application of the PDT, we postulate PDT as a useful ancillary screening test for MAD.

**4.5. aROC.** To the best of our knowledge, no predictive (ROC) analysis is available for the diagnosis value of different visual psychophysical test in AD. A noteworthy finding of the present work was that the test with the greatest prognostic value in MAD patients was CS for 18-cpd and 12-cpd spatial frequencies (aROC 0.857 and 0.832, resp.), followed by VA (aROC 0.771), PDT (aROC 0.758), and unspecific errors in the blue region (aROC 0.714).

**4.6. Pearson's Correlation.** As mentioned above, our AD patients had a high mean MMSE value, the highest so far reported to the best of our knowledge. However, given that MMSE values ranged from 17 to 31, we investigated whether the MMSE value influences the test outcome. As a result, we found a significant correlation between MMSE values and PDT ( $r = 0.536$ ), followed by the CS for 6-cpd ( $r = 0.516$ ) and 18-cpd ( $r = 0.468$ ) spatial frequencies, and VA ( $r = 0.457$ ) and CS for 12-cpd ( $r = 0.451$ ) and 3-cpd ( $r = 0.366$ ) spatial frequencies. A negative correlation was also found between MMSE and the unspecific errors in the tritan region ( $r = -0.329$ ). All these findings showed that as the disease progresses, the answers to different tests used for assessing visual skills worsened.

Possible drawbacks of the study include the cross-sectional design, the subjective nature of the psychophysical testing (which depends on cognitive abilities), and the early stage of disease (mild cognitive impairment, which can be due to reasons other than AD). Another limitation could be the sample size. Gathering large samples is a difficult task when dealing with MAD patients. This was especially true in the present study in which the inclusion criteria were very demanding in order to recruit patients in early stages of AD who were also free of ocular pathology, the latter requisite limiting patient enrollment given the age range of the sample. Nevertheless, our sample size was comparable to that reported in the literature [36, 37, 40, 50, 51, 59].

## 5. Conclusions

In conclusion, our study demonstrates a deficit in visual perception in early stages of AD, manifested by reductions in VA, CS, and color discrimination. These psychophysical changes correlate with retinal morphological changes (decreased RNFL macular thickness as detected by OCT) detected in the same group of patients [9]. Furthermore, the observed changes in PDT suggest a visual integration deficit, possibly due to, at least in part, an incipient cortical dysfunction. The study of the predictive value of the tests analyzed herein showed that, in the most incipient AD grades, tests having the greatest predictive value are the CS, VA, unspecific errors in tritan region, and the PDT. The fact that no differences

were detected between our MAD patients and age-matched control subjects in the dilated fundus examination highlights the importance of applying psychophysical tests in patients with MAD. Given the difficulty in gathering larger samples in AD, broader transverse as well as longitudinal studies would be useful to track changes in the psychophysical tests as the disease progresses.

## Conflict of Interests

The authors report no conflict of interests and have no proprietary interest in any of the materials mentioned in this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by RETICs prevención, detección precoz y tratamiento de la patología ocular prevalente degenerativa y crónica (OFTARED) (Grant ISCIII RD12/0034/0002, Spanish Ministry of Science and Innovation); grants from Elena Salobar-García are currently supported by a Predoctoral Fellowship (FPU) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport. David Nesbitt corrected the English version of this work.

## References

- [1] G. D. Rabinovici, W. W. Seeley, E. J. Kim et al., "Distinct MRI atrophy patterns in autopsy-proven Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration," *The American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, vol. 22, no. 6, pp. 474–488, 2007–2008.
- [2] A. London, I. Benhar, and M. Schwartz, "The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders," *Nature Reviews Neurology*, vol. 9, no. 1, pp. 44–53, 2013.
- [3] N. Patton, T. Aslam, T. MacGillivray, A. Pattie, I. J. Deary, and B. Dhillon, "Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: a rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures," *Journal of Anatomy*, vol. 206, no. 4, pp. 319–348, 2005.
- [4] M. H. Dehabadi, B. M. Davis, T. K. Wong, and M. F. Cordeiro, "Retinal manifestations of Alzheimer's disease," *Neurodegenerative Disease Management*, vol. 4, no. 3, pp. 241–252, 2014.
- [5] D. R. Hinton, A. A. Sadun, J. C. Blanks, and C. A. Miller, "Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 315, no. 8, pp. 485–487, 1986.
- [6] J. C. Blanks, D. R. Hinton, A. A. Sadun, and C. A. Miller, "Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease," *Brain Research*, vol. 501, no. 2, pp. 364–372, 1989.
- [7] J. C. Blanks, S. Y. Schmidt, Y. Torigoe, K. V. Porrello, D. R. Hinton, and R. H. I. Blanks, "Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL," *Neurobiology of Aging*, vol. 17, no. 3, pp. 385–395, 1996.
- [8] J. C. Blanks, Y. Torigoe, D. R. Hinton, and R. H. I. Blanks, "Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina," *Neurobiology of Aging*, vol. 17, no. 3, pp. 377–384, 1996.
- [9] E. S. Garcia-Martin, B. Rojas, A. I. Ramirez et al., "Macular thickness as a potential biomarker of mild Alzheimer's disease," *Ophthalmology*, vol. 121, no. 5, pp. 1149–1151, 2014.

- [10] P. K. Iseri, Ö. Altınbaş, T. Tokay, and N. Yüksel, "Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease," *Journal of Neuro-Ophthalmology*, vol. 26, no. 1, pp. 18–24, 2006.
- [11] V. Parisi, R. Restuccia, F. Fattapposta, C. Mina, M. G. Bucci, and F. Pierelli, "Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients," *Clinical Neurophysiology*, vol. 112, no. 10, pp. 1860–1867, 2001.
- [12] C. Paquet, M. Boissonnot, F. Roger, P. Dighiero, R. Gil, and J. Hugon, "Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Neuroscience Letters*, vol. 420, no. 2, pp. 97–99, 2007.
- [13] Y. Lu, Z. Li, X. Zhang et al., "Retinal nerve fiber layer structure abnormalities in early Alzheimer's disease: evidence in optical coherence tomography," *Neuroscience Letters*, vol. 480, no. 1, pp. 69–72, 2010.
- [14] F. Berisha, G. T. Feke, C. L. Trempe, J. W. McMeel, and C. L. Schepens, "Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 5, pp. 2285–2289, 2007.
- [15] R. Kromer, N. Serbecic, L. Hausner, F. Aboul-Enein, L. Froedich, and S. C. Beutelspacher, "Detection of retinal nerve fiber layer defects in Alzheimer's disease using SD-OCT," *Frontiers in Psychiatry*, vol. 5, article 22, 2014.
- [16] A. Kesler, V. Vakhapova, A. D. Korczyn, E. Naftaliev, and M. Neudorfer, "Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Clinical Neurology and Neurosurgery*, vol. 113, no. 7, pp. 523–526, 2011.
- [17] C. Y. Cheung, Y. T. Ong, S. Hilal et al., "Retinal ganglion cell analysis using high-definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 45, no. 1, pp. 45–56, 2015.
- [18] E. O. Oktem, E. Derle, S. Kibaroglu, C. Oktem, I. Akkoyun, and U. Can, "The relationship between the degree of cognitive impairment and retinal nerve fiber layer thickness," *Neurological Sciences*, 2015.
- [19] D. Liu, L. Zhang, Z. Li et al., "Thinner changes of the retinal nerve fiber layer in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *BMC Neurology*, vol. 15, article 14, 2015.
- [20] M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V. Ljubimov et al., "Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model," *NeuroImage*, vol. 54, no. 1, pp. S204–S217, 2011.
- [21] Y. Tsai, B. Lu, A. V. Ljubimov et al., "Ocular changes in TGF344-AD rat model of Alzheimer's disease," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 55, no. 1, pp. 523–534, 2014.
- [22] B. Liu, S. Rasool, Z. Yang et al., "Amyloid-peptide vaccinations reduce  $\beta$ -amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice," *The American Journal of Pathology*, vol. 175, no. 5, pp. 2099–2110, 2009.
- [23] U. Kayabasi, R. Serrgott, and M. Rispoli, "Retinal examination for the diagnosis of Alzheimer's disease," *Journal of Clinical Ophthalmology and Research*, vol. 3, article 4, 2014.
- [24] M. C. Campbell, D. DeVries, L. Emptage et al., "Polarization properties of amyloid beta in the retina of the eye as a biomarker of Alzheimer's disease," in *Bio-Optics: Design and Application*, p. BM3A.4, OSA Publishing, 2015.
- [25] Y. Koronyo, B. C. Salumbides, K. L. Black, and M. Koronyo-Hamaoui, "Alzheimer's disease in the retina: Imaging retinal  $\text{A}\beta$  plaques for early diagnosis and therapy assessment," *Neurodegenerative Diseases*, vol. 10, no. 1–4, pp. 285–293, 2012.
- [26] P. R. Hof and J. H. Morrison, "Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 301, no. 1, pp. 55–64, 1990.
- [27] G. L. Trick, L. R. Trick, P. Morris, and M. Wolf, "Visual field loss in senile dementia of the Alzheimer's type," *Neurology*, vol. 45, no. 1, pp. 68–74, 1995.
- [28] R. Steffes and J. Thralow, "Visual field limitation in the patient with dementia of the Alzheimer's type," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 35, no. 3, pp. 198–204, 1987.
- [29] S. L. Risacher, D. WuDunn, S. M. Pepin et al., "Visual contrast sensitivity in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and older adults with cognitive complaints," *Neurobiology of Aging*, vol. 34, no. 4, pp. 1133–1144, 2013.
- [30] A. Cronin-Golomb, R. Sugiura, S. Corkin, and J. H. Growdon, "Incomplete Achromatopsia in Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 14, no. 5, pp. 471–477, 1993.
- [31] M. Pache, C. H. W. Smeets, P. F. Gasio et al., "Colour vision deficiencies in Alzheimer's disease," *Age and Ageing*, vol. 32, no. 4, pp. 422–426, 2003.
- [32] G. Salamone, C. Di Lorenzo, S. Mosti et al., "Color discrimination performance in patients with Alzheimer's disease," *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 27, no. 6, pp. 501–507, 2009.
- [33] K. Krasodomska, W. Lubiński, A. Potemkowski, and K. Honczarenko, "Pattern electroretinogram (PERG) and pattern visual evoked potential (PVEP) in the early stages of Alzheimer's disease," *Documenta Ophthalmologica*, vol. 121, no. 2, pp. 111–121, 2010.
- [34] G. L. Trick, M. C. Barris, and M. Bickler-Bluth, "Abnormal pattern electroretinograms in patients with senile dementia of the Alzheimer type," *Annals of Neurology*, vol. 26, no. 2, pp. 226–231, 1989.
- [35] A. Cronin-Golomb, J. F. Rizzo, S. Corkin, and J. H. Growdon, "Visual function in Alzheimer's disease and normal aging," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 640, pp. 28–35, 1991.
- [36] V. Lakshminarayanan, J. Lagrave, M. L. Kean, M. Dick, and R. Shankle, "Vision in dementia: contrast effects," *Neurological Research*, vol. 18, no. 1, pp. 9–15, 1996.
- [37] S. A. Neargarder, E. R. Stone, A. Cronin-Golomb, and S. Oross, "The impact of acuity on performance of four clinical measures of contrast sensitivity in Alzheimer's disease," *Journals of Gerontology, Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, vol. 58, no. 1, pp. P54–P62, 2003.
- [38] D. A. Valenti, "Alzheimer's disease: visual system review," *Optometry*, vol. 81, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [39] I. B. Wöllner and S. P. Diamond, "The measurement of spatial contrast sensitivity in cases of blurred vision associated with cerebral lesions," *Brain*, vol. 99, no. 4, pp. 695–710, 1976.
- [40] G. Schlotterer, M. Moscovitch, and D. Crapper-McLachlan, "Visual processing deficits as assessed by spatial frequency contrast sensitivity and backward masking in normal ageing and Alzheimer's disease," *Brain*, vol. 107, no. 1, pp. 309–324, 1984.
- [41] C. E. Wright, N. Drasdo, and G. F. A. Harding, "Pathology of the optic nerve and visual association areas. Information given by the flash and pattern visual evoked potential, and the temporal

- and spatial contrast sensitivity function," *Brain*, vol. 110, no. 1, pp. 107–120, 1987.
- [42] A. Cronin-Golomb, S. Corkin, and J. H. Growdon, "Contrast sensitivity in Alzheimer's disease," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 4, p. 7, 1987.
- [43] L. Gao, Y. Liu, X. Li, Q. Bai, and P. Liu, "Abnormal retinal nerve fiber layer thickness and macula lutea in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 60, no. 1, pp. 162–167, 2015.
- [44] E. Marziani, S. Pomati, P. Ramolfo et al., "Evaluation of retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer thickness in Alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 54, no. 9, pp. 5953–5958, 2013.
- [45] B. Reisberg, S. H. Ferris, M. J. de Leon, and T. Crook, "The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia," *The American Journal of Psychiatry*, vol. 139, no. 9, pp. 1136–1139, 1982.
- [46] L. Ramí, M. Serradell, B. Bosch, A. Villar, and J. L. Molinuevo, "Perception Digital Test (PDT) for the assessment of incipient visual disorder in initial Alzheimer's disease," *Neurologia*, vol. 22, no. 6, pp. 342–347, 2007.
- [47] A. Roth, *Test-28 hue de Roth selon Farnsworth-Munsell (Manual)*, Luneau, Paris, France, 1966.
- [48] D. Farnsworth and M. Color, *The Farnsworth-Munsell 100-Hue Test for the Examination of Color Discrimination*, Munsell Color Company, 1957.
- [49] A. Cronin-Golomb, G. C. Gilmore, S. Neargarder, S. R. Morrison, and T. M. Laudate, "Enhanced stimulus strength improves visual cognition in aging and Alzheimer's disease," *Cortex*, vol. 43, no. 7, pp. 952–966, 2007.
- [50] A. Cronin-Golomb, S. Corkin, J. F. Rizzo, J. Cohen, J. H. Growdon, and K. S. Banks, "Visual dysfunction in Alzheimer's disease: relation to normal aging," *Annals of Neurology*, vol. 29, no. 1, pp. 41–52, 1991.
- [51] G. C. Gilmore and P. J. Whitehouse, "Contrast sensitivity in Alzheimer's disease: a 1-year longitudinal analysis," *Optometry & Vision Science*, vol. 72, no. 2, pp. 83–91, 1995.
- [52] D. N. Levine, J. M. Lee, and C. M. Fisher, "The visual variant of Alzheimer's disease: a clinicopathologic case study," *Neurology*, vol. 43, no. 2, pp. 305–313, 1993.
- [53] M. F. Mendez, R. L. Tomsak, and B. Remler, "Disorders of the visual system in Alzheimer's disease," *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology*, vol. 10, no. 1, pp. 62–69, 1990.
- [54] M. Rizzo and M. Nawrot, "Perception of movement and shape in Alzheimer's disease," *Brain*, vol. 121, no. 12, pp. 2259–2270, 1998.
- [55] A. A. Sadun, M. Borchert, E. DeVita, D. R. Hinton, and C. J. Bassi, "Assessment of visual impairment in patients with Alzheimer's disease," *The American Journal of Ophthalmology*, vol. 104, no. 2, pp. 113–120, 1987.
- [56] C. Murgatroyd and R. Prettyman, "An investigation of visual hallucinosis and visual sensory status in dementia," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 16, no. 7, pp. 709–713, 2001.
- [57] M. S. Livingstone and D. H. Hubel, "Psychophysical evidence for separate channels for the perception of form, color, movement, and depth," *The Journal of Neuroscience*, vol. 7, no. 11, pp. 3416–3468, 1987.
- [58] C. J. Bassi, K. Solomon, and D. Young, "Vision in aging and dementia," *Optometry & Vision Science*, vol. 70, no. 10, pp. 809–813, 1993.
- [59] R. W. Crow, L. B. Levin, L. LaBree, R. Rubin, and S. E. Feldon, "Sweep visual evoked potential evaluation of contrast sensitivity in Alzheimer's dementia," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 44, no. 2, pp. 875–878, 2003.
- [60] F. K. Cormack, M. Tovee, and C. Ballard, "Contrast sensitivity and visual acuity in patients with Alzheimer's disease," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 15, no. 7, pp. 614–620, 2000.
- [61] J. T. Hutton, J. L. Morris, J. W. Elias, and J. N. Poston, "Contrast sensitivity dysfunction in Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 43, no. 11, pp. 2328–2330, 1993.
- [62] D. R. Baker, M. F. Mendez, J. C. Townsend, P. F. Ilsen, and D. C. Bright, "Optometric management of patients with Alzheimer's disease," *Journal of the American Optometric Association*, vol. 68, no. 8, pp. 483–494, 1997.
- [63] G. C. Gilmore, A. Cronin-Golomb, S. A. Neargarder, and S. R. Morrison, "Enhanced stimulus contrast normalizes visual processing of rapidly presented letters in Alzheimer's disease," *Vision Research*, vol. 45, no. 8, pp. 1013–1020, 2005.
- [64] S. Wood, K. F. Mortel, M. Hiscock, B. G. Breitmeyer, and J. S. Caroselli, "Adaptive and maladaptive utilization of color cues by patients with mild to moderate Alzheimer's disease," *Archives of Clinical Neuropsychology*, vol. 12, no. 5, pp. 483–489, 1997.
- [65] F. Massoud, H. Chertkow, V. Whitehead, O. Overbury, and H. Bergman, "Word-reading thresholds in Alzheimer disease and mild memory loss: a pilot study," *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, vol. 16, no. 1, pp. 31–39, 2002.
- [66] A. Cronin-Golomb, S. Corkin, and J. H. Growdon, "Visual dysfunction predicts cognitive deficits in Alzheimer's disease," *Optometry & Vision Science*, vol. 72, no. 3, pp. 168–176, 1995.
- [67] J. F. Rizzo III, A. Cronin-Golomb, J. H. Growdon et al., "Retinocalcarine function in Alzheimer's disease: a clinical and electrophysiological study," *Archives of Neurology*, vol. 49, no. 1, pp. 93–101, 1992.
- [68] A. Cronin-Golomb, S. Corkin, and J. H. Growdon, "Visual dysfunction predicts cognitive deficits in Alzheimer's disease," *Optometry and Vision Science*, vol. 72, no. 3, pp. 168–176, 1995.
- [69] P. R. Martin, A. J. R. White, A. K. Goodchild, H. D. Wilder, and A. E. Sefton, "Evidence that blue-on cells are part of the third geniculocortical pathway in primates," *European Journal of Neuroscience*, vol. 9, no. 7, pp. 1536–1541, 1997.
- [70] D. M. Dacey and B. B. Lee, "The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type," *Nature*, vol. 367, no. 6465, pp. 731–735, 1994.
- [71] K. L. Possin, "Visual spatial cognition in neurodegenerative disease," *Neurocase*, vol. 16, no. 6, pp. 466–487, 2010.
- [72] A. L. Benton, *Contributions to Neuropsychological Assessment: A Clinical Manual*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1994.

## Research Article

# Analysis of Retinal Peripapillary Segmentation in Early Alzheimer's Disease Patients

Elena Salobar-García,<sup>1</sup> Irene Hoyas,<sup>1,2</sup> Mercedes Leal,<sup>1,2</sup> Rosa de Hoz,<sup>1,3</sup>  
Blanca Rojas,<sup>1,2</sup> Ana I. Ramirez,<sup>1,3</sup> Juan J. Salazar,<sup>1,3</sup> Raquel Yubero,<sup>4</sup> Pedro Gil,<sup>2,4</sup>  
Alberto Triviño,<sup>1,2</sup> and José M. Ramirez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Oftalmología y ORL, Facultad de Medicina, UCM, 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Oftalmología y ORL, Facultad de Óptica y Optometría UCM, 28040 Madrid, Spain

<sup>4</sup>Servicio de Geriatria, Hospital Universitario Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to José M. Ramirez; ramirez@med.ucm.es

Received 23 March 2015; Accepted 8 June 2015

Academic Editor: Jose F. Arevalo

Copyright © 2015 Elena Salobar-García et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Decreased thickness of the retinal nerve fiber layer (RNFL) may reflect retinal neuronal-ganglion cell death. A decrease in the RNFL has been demonstrated in Alzheimer's disease (AD) in addition to aging by optical coherence tomography (OCT). Twenty-three mild-AD patients and 28 age-matched control subjects with mean Mini-Mental State Examination 23.3 and 28.2, respectively, with no ocular disease or systemic disorders affecting vision, were considered for study. OCT peripapillary and macular segmentation thickness were examined in the right eye of each patient. Compared to controls, eyes of patients with mild-AD patients showed no statistical difference in peripapillary RNFL thickness ( $P > 0.05$ ); however, sectors 2, 3, 4, 8, 9, and 11 of the papilla showed thinning, while in sectors 1, 5, 6, 7, and 10 there was thickening. Total macular volume and RNFL thickness of the fovea in all four inner quadrants and in the outer temporal quadrants proved to be significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Despite the fact that peripapillary RNFL thickness did not statistically differ in comparison to control eyes, the increase in peripapillary thickness in our mild-AD patients could correspond to an early neurodegeneration stage and may entail the existence of an inflammatory process that could lead to progressive peripapillary fiber damage.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia, afflicts 67 of every 1000 persons over age 65. Its prevalence and incidence increase exponentially with age [1, 2]. In 2006, the worldwide prevalence of Alzheimer's was 26.6 million, and by 2050, the prevalence will quadruple, meaning that by that time 1 in 85 persons worldwide will be living with the disease [2].

AD is characterized by a decline in cognitive function, loss of learning and memory, and the formation of neuritic plaques and neurofibrillary tangles, primarily in the cerebral cortex [3, 4].

The retina is a projection of the brain, and a number of similarities between AD pathology and several distinct

retinal degenerations have been described [5, 6]. The retinal nerve fiber layer (RNFL) is composed of retinal-ganglion cell axons that form the optic nerve. Decreased thickness of the RNFL can reflect retinal neuronal-ganglion cell death and axonal loss in the optic nerve [7, 8].

The RNFL reportedly thins with aging [9, 10]. Some studies have also shown a decrease of the RNFL in AD in addition to aging [7, 8, 11–16]. Hinton et al. [17] were the first to show histopathological evidence of retinal-ganglion cell loss and optic-nerve degeneration in patients with AD. These findings were then confirmed in several follow-up studies [18–21]. Indeed, the large magnocellular cell axon degeneration in AD has been documented [19, 22]. Other histopathology studies [23–28], however, have failed to confirm these findings and suggest that methodological differences were responsible for

the contradictory results, due to a different postmortem delay in axon count or difficulties in obtaining well-preserved myelinated axons.

Currently it is thought that retinal ganglion cell (RGC) loss in AD might result from amyloid deposits in the eye and/or retina. Amyloid-beta plaques as well as oligomers have been reported in postmortem retinal tissue from patients with AD and in a mouse model of AD, as well as in human retinal tissue *in vivo* [29]. Therefore, amyloid accumulation in the eye or retina of patients with AD may result in the degeneration of RGC in parallel to amyloid-beta-related neurodegeneration in the brain [29].

Diagnosis and progression of AD, especially early cases, are complicated because of imprecise neuropsychological testing, sophisticated but expensive neuroimaging techniques, and invasive sampling of cerebrospinal fluid [30, 31]. Improved methods for screening and early detection are essential to identify cognitively normal individuals who have a high risk of developing AD, so that treatment can be developed to delay the progression of the disease [32]. Currently, there is no definitive antemortem diagnosis for AD, and new biomarkers for diagnosis are therefore needed. Over the last few decades, very accurate tools for analyzing the eye fundus have been developed (i.e., OCT, laser polarimetry), opening new ways of examining the retina *in vivo*.

OCT is a reliable noninvasive technique, routinely used in ophthalmology to visualize and quantify the layers of the retina. OCT enables quantitative cross-sectional imaging of the RNFL and macular volume. A recent study published by our group [33] has shown that in mild-AD patients the first affected area of the retina is the macular area. As the neurodegeneration progresses, a significant decline in peripapillary RNFL thickness will become apparent.

The goal of the present study was to examine in detail peripapillary and macular segmentation in order to determine which is the earliest thinned area in patients with mild AD which may be used, in the future, as a predictive tool.

## 2. Material and Methods

**2.1. Subjects.** To select patients, we reviewed the Database of the Memory Unit of the Hospital Clínico San Carlos in Madrid (Spain), consisting of a total of 2635 patients. First, we excluded the patients with a Global Deterioration Scale (GDS) over 4 and then those with a mood or psychiatric disorder. Next, we took into account 87 patients with mild AD. These patients, according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-AD and Related Disorders Association and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, had mild cognitive impairment according to the Clinical Dementia Rating scale. Then ophthalmic medical records of these patients were reviewed, excluding patients who were previously diagnosed with an ophthalmological pathology (glaucoma or suspected glaucoma, media opacity, and retinal diseases). After this analysis, 29 patients with AD satisfied all the requirements to participate in the study (GDS over 4 and free of ocular disease and systemic disorders affecting vision

in their medical record). Of the 29 mild-AD patients and 37 age-matched control subjects selected (normal MMSE scores), 6 mild-AD patients and 9 age-matched control subjects were subsequently excluded due to posterior pole pathology including macular degeneration, drusen, suspicion of glaucoma, glaucoma, epiretinal membrane, or cataract that prevented ocular examination. Because of this selection, 23 patients with mild AD and 28 age-matched control subjects were considered for the study. Informed consent was obtained from both groups. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the local ethics committee.

**2.2. Methods.** For the ophthalmological part of the study, the right eye of each patient was analyzed. All participants met the following inclusion criteria: being free of ocular disease, AREDS Clinical Lens Standards <2, retinal drusen, and systemic disorders affecting vision; having a best corrected VA of 20/40; having a  $\pm 5$  spherocylindrical refractive error; and having intraocular pressure of less than 20 mmHg. For screening, all AD patients and control subjects underwent a complete ophthalmologic examination, including assessment of VA, refraction, anterior segment biomicroscopy, applanation tonometry (Perkins MKII tonometer, Haag Streit-Reliance Medical, Switzerland), dilated fundus examination, and OCT. The RNFL thickness and macular thickness were measured by OCT Model 3D OCT-1000 (Topcon, Japan) after pupil dilatation. The RNFL thickness was scanned 3 consecutive times per patient in each area studied. The mean values were considered for statistical analysis. All tests were performed by the same optometrist (ESG) under the same conditions. These tests were selected considering that in this developmental stage of the disease the results were not influenced by the patient's cognitive impairment.

The peripapillary RNFL thickness parameters evaluated in this study were average thickness (360° measurement), thickness for each 12-o'clock hour position with the 3-o'clock position as nasal, 6-o'clock position as inferior, 9-o'clock position as temporal, and 12-o'clock position as superior. Macular RNFL thickness data were displayed in three concentric rings centered in the foveola that were distributed as follows: a central macular ring, 1 mm away from the fovea; an inner macular ring, 3 mm away from the fovea; and an outer macular ring, 6 mm away from the fovea. As a result, the total area studied made up a 6 mm macular map. In addition, the inner and outer rings were each divided into four quadrants (superior, inferior, nasal, and temporal) (Figure 1). The total volume of the macula as provided by the OCT was also calculated. The good scan criteria were determined as the signal-to-noise ratio >30 and accepted A-scans >95% in fast RNFL scanning. All measurements are given in microns, according to the calibration provided by the manufacturers and the total volume in mm<sup>3</sup>.

**2.3. Statistical Analysis.** The data are reported as mean values  $\pm$  SD. The differences between mild AD and control eyes were analyzed using the Mann-Whitney test. Data for the statistical analysis were introduced and processed in a SPSS

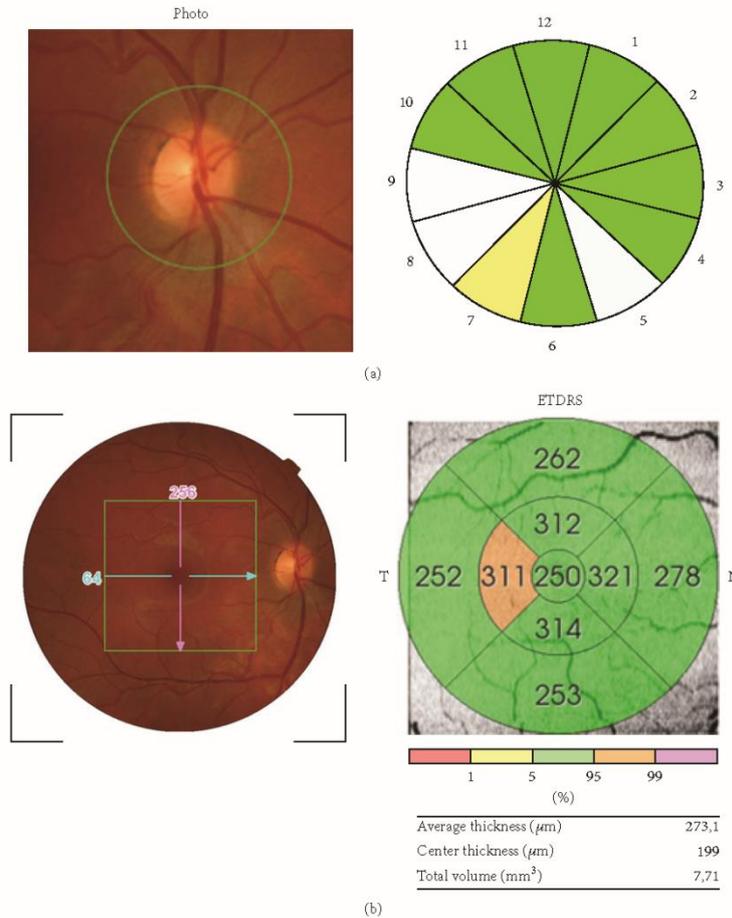


FIGURE 1: OCT report of retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness analysis. (a) Peripapillary OCT. The thickness for each 12-o'clock hour position with the 3-o'clock position as nasal, 6-o'clock position as inferior, 9-o'clock position as temporal, and 12-o'clock position as superior was evaluated. (b) Macular OCT. Diagram showing the concentric rings and quadrants considered for analysis of the macular RNFL thickness and measurements automatically provided by the analyzer.

19.0 (SPSS Inc®, Inc, Chicago, IL, USA). A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

**3. Results**

Demographic and clinical data for the mild-AD patients and control group are shown in Table 1. No statistically significant differences in age, gender, or educational level were found

between the study groups. The MMSE scores in mild-AD patients were significantly decreased in comparison with age-matched control subjects (Table 1). All mild-AD patients had MMSE values higher than 17.

*3.1. Optical Coherence Tomography*

*Peripapillary RNFL Segmentation Thickness.* Peripapillary RNFL thickness values (Figure 2(a)) showed no statistical

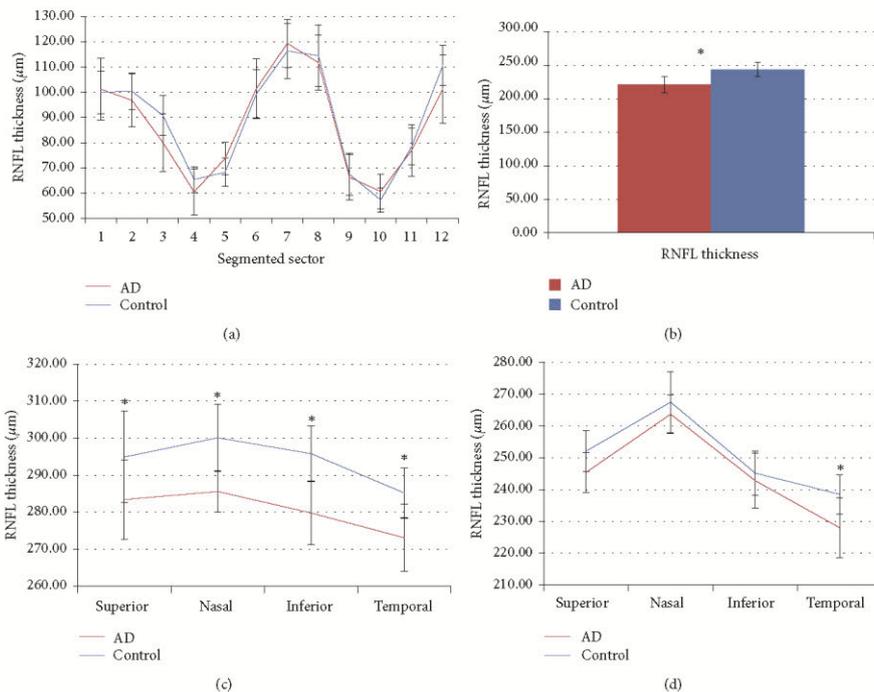


FIGURE 2: Mean data of RNFL thickness against eye quadrants assessed with optical coherence tomography (OCT). (a) Peripapillary segmentation retinal nerve fiber layer, (b) Central macular ring (1 mm away from the fovea). (c) Inner macular ring (3 mm away from the fovea). (d) Outer macular ring (6 mm away from the fovea). \*P value < 0.01.

TABLE 1: Demographic and clinical data of the study groups.

	AD (n = 23)	Control (n = 28)	P value
Age <sup>§</sup>	79.3 ± 4.6	72.3 ± 5.1	0.274
Gender			
Male	9	9	0.615
Female	14	19	
Race	Caucasian	Caucasian	
MMSE <sup>§</sup>	23.3 ± 3.1	28.2 ± 1.9	0.001*
	Range (17-29)	Range (25-31)	

<sup>§</sup>Mean value ± SD; \*P < 0.01 [AD, Alzheimer's disease; MMSE, Mini-Mental State Examination; SD, standard deviation].

difference between mild-AD patients and control subjects (Table 2).

Although the differences were not significant in any of the sectors, it was shown that peripapillary sectors 2, 3, 4, 8, 9, 11, and 12 were thinner in the mild-AD patients than in controls; in peripapillary sectors 1, 5, 6, 7, and 10 the retina in mild-AD patients was thicker with respect to the control (Figure 2(a); Table 2).

**Macular RNFL Thickness and Total Volume.** As we reported in a previous study [33] the analysis of the RNFL revealed that, in patients with mild AD, the values for the central ring (fovea) (Figure 2(b)) and the four inner quadrants (3 mm from the fovea) (Figure 2(c)) were significantly decreased in comparison with control subject ( $P < 0.05$  in both instances; Mann-Whitney  $U$  test) (Table 2). The RNFL thickness of the outer macular quadrants (6 mm from the fovea) (Figure 2(d)) in patients with mild AD was diminished in comparison with control subjects; however, only the values of the outer temporal quadrant were significantly lower ( $P < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Table 2).

The total macular volume was significantly reduced in mild-AD patients in comparison with control subjects ( $P < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Table 2).

#### 4. Discussion

Alzheimer's dementia syndromes, like all neurodegenerative diseases, lack objective disease- and stage-specific biomarkers [34]. As a part of the CNS, the retina or neural portion

TABLE 2: RNFL thickness and total macular volume.

Retinal area of study		AD group <sup>§</sup>	Control group <sup>§</sup>	% RNFL decrease	P value
Peripapillary thickness ( $\mu\text{m}$ )	Sector 1	101.2 $\pm$ 24.4	100.0 $\pm$ 16.9	1.24	0.790
	Sector 2	96.8 $\pm$ 20.8	100.4 $\pm$ 14.4	-3.62	0.618
	Sector 3	80.1 $\pm$ 22.9	90.8 $\pm$ 16.0	-11.85	0.084
	Sector 4	60.5 $\pm$ 18.3	65.4 $\pm$ 10.3	-7.60	0.464
	Sector 5	73.7 $\pm$ 12.7	68.3 $\pm$ 11.3	7.83	0.173
	Sector 6	101.4 $\pm$ 23.7	99.3 $\pm$ 19.0	2.02	0.790
	Sector 7	119.4 $\pm$ 19.1	116.3 $\pm$ 21.9	2.62	0.756
	Sector 8	111.7 $\pm$ 21.6	114.5 $\pm$ 24.5	-2.48	0.564
	Sector 9	66.3 $\pm$ 18.2	67.5 $\pm$ 16.5	-1.80	0.877
	Sector 10	60.7 $\pm$ 13.8	57.3 $\pm$ 9.6	5.99	0.464
	Sector 11	77.0 $\pm$ 20.6	78.5 $\pm$ 14.7	-1.96	0.94
	Sector 12	101.3 $\pm$ 27.1	110.7 $\pm$ 15.8	-8.45	0.335
Foveal thickness ( $\mu\text{m}$ )	Fovea	221.2 $\pm$ 21.6	243.7 $\pm$ 24.8	-9.24	0.015*
Inner macular quadrant ( $\mu\text{m}$ )	Superior area	283.4 $\pm$ 11.1	294.9 $\pm$ 18.1	-3.91	0.002*
	Inferior area	279.8 $\pm$ 18.1	295.8 $\pm$ 13.5	-5.40	0.002*
	Nasal area	285.6 $\pm$ 17.2	300.1 $\pm$ 15.1	-4.83	0.007*
	Temporal area	273.1 $\pm$ 12.7	285.2 $\pm$ 14.6	-4.22	0.002*
Outer macular quadrant ( $\mu\text{m}$ )	Superior area	245.4 $\pm$ 12.5	252.1 $\pm$ 13.7	-2.65	0.084
	Inferior area	242.8 $\pm$ 17.4	245.2 $\pm$ 13.9	-0.99	0.531
	Nasal area	263.7 $\pm$ 12.1	267.5 $\pm$ 19.1	-1.41	0.110
	Temporal area	228.0 $\pm$ 18.8	238.5 $\pm$ 12.3	-4.43	0.009*
Total macular volume ( $\text{mm}^3$ )		71 $\pm$ 0.3	73 $\pm$ 0.3	9.34	0.024*

<sup>§</sup>Mean value  $\pm$  SD; \*  $P < 0.05$  [AD, Alzheimer's disease; RNFL: retinal nerve fiber layer; SD, standard deviation].

of the eye shares many features with the brain, including embryological origin as well as anatomical and physiological characteristics. Its peripheral location provides an accessible and noninvasive way of examining brain pathology [35]. OCT is a reliable noninvasive technique that enables quantitative cross-sectional imaging of the RNFL [36].

Thinning of the RNFL has been found in several neurological diseases, such as Parkinson's disease [16, 37–39], dementia with Lewy Bodies [16], amnesic mild cognitive impairment [8, 15], neuromyelitis optica [40], migraine [41], and AD [8, 11–17, 20, 27, 36, 37, 42–45]. The loss of RNFL thickness in AD is linked to a depletion of retinal-ganglion cells and optic-nerve axons [13, 14, 32, 46, 47]. It has been postulated that the defects in RNFL may be the earliest sign of AD, even prior to damage to the hippocampal region that impairs memory [36]. In addition, published data suggest an association between the thinning of RNFL and severity of AD [8, 11].

In the present work, we compare the peripapillary RNFL segmentation thickness, macular thickness, and the total macular volume in mild-AD patients and age-matched control subjects. One of the relevant issues of the study was that the sample analyzed here was homogeneous in that (i) all patients had recently been diagnosed as having mild AD (GDS 4, Reisberg scale [48]) with mean MMSE score values of  $23.7 \pm 3.3$ ; (ii) all the individuals were Caucasians; and (iii) there were no significant differences in age or educational level among the groups. The results of our study showed a

difference between the peripapillary RNFL segmentation and the macula thickness in our mild-AD patients in that only the macular thickness was significantly decreased in comparison with the control group.

Widespread axonal degeneration in the optic nerve was found in a postmortem study of patients with AD [17]. Morphometric analysis of the whole-mount retina has shown that Alzheimer's patients had a predominant loss of the largest class of retinal-ganglion cells (M-cells), which could be a primary process or a consequence of retrograde neurodegeneration occurring in the cortical regions [19]. *In vivo* studies using different methodologies have confirmed optic-nerve-fiber damage in AD when compared with controls. Optic disc pallor, pathologic disc cupping, and thinning of the neuroretinal rim and the RNFL have been reported in studies based on the subjective evaluation of fundus photographs [11, 42] and the optic-nerve analyzer [42].

There is controversy on the reduction of the peripapillary RNFL thickness measured by OCT in AD. A reduction in the thickness of all peripapillary RNFL quadrants as measured by OCT has been reported [12, 43], and it has been suggested that this morphologic abnormality is related to retinal dysfunction as revealed by abnormal patterns in electroretinogram responses [43]. However, some OCT studies on peripapillary thickness in AD [8, 13, 15, 16, 36, 44, 45, 49] found that the RNFL thinning was restricted to the superior quadrant [13, 44, 50–52] or to the superior and inferior quadrants [15, 37, 45] in comparison with control subjects. Some studies have

correlated cognitive decline with decreased RNFL thickness [33, 50, 53]. It has been suggested that the inferior quadrant of the RNFL may be a more specific and sensitive area than other RNFL quadrants in predicting the deterioration of cognitive status to reflect retinal abnormality in the early stages of AD [15, 50]. The reason for the variability of the results among studies could be related to MMSE scores. Thus, Parisi et al. [43] and Iseri et al. [12], whose patients had more advanced AD (ranges of MMSE scores 11 to 19 and 8 to 28, resp.), showed a reduction in RNFL thickness in all peripapillary quadrants. Kesler et al. [15], whose patients had a mean MMSE score of 23.6, showed a decrease in the superior and inferior peripapillary quadrants. By contrast, both Berisha et al. [13], whose Alzheimer's patients had higher MMSE scores (17 to 30), and Paquet et al. [8], whose patients had a mean MMSE score of 22.6, found a thickness reduction only in the superior peripapillary quadrant, postulating this finding as being the earliest peripapillary retinal damage in AD patients. In our patients, with MMSE values similar to those reported by Berisha and Paquet, the reduction of mean peripapillary RNFL thickness did not reach statistical significance in comparison to control, but peripapillary RNFL thickness diminished or increased, depending on the segment studied. It should be noted that the thinning sectors of papilla corresponded to 2, 3, 4, 8, 9, and 11, while sectors 1, 5, 6, 7, and 10 showed a thickening. These values differ from those found in the same sectors of the controls but in any case reach statistical significance.

Most authors, although working in more advanced stages of disease (MMSE > 23.7), agree that the peripapillary RNFL thinning is significant in the superior and inferior sectors [13, 37, 44]. However, sectors 1, 5, 6, 7, and 10 in our patients showed thickening. This dissimilarity could be explained because of difference in the stage of the disease, which in our case corresponded to a much earlier stage. This tendency towards greater thickness, although not statistically significant, could be related to the findings of Ascaso et al. in the macula of patients with mild cognitive impairment (MCI) and AD. Patients with MCI had greater RNFL thickness compared to AD and controls, suggesting that this difference could be caused by inflammation after gliosis neuronal death [54]. Similarly, the increase in peripapillary thickness in our mild-AD patients in the sectors 1, 5, 6, 7, and 10, corresponding to the superior and inferior sectors, may indicate a phase of inflammation and gliosis of neural tissue prior to the degenerative process.

Reactive astrogliosis in the brain is a well-known feature of AD, but its role in AD is not well understood. Reactive astrogliosis tends to be focal in AD. Reactive astrocytes are intimately associated with amyloid plaques or diffuse amyloid deposits. Astrocytes surround them with dense layers of processes as if forming miniature scars around them, perhaps to wall them off and act as neuroprotective barriers [55]. It is plausible that, in the early stages of the disease, microglial activation could help remove amyloid plaques, while in later phases proinflammatory cytokines induced by microglia could contribute to neurodegenerative process [56, 57].

In the same way, retinal neurodegenerative diseases are also associated with chronic microglial activation and

neuroinflammation. In the degenerating retina, endogenous signals activate microglial cells, leading to their local proliferation, migration, enhanced phagocytosis, and secretion of cytokines, chemokines, and neurotoxins. These immunological responses and the loss of limiting control mechanisms may contribute significantly to retinal tissue damage and proapoptotic events in retinal neurodegeneration [57–59]. A limitation to be considered in our study, as well as those reported in the literature on RNFL thickness evaluation by OCT, is the number of patients included. Studies on early-stage Alzheimer's patients are difficult to perform, one reason being that these patients usually come for diagnosis at advanced stages of the disease. Taking this into consideration and the homogeneity of the patients included in the present work, we consider that our data provide preliminary evidence to warrant a more extensive study.

## 5. Conclusions

In the present study, the analysis of the OCT values of both peripapillary and macular RNFL thickness in patients with mild AD (MMSE = 23.7) showed that only in the macula was there a significant thickness reduction compared to aged-matched controls. Our data, taken together with those reported in the literature, move us to propose the hypothesis that the first affected area of the retina in mild AD is the macular area, where, due to the arrangement of the multilayer bodies of the ganglion cells, the decrease is easier to detect.

Subsequently, as the neurodegeneration progresses, a significant decline in peripapillary RNFL thickness will become apparent. The study of the peripapillary segmentation reveals, in a more accurate way, the changes that occur in RNFL thickness in relation to the macular-thickness changes. In this sense, our patients with mild AD differed with respect to controls, although without reaching statistical significance; perhaps due to the early stage of the disease. In addition, the increase in peripapillary thickness in our mild-AD patients may indicate the existence of an inflammatory process that would lead to neurodegeneration of the peripapillary fibers. More extensive studies should be conducted to test these findings.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ophthalmological Network OFTARED (RD12-0034/0002: Prevención, Detección Precoz y Tratamiento de la Patología Ocular Prevalente Degenerativa y Crónica), of the Institute of Health of Carlos III of the Spanish Ministry of Economy. This work has been funded by the PN I+D+i 2008–2011, by the ISCIII-Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, and by the European programme FEDER; grants to Elena Salobrar-García are currently supported by a Predoctoral Fellowship

(FPU) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

## References

- [1] D. Hirtz, D. J. Thurman, K. Gwinn-Hardy, M. Mohamed, A. R. Chaudhuri, and R. Zalutsky, "How common are the 'common' neurologic disorders?" *Neurology*, vol. 68, no. 5, pp. 326–337, 2007.
- [2] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and H. M. Arrighi, "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 3, no. 3, pp. 186–191, 2007.
- [3] J. L. Cummings, H. V. Vinters, G. M. Cole, and Z. S. Khachaturian, "Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 51, no. 1, supplement 1, pp. S2–S17, 1998.
- [4] B. J. Small, E. Gagnon, and B. Robinson, "Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment," *Geriatrics*, vol. 62, no. 4, pp. 19–23, 2007.
- [5] S. J. McKinnon, "Glaucoma: ocular Alzheimer's disease?" *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, pp. s1140–s1156, 2003.
- [6] K. Chia, K. So, and R. C. Chang, "Progressive neurodegeneration of retina in Alzheimer's disease—are  $\beta$ -amyloid peptide and Tau new pathological factors in glaucoma?" in *Glaucoma—Basic and Clinical Aspects*, S. Rumelt, Ed., pp. 157–177, 2013.
- [7] R. Varma, S. Bazzaz, and M. Lai, "Optical tomography-measured retinal nerve fiber layer thickness in normal latinos," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 44, no. 8, pp. 3369–3373, 2003.
- [8] C. Paquet, M. Boissonnot, F. Roger, P. Dighiero, R. Gil, and J. Hugon, "Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Neuroscience Letters*, vol. 420, no. 2, pp. 97–99, 2007.
- [9] M. J. Cohen, E. Kaliner, S. Frenkel, M. Kogau, H. Miron, and E. Z. Blumenthal, "Morphometric analysis of human peripapillary retinal nerve fiber layer thickness," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 49, no. 3, pp. 941–944, 2008.
- [10] C. Bowd, L. M. Zangwill, E. Z. Blumenthal et al., "Imaging of the optic disc and retinal nerve fiber layer: the effects of age, optic disc area, refractive error, and gender," *Journal of the Optical Society of America A: Optics and Image Science, and Vision*, vol. 19, no. 1, pp. 197–207, 2002.
- [11] T. R. Hedges III, R. P. Galves, D. Speigelman, N. R. Barbas, E. Peli, and C. J. Yardley, "Retinal nerve fiber layer abnormalities in Alzheimer's disease," *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, vol. 74, no. 3, pp. 271–275, 1996.
- [12] P. K. Iseri, Ö. Altınış, T. Tokay, and N. Yüksel, "Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease," *Journal of Neuro-Ophthalmology*, vol. 26, no. 1, pp. 18–24, 2006.
- [13] F. Berisha, G. T. Feke, C. L. Trempe, J. W. McMeel, and C. L. Schepens, "Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48, no. 5, pp. 2285–2289, 2007.
- [14] D. A. Valenti, "Neuroimaging of retinal nerve fiber layer in AD using optical coherence tomography," *Neurology*, vol. 69, no. 10, article 1060, 2007.
- [15] A. Kesler, V. Vakhapova, A. D. Korczyn, E. Naftaliev, and M. Neudorfer, "Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Clinical Neurology and Neurosurgery*, vol. 113, no. 7, pp. 523–526, 2011.
- [16] T. Moreno-Ramos, J. Benito-León, A. Villarejo, and F. Bermejo-Pareja, "Retinal nerve fiber layer thinning in dementia associated with parkinson's disease, dementia with lewy bodies, and alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 34, no. 3, pp. 659–664, 2013.
- [17] D. R. Hinton, A. A. Sadun, J. C. Blanks, and C. A. Miller, "Optic nerve degeneration in Alzheimer's disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 315, no. 8, pp. 485–487, 1986.
- [18] J. C. Blanks, D. R. Hinton, A. A. Sadun, and C. A. Miller, "Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease," *Brain Research*, vol. 501, no. 2, pp. 364–372, 1989.
- [19] A. A. Sadun and C. J. Bassi, "Optic nerve damage in Alzheimer's disease," *Ophthalmology*, vol. 97, no. 1, pp. 9–17, 1990.
- [20] J. C. Blanks, Y. Torigoe, D. R. Hinton, and R. H. I. Blanks, "Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina," *Neurobiology of Aging*, vol. 17, no. 3, pp. 377–384, 1996.
- [21] J. C. Blanks, S. Y. Schmidt, Y. Torigoe, K. V. Porrello, D. R. Hinton, and R. H. I. Blanks, "Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL," *Neurobiology of Aging*, vol. 17, no. 3, pp. 385–395, 1996.
- [22] B. Katz, S. Rimmer, V. Iragui, and R. Katzman, "Abnormal pattern electroretinogram in Alzheimer's disease: evidence for retinal ganglion cell degeneration?" *Annals of Neurology*, vol. 26, no. 2, pp. 221–225, 1989.
- [23] C. A. Curcio and D. N. Drucker, "Retinal ganglion cells in Alzheimer's disease and aging," *Annals of Neurology*, vol. 33, no. 3, pp. 248–257, 1993.
- [24] D. C. Davies, P. McCoubrie, B. McDonald, and K. A. Jobst, "Myelinated axon number in the optic nerve is unaffected by Alzheimer's disease," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 79, no. 6, pp. 596–600, 1995.
- [25] L. Justino, M.-J. Kergoat, H. Bergman, H. Chertkow, A. Robillard, and H. Kergoat, "Neuroretinal function is normal in early dementia of the Alzheimer type," *Neurobiology of Aging*, vol. 22, no. 4, pp. 691–695, 2001.
- [26] H. Kergoat, M.-J. Kergoat, L. Justino, A. Robillard, H. Bergman, and H. Chertkow, "Normal optic nerve head topography in the early stages of dementia of the Alzheimer type," *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 12, no. 6, pp. 359–363, 2001.
- [27] H. Kergoat, M.-J. Kergoat, L. Justino, H. Chertkow, A. Robillard, and H. Bergman, "An evaluation of the retinal nerve fiber layer thickness by scanning laser polarimetry in individuals with dementia of the Alzheimer type," *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, vol. 79, no. 2, pp. 187–191, 2001.
- [28] H. L. N. Kergoat, M.-J. Kergoat, L. Justino, H. Chertkow, A. Robillard, and H. Bergman, "Visual retinocortical function in dementia of the Alzheimer type," *Gerontology*, vol. 48, no. 4, pp. 197–203, 2002.
- [29] Y. Koronyo, B. C. Salumbides, K. L. Black, and M. Koronyo-Hamaoui, "Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal A $\beta$  plaques for early diagnosis and therapy assessment," *Neurodegenerative Diseases*, vol. 10, no. 1–4, pp. 285–293, 2012.
- [30] R. C. Petersen, J. C. Stevens, M. Ganguli, E. G. Tangalos, J. L. Cummings, and S. T. DeKosky, "Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology," *Neurology*, vol. 56, no. 9, pp. 1133–1142, 2001.
- [31] J. C. Morris, "Mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease," *Geriatrics*, vol. 60, no. 6, supplement, pp. 9–14, 2005.

- [32] M. K. Ikram, C. Y. Cheung, T. Y. Wong, and C. P. L. H. Chen, "Retinal pathology as biomarker for cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, vol. 83, no. 9, pp. 917-922, 2012.
- [33] E. S. Garcia-Martín, B. Rojas, A. I. Ramirez et al., "Macular thickness as a potential biomarker of mild Alzheimer's disease," *Ophthalmology*, vol. 121, no. 5, pp. 1149-1151, 2014.
- [34] D. S. Geldmacher, "Differential diagnosis of dementia syndromes," *Clinics in Geriatric Medicine*, vol. 20, no. 1, pp. 27-43, 2004.
- [35] N. Patton, T. Aslam, T. MacGillivray, A. Pattie, I. J. Deary, and B. Dhillon, "Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: a rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures," *Journal of Anatomy*, vol. 206, no. 4, pp. 319-348, 2005.
- [36] X.-F. He, Y.-T. Liu, C. Peng, F. Zhang, S. Zhuang, and J.-S. Zhang, "Optical coherence tomography assessed retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer's disease: a meta-analysis," *International Journal of Ophthalmology*, vol. 5, no. 3, pp. 401-405, 2012.
- [37] M. M. Moschos, G. Tagaris, I. Markopoulos et al., "Morphologic changes and functional retinal impairment in patients with Parkinson disease without visual loss," *European Journal of Ophthalmology*, vol. 21, no. 1, pp. 24-29, 2011.
- [38] P. Albrecht, A.-K. Müller, M. Südmeyer et al., "Optical coherence tomography in Parkinsonian syndromes," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, Article ID e34891, 2012.
- [39] C. R. Adam, E. Shrier, Y. Ding, S. Glazman, and I. Bodis-Wollner, "Correlation of inner retinal thickness evaluated by spectral-domain optical coherence tomography and contrast sensitivity in Parkinson disease," *Journal of Neuro-Ophthalmology*, vol. 33, no. 2, pp. 137-142, 2013.
- [40] J. N. Ratchford, M. E. Quigg, A. Conger et al., "Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies," *Neurology*, vol. 73, no. 4, pp. 302-308, 2009.
- [41] A. Martinez, N. Proupin, and M. Sanchez, "Retinal nerve fibre layer thickness measurements using optical coherence tomography in migraine patients," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 92, no. 8, pp. 1069-1075, 2008.
- [42] C. S. Tsai, R. Ritch, B. Schwartz et al., "Optic nerve head and nerve fiber layer in Alzheimer's disease," *Archives of Ophthalmology*, vol. 109, no. 2, pp. 199-204, 1991.
- [43] V. Parisi, R. Restuccia, F. Fattapposta, C. Mina, M. G. Bucci, and F. Pierelli, "Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients," *Clinical Neurophysiology*, vol. 112, no. 10, pp. 1860-1867, 2001.
- [44] Y. Chi, Y.-H. Wang, and L. Yang, "The investigation of retinal nerve fiber loss in Alzheimer's disease," *Chinese Journal of Ophthalmology*, vol. 46, no. 2, pp. 134-139, 2010.
- [45] Y. Lu, Z. Li, X. Zhang et al., "Retinal nerve fiber layer structure abnormalities in early Alzheimer's disease: evidence in optical coherence tomography," *Neuroscience Letters*, vol. 480, no. 1, pp. 69-72, 2010.
- [46] H. V. Danesh-Meyer, H. Birch, J. Y.-F. Ku, S. Carroll, and G. Gamble, "Reduction of optic nerve fibers in patients with Alzheimer disease identified by laser imaging," *Neurology*, vol. 67, no. 10, pp. 1852-1854, 2006.
- [47] N. Müller and D. A. Drachman, "The optic nerve: a window into diseases of the brain?" *Neurology*, vol. 67, no. 10, pp. 1742-1743, 2006.
- [48] B. Reisberg, S. H. Ferris, M. J. de Leon, and T. Crook, "The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia," *American Journal of Psychiatry*, vol. 139, no. 9, pp. 1136-1139, 1982.
- [49] M. M. Moschos, I. Markopoulos, I. Chatziralli et al., "Structural and functional impairment of the retina and optic nerve in Alzheimer's disease," *Current Alzheimer Research*, vol. 9, no. 7, pp. 782-788, 2012.
- [50] Y. Shen, Z. Shi, R. Jia et al., "The attenuation of retinal nerve fiber layer thickness and cognitive deterioration," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 7, article 142, 2013.
- [51] R. Kromer, N. Serbecic, L. Hausner, F. Aboul-Enein, L. Froelich, and S. Beutelspacher, "Detection of retinal nerve fiber layer defects in Alzheimer's disease using SD-OCT," *Frontiers in Psychiatry*, vol. 5, p. 22, 2014.
- [52] S. Kirbas, K. Turkyilmaz, O. Anlar, A. Tufekci, and M. Durmus, "Retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer disease," *Journal of Neuro-Ophthalmology*, vol. 33, no. 1, pp. 58-61, 2013.
- [53] E. O. Oktem, E. Derle, S. Kibaroglu, C. Oktem, I. Akkoyun, and U. Can, "The relationship between the degree of cognitive impairment and retinal nerve fiber layer thickness," *Neurological Sciences*, 2015.
- [54] F. J. Ascaso, N. Cruz, P. J. Modrego et al., "Retinal alterations in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an optical coherence tomography study," *Journal of Neurology*, vol. 261, no. 8, pp. 1522-1530, 2014.
- [55] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, "Astrocytes: biology and pathology," *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1, pp. 7-35, 2010.
- [56] W. S. T. Griffin, L. Liu, Y. Li, R. E. Mrazek, and S. W. Barger, "Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 3, article 5, 2006.
- [57] N. Cuenca, L. Fernández-Sánchez, L. Campello et al., "Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 43, pp. 17-75, 2014.
- [58] M. Karlstetter, S. Ebert, and T. Langmann, "Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models," *Immunobiology*, vol. 215, no. 9-10, pp. 685-691, 2010.
- [59] T. Langmann, "Microglia activation in retinal degeneration," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, no. 6, pp. 1345-1351, 2007.

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUKM/revistas/BUK/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&ccl=1>

<http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55494>



*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2017 11(1):170-175*

**ANÁLISIS TOPOGRÁFICO DEL POLO POSTERIOR MACULOPAPILAR EN  
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER LEVE.  
TOPOGRAPHIC ANALYSIS OF THE MACULOPAPILLARY POSTERIOR POLE  
IN PATIENTS WITH MILD AIZHEIMER'S DISEASE.**

**Salobrar-García, E., García, Y.M, Lostao, C. y Ramirez, J.M.**

Facultad de Medicina de la UCM. Madrid, España.

Correspondencia del autor: [crislost@estumail.ucm.es](mailto:crislost@estumail.ucm.es)

**RESUMEN**

Se ha llevado a cabo un estudio transversal con el objetivo de realizar un análisis topográfico del polo posterior maculopapilar de la retina, relacionando los cambios objetivados en el espesor de dicha región en un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) leve, en comparación con un grupo control. Mediante la OCT, se han determinado los espesores medios de las áreas macular y hemipapilar temporal divididas en segmentos. El análisis de los datos obtenidos muestra un adelgazamiento significativo en algunos sectores maculares y peripapilares en pacientes con EA leve, elaborándose un mapa que revela los sectores de la mácula y la papila donde se concentran dichos cambios. Este hallazgo pone en el punto de mira a aquellas regiones maculopapilares que pudieran emplearse en el futuro como posible biomarcador para el diagnóstico precoz y seguimiento de la EA.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer (EA), Polo posterior maculopapilar, Tomografía de coherencia óptica (OCT), Biomarcador.

### SUMMARY

The aim of this transversal study was to perform a topographic analysis of the macula and the temporal papillary region of the retina and to relate it with the changes seen in the macular and peripapillary retinal thickness in a group of patients with mild Alzheimer's disease (AD) compared with control. Macular and peripapillary thickness were measured by optical coherence tomography (OCT). It was found a significant macular and peripapillary thinning in some sectors in mild AD patients in comparison with control group, getting a map that revealed the earlier areas affected in AD. Therefore, this finding point to those regions in the macular and papillary region of the retina that could be useful as early biomarker for follow-up in AD.

**Key words:** Alzheimer's Disease, Maculopapillary posterior pole, Optical Coherence Tomography, Biomarker.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con un deterioro cognitivo crónico y progresivo, caracterizada por el depósito de  $\beta$ -amiloide y la presencia de ovillos neurofibrilares (Hardy y Selkoe, 2002). Las células ganglionares de la retina son consideradas prolongaciones del sistema nervioso central (SNC), pudiendo albergar en ellas los mismos procesos degenerativos. Gracias al avance de las técnicas oftalmológicas como la OCT, el ojo es a día de hoy una ventana hacia el SNC, estando en el punto de mira de numerosos estudios con el fin de convertirlo en una herramienta clave para el diagnóstico precoz de procesos neurodegenerativos.

En el presente estudio se pretende llevar a cabo un análisis topográfico del polo posterior maculopapilar, relacionando los cambios objetivados en el espesor de la retina a nivel de la mácula y la papila en un grupo de pacientes con EA leve frente a otro grupo control.

### MATERIAL Y MÉTODOS

*Material.* A partir de la base de datos de la Unidad de Memoria del Hospital Clínico San Carlos en Madrid, fueron seleccionados 84 pacientes que presentaban EA leve según los criterios de la *CDR, NINCDS-ADRDA IV*. Se excluyó a aquellos pacientes diagnosticados de una enfermedad psiquiátrica, oftalmológica o de una enfermedad sistémica que pueda afectar

a la visión, así como aquellos individuos que en el examen oftalmológico presentaran una opacificación que impidiera la adecuada realización de dicho examen o una patología del polo posterior. Quedaron incluidos 19 pacientes con EA leve y 25 sujetos control con una puntuación normal en el Mini-Mental. Se obtuvo la aprobación del comité ético local.

*Métodos.* Se realizó un examen oftalmológico del ojo derecho de cada sujeto. Los participantes cumplieron los siguientes criterios: no presentar enfermedad ocular, AREDS < 2 y ausencia de drusas retinianas así como de enfermedad sistémica que pueda afectar a la visión; tener una AV corregida mejor de 20/40; un error de refracción menor de  $\pm 5$ ; y una presión intraocular menor de 20 mmHg.

El espesor de la papila y de la mácula fue medido mediante la OCT, de forma que el área macular fue dividida en una rejilla de 6x6 cuadrados de 1x1 mm cada uno, mientras que la papila fue delimitada mediante un área circular de 3.4 mm de diámetro dividida en 12 sectores (figura 1).

*Análisis estadístico.* Se realizaron pruebas bilaterales y nivel de confianza de 95%, incorporando la corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples en ANOVA y patrón de correlaciones. Las diferencias de espesor macular entre el grupo de pacientes y el grupo control fueron analizadas mediante un ANOVA de dos factores (“tipo” con 2 niveles y “sector” con 36 niveles), con grupos independientes en el primero y medidas repetidas en el segundo. La asociación entre el espesor macular y papilar en el grupo de pacientes y en el de controles fue evaluada con el coeficiente de correlación de Pearson. El patrón de correlaciones obtenido en el grupo de los pacientes fue comparado con el obtenido en el grupo control utilizando la transformación Z de Fisher.

## RESULTADOS

*Espesor macular.* El ANOVA reveló que abundan las diferencias significativas de espesor entre las regiones de la rejilla de 6x6 en la que fue dividida el área macular; y que el espesor de los sectores 5, 6, 12, 15, 16, 18, 21 y 22 presentan una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el grupo de pacientes con respecto al grupo control.-

*Correlación maculopapilar del grupo de pacientes.* Se halló una correlación de Pearson directa y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de las áreas 1, 6, 7, 13, 18, 24, 30, 35 y 36 de

la mácula con los sectores 9, 11 y 12 de la papila y una correlación inversa de las áreas 1, 18, 24, 30 y 36 de la mácula con el segmento 6 de la papila.

*Correlación maculopapilar del grupo control.* Se halló una correlación de Pearson directa y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de las áreas 5, 6, 11, 12, 18, 24, 25, 30, 31 de la mácula con los sectores 8, 9, 11, 12 de la papila.

*Comparación del patrón de correlaciones de ambos grupos.* Se hallaron diferencias significativas en el patrón de correlaciones entre el grupo de pacientes y el grupo control (transformación Z de Fisher;  $p < 0,05$ ), obteniéndose un mapa de las áreas afectadas (Figura 1)

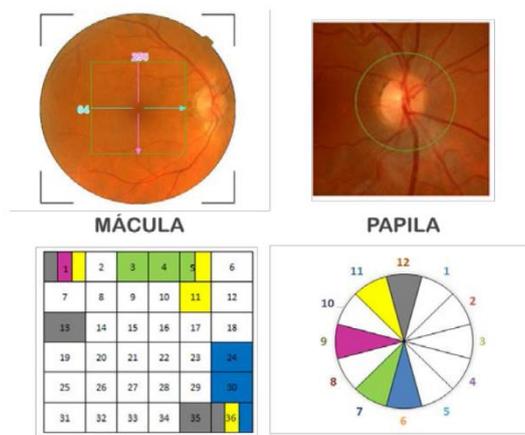


Figura 1. Superior: Retinografías de la mácula (izquierda) y papila (derecha). Inferior: Correlaciones maculo-papilares que presentan un cambio estadísticamente significativo entre el grupo de pacientes con EA leve y el grupo control.

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios previos han puesto en evidencia la disminución que experimenta el espesor de la retina en distintas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson (R. Inzelberga et al., 2004), el glaucoma (Mona et al., 2012) y la EA (Guo et al., 2010). Respecto a la EA, hay que destacar que a día de hoy no disponemos de biomarcadores que sirvan como herramienta en el diagnóstico precoz de la enfermedad y, por tanto, la necesidad de la investigación en este campo. Estudios publicados objetivaron alteraciones que

afectan a toda la papila, mientras que otros observaron alteraciones limitadas a los sectores superiores e inferiores de la misma. Los cambios descritos no consisten siempre en un adelgazamiento de la retina, sino que en determinadas regiones se ha descrito un engrosamiento de la misma atribuido a cambios inflamatorios y fenómenos de astrogliosis que preceden a la neurodegeneración. Las diferencias encontradas entre dichos estudios podrían deberse a los distintos estadios de la enfermedad analizados en cada uno de ellos.

Un estudio llevado a cabo por este mismo grupo, analizó pacientes con EA en estadio leve, en los cuales el espesor del área papilar no se vio disminuido, estando adelgazadas únicamente determinadas áreas de la mácula. Por tanto, se describe la mácula como la región de la retina que se afecta con mayor precocidad en la EA (Salobar-García et al., 2015). El presente estudio analizó de la misma forma pacientes con EA en estadio leve, con el objetivo de especificar las alteraciones del polo posterior maculopapilar con las que debuta la enfermedad. Se objetivaron cambios significativos que afectan al patrón de correlaciones entre los espesores macular y papilar de los enfermos con respecto al grupo control. De esta forma, se pudo elaborar un mapa del polo posterior maculopapilar donde se ponen de manifiesto aquellas regiones en las que se evidencian cambios con mayor antelación.

## CONCLUSIÓN

El estudio analizó y comparó los espesores maculares y papilares de un grupo de pacientes con EA leve y un grupo control, hallándose cambios significativos en el patrón de correlaciones en los espesores macular y papilar entre ambos. Estos cambios se atribuyen a la inflamación y neurodegeneración ocurrida en las primeras fases de la EA, y abren las puertas a nuevas investigaciones pudiendo llegar a establecerse como biomarcadores precoces de EA.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio no habría sido posible sin la colaboración del Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Gracias a José Manuel Ramírez, Elena Salobar García, Luis Jañez y a todos los miembros del equipo por su ayuda y apoyo constante.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Guo, L. et al. 2010. Alzheimer's Disease and Retinal Neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, Volume 7, Number 1, pp. 3-14.
- Hardy, J y Selkoe, D.J. 2002. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, Volume 297, Issue 5580, pp. 353-356.
- Mona, K. et al. 2012. 2-D pattern of nerve fiber bundles in glaucoma emerging from spectral-domain optical coherence tomography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, Volume 53, pp. 483-489.
- R. Inzelberga, J. R et al. 2004. Retinal nerve fiber layer thinning in Parkinson disease. *Elsevier*, Volume 44, Issue 24, Pages 2793-2797.
- Salobarra-García, E. et al. 2015. Analysis of Retinal Peripapillary Segmentation in Early Alzheimer's Disease Patients. *Hindawi Publishing Corporation*, Volume 2015, Article ID 636548, 8 pages.

## Chapter 15

## The Impact of the Eye in Dementia: The Eye and its Role in Diagnosis and Follow-up

Elena Salobrar-García, Ana I. Ramírez, Rosa de Hoz, Pilar Rojas, Juan J. Salazar, Blanca Rojas, Raquel Yubero, Pedro Gil, Alberto Triviño and José M. Ramírez

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/64490>

### Abstract

Over the last few decades, the importance of ophthalmic examination in neurodegenerative diseases of the CNS has reportedly increased. The retina is an extension of the CNS and thus should not be surprising to find abnormal results in both the test exploring visual processing and those examining the retina of patients with CNS degeneration. Current in vivo imaging techniques are allowing ophthalmologists to detect and quantify data consistent with the histopathological findings described in the retinas of Alzheimer's disease (AD) patients and may help to reveal unsuspected retinal and optic-nerve repercussions of other CNS diseases. In this chapter, we perform an analysis of the physiological changes in ocular and cerebral ageing. We analyse the ocular manifestations in CNS disorders such as stroke, AD and Parkinson's disease. In addition, the pathophysiology of both the eye and the visual pathway in AD are described. The value of the visual psychophysical tests in AD diagnosis is reviewed as well as the main findings of the optical coherence tomography as a contribution to the diagnosis and monitoring of the disease. Finally, we examine the association of two neurodegenerative diseases, AD and glaucoma, as mere coincidence or possible role in the progression of the neurodegeneration.

**Keywords:** neurodegenerative disease, Alzheimer, optical coherence tomography, contrast sensitivity test

- [316] Liu D, Zhang L, Li Z, Zhang X, Wu Y, Yang H, et al. Thinner changes of the retinal nerve fiber layer in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *BMC Neurology*. 2015; 15: 14.
- [317] Cheung CY, Ong YT, Hilal S, Ikram MK, Low S, Ong YL, et al. Retinal ganglion cell analysis using high-definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015; 45: 45–56.
- [318] Vickers J. The cellular mechanism underlying neuronal degeneration in glaucoma parallels with Alzheimer's disease. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*. 1997; 25: 105–109.
- [319] McKinnon SJ. Glaucoma: ocular Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience*. 2003; 8: s1140–s1156.
- [320] Guo L, Duggan J, Cordeiro M. Alzheimers disease and retinal neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*. 2010; 7: 3–14.
- [321] Bayer A, Ferrari F, Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease. *European Neurology*. 2002; 47: 165–168.
- [322] Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, Kato T, Yokoyama T, Sasaki K, et al. High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006; 246: 79–83.
- [323] Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Survey of Ophthalmology*. 2003; 48: S38–S46.
- [324] Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmologica*. 2009; 87: 450–454.
- [325] Bach-Holm D, Kessing SV, Mogensen U, Forman JL, Andersen PK, Kessing LV. Normal tension glaucoma and Alzheimer disease: comorbidity? *Acta Ophthalmologica*. 2012; 90: 683–685.



# The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma

Ana I. Ramirez<sup>1,2</sup>, Rosa de Hoz<sup>1,2</sup>, Elena Salobrar-García<sup>1,3</sup>, Juan J. Salazar<sup>1,2</sup>, Blanca Rojas<sup>1,3</sup>, Daniel Ajoy<sup>1</sup>, Inés López-Cuenca<sup>1</sup>, Pilar Rojas<sup>1,4</sup>, Alberto Triviño<sup>1,3</sup> and José M. Ramírez<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Departamento de Oftalmología y OPL, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain, <sup>3</sup>Departamento de Oftalmología y OPL, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain, <sup>4</sup>Servicio de Oftalmología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Microglia, the immunocompetent cells of the central nervous system (CNS), act as neuropathology sensors and are neuroprotective under physiological conditions. Microglia react to injury and degeneration with immune-phenotypic and morphological changes, proliferation, migration, and inflammatory cytokine production. An uncontrolled microglial response secondary to sustained CNS damage can put neuronal survival at risk due to excessive inflammation. A neuroinflammatory response is considered among the etiological factors of the major aged-related neurodegenerative diseases of the CNS, and microglial cells are key players in these neurodegenerative lesions. The retina is an extension of the brain and therefore the inflammatory response in the brain can occur in the retina. The brain and retina are affected in several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and glaucoma. AD is an age-related neurodegeneration of the CNS characterized by neuronal and synaptic loss in the cerebral cortex, resulting in cognitive deficit and dementia. The extracellular deposits of beta-amyloid (A $\beta$ ) and intraneuronal accumulations of hyperphosphorylated tau protein (pTau) are the hallmarks of this disease. These deposits are also found in the retina and optic nerve. PD is a neurodegenerative locomotor disorder with the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. This is accompanied by Lewy body inclusion composed of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) aggregates. PD also involves retinal dopaminergic cell degeneration. Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disease of the optic nerve, characterized by retinal ganglion cell loss. In this pathology, deposition of A $\beta$ , synuclein, and pTau has also been detected in retina. These neurodegenerative diseases share a common pathogenic mechanism, the neuroinflammation, in which microglia play an important role. Microglial activation has been reported in AD, PD, and glaucoma in relation to protein aggregates and degenerated neurons. The activated microglia can release pro-inflammatory cytokines

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Isidre Ferrer,  
University of Barcelona, Spain

### Reviewed by:

Nicolás Cuenca,  
University of Alicante, Spain  
M. Francesca Cordeiro,  
University College London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

José M. Ramírez  
ramirezj@med.ucm.es

Received: 06 April 2017

Accepted: 16 June 2017

Published: 06 July 2017

### Citation:

Ramírez AI, de Hoz R,  
Salobrar-García E, Salazar JJ,  
Rojas B, Ajoy D, López-Cuenca I,  
Rojas P, Triviño A and Ramírez JM  
(2017) The Role of Microglia in Retinal  
Neurodegeneration: Alzheimer's  
Disease, Parkinson, and Glaucoma.  
*Front. Aging Neurosci.* 9:214.  
doi: 10.3389/fnagi.2017.00214

- Yuan, L., and Neufeld, A. H. (2001). Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J. Neurosci. Res.* 64, 523–532. doi: 10.1002/jnr.1104
- Yucel, Y. H., Zhang, Q., Weinreb, R. N., Kaufman, P. L., and Gupta, N. (2003). Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 465–481. doi: 10.1016/S1350-9462(03)00026-0
- Yuruker, V., Naziroglu, M., and Senol, N. (2015). Reduction in traumatic brain injury-induced oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in rat hippocampus by melatonin: possible involvement of TRPM2 channels. *Metab. Brain Dis.* 30, 223–231. doi: 10.1007/s11011-014-9623-3
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claassen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknacht, C., et al. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 116, 47–55. doi: 10.1007/s00401-008-0361-7
- Zhang, Q. S., Heng, Y., Yuan, Y. H., and Chen, N. H. (2017). Pathological alpha-synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicol Lett.* 265, 30–37. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.11.002
- Zhang, S., Wang, X.-J., Tian, L.-P., Pan, J., Lu, G.-Q., Zhang, Y.-J., et al. (2011). CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.* 8:154. doi: 10.1186/1742-2094-8-154
- Zhou, X., He, X., and Ren, Y. (2014). Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* 9, 1787–1795. doi: 10.4103/1673-5374.143423

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ramirez, de Hoz, Salóbrar-García, Salazar, Rojas, Ajoy, López-Cuenca, Rojas, Triviño and Ramirez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Model  
OPTOM-276; No. of Pages 10

ARTICLE IN PRESS

Journal of Optometry (2018) xxx, xxx–xxx



Journal  
of  
**Optometry**

[www.journalofoptometry.org](http://www.journalofoptometry.org)



REVIEW

## Retinal glial changes in Alzheimer's disease – A review

José A. Fernández-Albarral<sup>a,1</sup>, Elena Salobar-García<sup>a,1</sup>, Rebeca Martínez-Páramo<sup>a</sup>,  
Ana I. Ramírez<sup>a,b</sup>, Rosa de Hoz<sup>a,b</sup>, José M. Ramírez<sup>a,c,\*</sup>, Juan J. Salazar<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Óptica y Optometría, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Received 5 March 2018; accepted 13 July 2018

### KEYWORDS

Alzheimer's disease;  
Glial cells;  
Retina

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative dementia characterized by the deposition of extracellular  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) plaques and the presence of neurofibrillary tangles. Until now, the techniques used to analyze these deposits have been difficult to access, invasive, and expensive. This leads us to consider new access routes to the central nervous system (CNS), allowing us to diagnose the disease before the first symptoms appear. Recent studies have shown that microglial and macroglial cell activation could play a role in the development of this disease. Glial cells in the CNS can respond to various damages, such as neurodegenerative pathologies, with morphological and functional changes. These changes are a common feature in neurodegenerative diseases, including AD. The retina is considered an extension of the CNS and has a population of glial cells similar to that of the CNS. When glial cells are activated, various molecules are released and changes in glial cell expression occur, which can be indicators of neuronal damage. The objective of this review is to compile the most relevant findings in the last 10 years relating to alterations in the eye in AD, and the role that glial cells play in the degenerative process in the retina in the context of neurodegeneration.

© 2018 Spanish General Council of Optometry. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding authors at: Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Facultad de Medicina, Pab 6, 4<sup>a</sup> planta, Ciudad Universitaria (UCM), 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: [ramirez@med.ucm.es](mailto:ramirez@med.ucm.es) (J.M. Ramírez), [jjsalazar@med.ucm.es](mailto:jjsalazar@med.ucm.es) (J.J. Salazar).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.optom.2018.07.001>

1888-4296/© 2018 Spanish General Council of Optometry. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Fernández-Albarral JA, et al. Retinal glial changes in Alzheimer's disease – A review. *J Optom.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.optom.2018.07.001>

**PALABRAS CLAVE**

Enfermedad de Alzheimer;  
Células gliales;  
Retina

**Cambios de las células gliales de la retina en la enfermedad de Alzheimer – Revisión bibliográfica**

**Resumen** La enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia neurodegenerativa que se caracteriza por la deposición de placas beta-amiloides ( $\beta$ A) extracelulares, y la presencia de ovillos neurofibrilares. Hasta ahora, las técnicas utilizadas para analizar estos depósitos han sido poco accesibles, invasivas y costosas. Esto nos lleva a considerar nuevas vías de acceso al sistema nervioso central (SNC) que nos permitan diagnosticar la enfermedad antes de la aparición de sus primeros síntomas. Los estudios recientes han reflejado que la activación de las células microgliales y macrogliales podría desempeñar un papel en el desarrollo de esta enfermedad. Las células gliales del SNC pueden responder a diversos daños, tales como patologías neurodegenerativas, con cambios morfológicos y funcionales. Dichos cambios son una característica común en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. La retina se considera una extensión del SNC, y cuenta con una población de células gliales similar a la de dicho sistema. Cuando las células gliales se activan, se liberan diversas moléculas, y se producen diversos cambios en la expresión de las células gliales, que pueden ser indicadores de daño neuronal. El objetivo de esta revisión es recopilar los hallazgos más relevantes de los últimos diez años, con relación a las alteraciones oculares en la EA, y el papel que juegan las células gliales en el proceso degenerativo de la retina en el contexto de la neurodegeneración.

© 2018 Spanish General Council of Optometry. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introduction**

Alzheimer's disease (AD) is a disabling and progressive neurodegenerative disease with no cure that leads to cognitive impairment and memory loss, affecting millions of people around the world.<sup>1</sup> Because the retina is considered an extension of the central nervous system (CNS), it seems clear that the use of new, non-invasive retinal analysis techniques could allow for the evaluation of retinal glial cell activation, and establish this as a new tool for AD diagnosis. This review gives a brief description of AD and its manifestations in the eye, as well as a description of glial cells and their changes in this disease.

**Material and methods**

A literature search was performed up to September 2017 using the MEDLINE database, PubMed, and Google Scholar search services with the following key words and word combinations: Alzheimer, glia, glia-retina, Alzheimer-glia, Alzheimer-astrocytes, Alzheimer-microglia, Alzheimer-eye, Alzheimer-retina, Alzheimer-glia-eye, Alzheimer-glia-retina, and Alzheimer-Müller cells. After filtering by author criteria (articles published in the last 10 years), English or Spanish language, and the condition that all address the relationship between AD and retinal glial cells as the main subject, 250 articles were considered.

**Alzheimer's disease**

AD is a progressive neurodegenerative disease characterized by a decline in cognitive function and memory resulting from synapse and cell loss, accompanied by a strong

neuroinflammatory response. It accounts for 60–80% of dementia cases, and is the leading cause of these in the population over 60 years old.<sup>2</sup>

AD may be familial or sporadic in origin. The incidence of familial cases is low (5–10%), and is related to mutations in three different genes: amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN-1) and presenilin 2 (PSEN-2). Sporadic AD accounts for 90–95% of all cases, and has a multifactorial pathogenesis consisting of a combination of genetic and environmental factors, in which age is the leading risk factor.<sup>3</sup> The main gene associated with the sporadic manifestation of the disease is the apolipoprotein E gene (APOE). Of the three isoforms, APOE  $\epsilon$ 4 is found in 50% of patients affected by AD and carries a three-fold risk of developing the disease. In the CNS, APOE is expressed predominantly by astrocytes but also by microglia.<sup>4,5</sup>

Pathologically, AD is characterized by deposits of extracellular plaques of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptide or senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) resulting from intracellular aggregates of hyperphosphorylated tau protein.<sup>6</sup> Deposition of  $A\beta$  plaques, the first manifestation of the pathogenesis of AD, begins many years before symptoms appear. Although tau protein aggregation occurs after the appearance of the senile plaques, it is evident before the clinical onset of the disease. These characteristic changes are well-reflected in the cerebrospinal fluid (CSF), which demonstrates altered levels of tau protein and phosphorylated tau, as well as  $A\beta$  levels at the onset of the disease pathogenesis. The changes in these biomarkers can be seen even in the preclinical stages of the disease, and can be useful to determine which patients will develop AD over time.<sup>7</sup> A clinical diagnosis of AD can only be definitively confirmed by a post-mortem examination of the brain. A diagnosis of probable AD is possible only when the disease

has considerably progressed, and neurological damage has already occurred.<sup>8</sup>

### Glial cells

Glia are a highly homogeneous population of non-excitabile cells distributed throughout the CNS, and are essential for normal brain function.<sup>9</sup> The main function of the glia is to maintain the homeostasis of the nervous tissue and to control, protect, and support neuronal function. They also respond to CNS injuries as a defense mechanism, and when dysfunctional, they can even be primary pathogenic agents.<sup>10</sup> In the CNS, astrocytes and oligodendrocytes are neuroectodermic in origin, and make up the macroglia. Microglia originate from the mesoderm, and are considered the macrophagous element of the CNS.<sup>9</sup>

### Astrocytes

The main population of glial cells consists of astrocytes. They account for about one in three cells of the brain mass. They are essential for correct homeostasis in the brain tissue and for neuronal function, and create a barrier around blood vessels that limits the passage of immune cells to the CNS. Astrocytes are resistant to cell death by apoptosis, and are therefore able to survive attacks from inflammatory processes.

The main functions of astrocytes include metabolic support of the neurons and their dendrites and synapses, glycogen storage and lactate export, neurotransmitter uptake, including glutamate, protection against reactive oxygen species (ROS), provision of neurotrophic factors to neurons and oligodendrocytes following injury such as nerve growth factor (NGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) among others, homeostasis, blood-brain barrier (BBB) induction and maintenance, scar formation and tissue repair, and regulation of immune response in the CNS.<sup>11</sup>

The astrocyte processes extending radially out from the cell body give it a stellate appearance. The cytoplasm of these cells contains a large number of intermediate filaments composed of glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is specific to astrocytes and reactive Müller cells and allows them to be selectively labeled via immunocytochemical techniques.<sup>12</sup>

Astroglia play a central role in responding to all forms of pathological conditions such as trauma, ischemia, and neurodegenerative diseases. It has been suggested that reactive astroglia (astrogliosis) either release neurotrophic factors to support cell survival or produce molecules that inhibit axonal repair and regeneration, triggering neurological cytotoxicity, which causes secondary damage in nearby neurons.<sup>13</sup> A better understanding of glial reactions to lesions and their contribution to the development of the disease can assist in designing new treatment strategies.<sup>14</sup>

### Oligodendrocytes

Oligodendrocytes make up about 5–10% of the total glial cell population. They are essential for the rapid and efficient

conduction of electrical impulses along the axons, as well as for preserving axonal integrity.<sup>15</sup> Oligodendrocytes have a very limited capacity for regeneration; the injury of just a few can create an appreciable area of demyelination. They are the first nervous elements that degenerate in diseases of the CNS where myelin is affected.<sup>16</sup> In the retinas of most vertebrates, the axons are unmyelinated. Oligodendrocytes, which are responsible for axonal myelination in the CNS, are therefore absent in the retina.<sup>17</sup>

### Microglia

Microglia are the cells that make up the CNS immune system, and are found in all regions of the CNS, including the retina.<sup>18</sup> They represent 5–10% of all adult human brain cells.<sup>4</sup> Their functions include surveillance of the surrounding environment, elimination of invading microbes, clearance of cellular debris, and enforcement of programmed cell death via the removal of apoptotic cells. They also release brain derived neurotrophic factor (BDNF) and anti-inflammatory cytokines involved in neuronal survival. Therefore, in addition to their role as immune defense cells, they are vital for the endogenous repair of nerve pathways. Along with their anti-inflammatory and neuroprotective effects, they play a critical role in the normal development of angiogenesis.

Microglia are a dynamic cellular population and exist in various states of activation associated with distinct morphological transformations.<sup>19</sup> In the absence of damage or pathologies, they present in their baseline or resting state.<sup>20</sup> Each of these cells occupies one area and has no physical contact with the others.<sup>21</sup> Even in the baseline state, they continuously monitor their surrounding environment.

Synaptic formation is regulated by the microglia, and seems to depend on the production and release of molecular mediators such as BDNF or interleukin-10 (IL-10), among others.<sup>22</sup> The ability of microglia to enhance the release of BDNF in the context of aggression accelerates healing and constitutes a damage reduction mechanism. It seems that cytokines considered classically injurious, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , facilitate the phagocytosis of cellular debris and trigger many other events necessary for neural repair.<sup>19</sup>

Since adenosine is an important neuromodulator of the immune-inflammatory system, microglia express all subtypes of adenosine receptors A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>. In the case of A<sub>2A</sub>R, this protects neurons from primal proinflammatory neurodegeneration, however other brain injuries that trigger neuroinflammation cause upregulation of this chemical in the microglial cells, where it appears to play an important role in the pathophysiology of degeneration.<sup>22</sup>

Microglia express both class I and class II major histocompatibility complex molecules (MHC). In the presence of certain cytokines these increase, allowing the microglia to act as antigen-presenting cells and to become an integral part of the immune network.<sup>19</sup>

### Glial response

In situations such as neural damage, disease, or even aging, the glia can respond by undergoing morphological and functional changes accompanied by the production of

proinflammatory cytokines.<sup>23</sup> This general glial response to aggression or inflammation in the adult brain is called reactive gliosis.<sup>24</sup> Reactive gliosis has a neuroprotective effect, however chronic gliosis exacerbates disease progression by increasing vascular permeability, infiltration of toxic compounds, and even through neovascularization.<sup>25</sup> Oligodendrocytes do not usually demonstrate reactive changes; astrocytes and microglia are the main populations of reactive glia.<sup>23</sup>

Microglia exist in a symbiotic relationship with neurons, where microglia sustain the neurons and neurons maintain the microglia in a noninflammatory phenotype.<sup>19</sup> Because of their ability to activate rapidly upon aggression,<sup>24</sup> the microglia normally initiate and direct the coordinated neuroinflammatory response.

Activated microglia change from a ramified form to a non-phagocytic hyper-ramified or hypertrophic phenotype, and finally to an amoeboid morphology (especially if there is degeneration of terminals and/or neurons), retracting their extensions. This allows migration through the parenchyma to the site of the injury.<sup>21</sup> There are two activated polarization states.<sup>19</sup> Under stress conditions, microglia release anti-inflammatory cytokines and growth factors, transition to the M2 phenotype induced by IL-4 and IL-13 and express mannose receptor CD206 and arginase 1, which downregulate inflammation and promote tissue remodeling/repair and angiogenesis.<sup>4</sup> When overactivated, they transition to the M1 phenotype, characterized by the production of nitric oxide (NO), superoxide radicals, proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and chemokines, in order to amplify the inflammatory response and eliminate the agent causing the aggression,<sup>21</sup> thereby playing a central role in the defense against pathogens and tumor cells.<sup>19</sup> The M1 phenotype alters the permeability of the BBB, allowing the entry of immune mediators, natural killer cells (NK) and lymphocytes. This immune response promotes both tissue repair and neuronal damage.<sup>21</sup> The attack on native neuronal cells can have serious consequences if the process deregulates<sup>19</sup> and becomes chronic, where the M1 phenotype becomes phagocytic and harmful, as occurs in neurological diseases, including AD.<sup>4</sup> Additionally, deregulated, active microglia may contribute to pathological neovascularization in the brain and retina. The precise mechanisms of this process are not yet fully understood.<sup>19</sup>

Reactive astrogliosis is an astrocyte response to polyetiological insults to the CNS, characterized by a jump in astrocyte numbers (hyperplasia/proliferation), increases in the number and length of astroglial processes, larger cell body size (hypertrophy), migration, and upregulation of cytoskeletal components such as GFAP, vimentin, and nestin.<sup>25</sup> Thus, an astrocyte phenotype change results in the expression of non-detectable molecules in resting astroglia,<sup>21</sup> such as the enzyme heme oxygenase 1 (HO-1),<sup>26</sup> and a reduction in the synthesis of glutamine synthetase (GS). The cerebral astrocytes of AD patients have demonstrated increased GFAP expression.<sup>26</sup> Reactive astrocytes produce NO as an autocrine apoptosis mediator<sup>21</sup> and can secrete inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, inflammatory chemokines, and other chemokines involved in recruiting microglia, monocytes/macrophages, T lymphocytes and dendritic cells.<sup>25</sup> Because of this, astrocytes are

considered immunocompetent cells. Astrogliosis may favor either neuronal survival or the formation of a glial scar that prevents the regenerative process.<sup>21</sup> Reactive astroglia have been associated with the stimulation of higher metabolic activity, upregulation of cytoprotective factors and antioxidant defenses that protect neurons from free radicals, restoration of the neurotransmitter balance, and regulation of ion and water concentrations. When the CNS is injured, reactive astrocytes migrate to the damaged site, isolate the injured area, and remove pathogens, dead cells, and cellular debris, and then remodel the nerve tissue. Chronic astrogliosis, however, is typically detrimental, directly or indirectly damaging neurons and the vasculature while also inhibiting tissue repair. Through the production of vascular endothelial growth factor (VEGF), astrogliosis exacerbates disease progression by increasing vascular permeability, affecting the properties of the BBB, facilitating the infiltration of peripheral immune cells, and even by facilitating neovascularization. Astroglia also produce molecules that inhibit axonal repair and regeneration, triggering neurotoxicity and secondary damage in nearby neurons and glial cells. When dysfunctional, astroglia can also constitute the primary pathogenic element.<sup>25</sup>

Neuroinflammation essentially depends on the activation of microglia and astrocytes, which respond to various injuries and stimulations through the expression and release of molecules that subsequently cause oxidative stress. Cytotoxic activation and inflammatory factors stimulate glial cells to release proinflammatory signals, creating a vicious cycle of neuroinflammation and oxidative stress, resulting in an autoinflammatory condition. In this situation, proinflammatory cytokines secreted by active microglia inhibit astrocytic gap junction communication, and the astrocytic neuronal support function is affected. This has been observed in AD and could explain the cell death, although it may also play a defensive role, preventing the diffusion of toxic molecules. The microglia also release the neurotransmitter glutamate, which triggers excitotoxic neurodegeneration and cell death in astrocytes and oligodendrocytes.<sup>4</sup> Astrocytic glutamate uptake leads to neuronal loss. Elevated levels of TNF- $\alpha$  have been shown to stimulate BDNF secretion, supporting neuronal survival.<sup>25</sup> Pathogens themselves are able to recruit proinflammatory microglia and perpetuate the pathology.<sup>19</sup> The accumulation of active microglia and reactive astrocytes is a common feature in neurodegenerative diseases, including AD.<sup>21</sup>

### Neurodegeneration, glial response and Alzheimer's

It has been shown that both microglia and astrocytes, not neurons, are the main source of N-terminally truncated A $\beta$  peptides that can be found in amyloid deposits.<sup>2</sup> A $\beta$  plaques stimulate the factors and proteins that induce the production of inflammatory cytokines and chemokines. Deregulated proinflammatory cytokines and chemokines have been found in AD. Certain forms of inflammation and microglial activation are beneficial in pathologies such as AD.<sup>4</sup> It is not known whether glial activation is the cause or a consequence of AD, but it certainly contributes to its development.

A $\beta$  oligomers induce a potent inflammatory response and distort the phagocytic microglial response, leading to the excessive and sustained production of inflammatory mediators that could explain neurotoxicity and neuronal loss. Astrogliosis is also involved in the neural degeneration associated with AD.<sup>2</sup> Dysfunction in the astrocytic regulation of microglial phagocytosis has been observed in AD.<sup>4</sup>

One way in which A $\beta$  accumulation may lead to neurodegeneration is through oxidative stress whereby molecules, such as deoxyribonucleic acid (DNA) and proteins, are damaged due to excessive oxidation resulting from an imbalance between oxidant and antioxidant activity. This imbalance may be due to the oxidizing properties of the A $\beta$  peptide, which is thought to produce hydrogen peroxide and induces ROS accumulation. It appears that astrocytes are able to release NO, which is an ROS, in an attempt to counteract the reduced cerebral blood flow in AD. Such a release could be counterproductive if NO levels become toxic. In degenerative disorders, oxidative stress initiates apoptosis in healthy cells. In response to this apoptosis, the complement system can be activated to remove debris derived from cell death which, under normal circumstances, is deactivated upon completion of the process. However, it has been observed that in AD, this deactivation process can be abandoned when the complement system response is exacerbated, which also leads to cell death. When microglia detect that the complement system has been activated, they become active as well, and have been associated with the pathogenesis of AD, age-related macular degeneration (AMD), and glaucoma.<sup>27</sup> *In vivo* and *in vitro* studies suggest that microglia recruited to A $\beta$  plaques sites are able to surround and phagocytize A $\beta$  peptides. The A $\beta$  deposits are responsible for microglial activation in a way that is strictly dependent on the amyloid load.<sup>4</sup> In turn, microglia can produce complementary factors and thus reinforce the activation of the complement system response by creating a vicious cycle.<sup>27</sup>

Microglial activation and the production of proinflammatory mediators by neurons positive for phosphorylated tau can contribute to neuronal death and disease progression in neurodegenerative tauopathies such as AD. Although plaques and tangles remain the major hallmarks of AD, studies show that activated microglia are one of the major players in neuroinflammation, along with plaque deposition and astrocyte stimulation.<sup>4</sup>

## AD and the eye

The increasing prevalence of AD, combined with the need to treat the disease in its early stages before irreversible neurological damage occurs, prompts us to search for accessible *in vivo* brain structures that allow for early diagnosis of the disease.<sup>8</sup>

The retina and optic nerve share an embryologic origin with the brain, and have similar patterns of vascularization, self-regulating blood flow, and blood–tissue barrier functions. As part of the CNS, the retina has a specific immune privilege provided by the BBB. The blood–retinal barrier (BRB) is similar in structure to the components and mechanisms of the BBB.<sup>2</sup>

Because of these similarities, the retina can be inspected to detect AD markers such as A $\beta$  deposition. The retina has

**Table 1** Retinal changes in Alzheimer's disease.

Reduction in the number of retinal ganglion cells (RGC)	6,28,32,41–43
Decreased thickness in the retinal nerve fiber layer (RNFL)	6,28,31,34–36,38,42–44
Decreased choroidal thickness in the foveal area	6,30,45–47
Vascular disorders	39,48–50
Visual field reduction (VF)	6,40,51,52
Accumulation of tau and A $\beta$	29,37,53,54

been shown to be an important tool for the *in vivo* visualization of changes in AD, their pathogenesis, and progression and response to AD therapies (Table 1).

Post-mortem analyses of the retinas of AD patients have revealed significant axonal degeneration in the optic nerve head and a reduced number of retinal ganglion cells (RGCs) associated with reduced thickness in the retinal nerve fiber layer (RNFL).<sup>28</sup>

Using immunohistochemical techniques, the presence of both tau and A $\beta$  has been demonstrated in the human retina. Accumulation of APP has been shown in RGCs and the RNFL. Retinal deposits of phosphorylated tau have also been reported in the retinas of AD patients.<sup>29</sup>

The use of several different non-invasive techniques makes it possible to analyze *in vivo* the retinal changes that occur with AD.

OCT allows us to determine RNFL thickness and RGC loss. Patients with AD present peripapillary decreases in RNFL thickness, with the most pronounced changes occurring in the superior quadrant of the retina,<sup>31</sup> as well as a decreased number of RGCs in the temporal foveal region,<sup>32</sup> which is most pronounced in the foveal and parafoveal region.<sup>33</sup> Using OCT, several patterns of RNFL thinning are evident in Alzheimer's patients, including retinal nerve fiber loss in the superior retina,<sup>34</sup> superior and nasal retina,<sup>35</sup> and the superior and inferior retina.<sup>36</sup> It has been postulated that RNFL deficiencies may be the earliest sign of AD, even before damage to the hippocampus region occurs, resulting in memory changes.<sup>30</sup> A statistically significant generalized loss of foveal choroid thickness in patients with mild and moderate AD has been found using optical coherence tomography (OCT).<sup>30</sup>

Recent studies suggest that fundus auto-fluorescence (FAF), a method for detecting highly fluorescent structures, may be used in conjunction with OCT to analyze structures of interest, leading to a possible visualization of perimacular and perivascular A $\beta$  deposits, primarily in the outer plexiform layer, the ganglion cell layer (GCL) and the RNFL of AD patients.<sup>37</sup>

Confocal scanning laser ophthalmoscopy has revealed changes at the optic nerve head in AD patients in comparison to age-matched controls, demonstrating a significant decrease in RNFL thickness in AD patients compared with controls, as well as larger cup-to-disc ratios.<sup>38</sup>

Using retinography, vascular alterations have been identified in patients with AD. The retinal vessels of AD patients show vascular attenuation, arterial and venous caliber decreases, and decreased venous flow.<sup>39</sup>

The visual field (VF) reduction shown in AD patients, occurring predominantly in the lower field, is directly related to RNFL thinning found in the superior quadrant.<sup>40</sup>

### Glia and the eye

The retina, although developmentally part of the brain, is a unique CNS structure in many aspects. The glial cells of the retina are one example of this. In the retina, the principal glial cells are the Müller cells,<sup>17</sup> which together with the astrocytes constitute the macroglia of the human retina. In addition to macroglial cells, the retina contains microglial cells, the resident immune cells of the retina.<sup>55</sup> The microglia are blood-derived phagocytic cells.<sup>56</sup>

The retinal microglia are mainly located in the plexiform layers, the GCL, and the RNFL, and possess highly mobile extensions that interact with the surrounding environment.<sup>57</sup> Microglial cells are essential for normal retinal growth, neurogenesis,<sup>58</sup> and proper formation of retinal blood vessels.<sup>59</sup> They interact with Müller cells to form a network that serves as a control system for trophic factor in retinal degeneration.<sup>2</sup>

Microglial communication with neurons, the vascular system, and the macroglia is mediated by a diverse range of factors. These include chemokines, cytokines, nucleotides, surface proteins and adhesion molecules. The microglia may be activated by a perturbation of chemokines and/or receptor expression.<sup>56</sup> Activated microglia can proliferate and migrate to regions of retinal damage, where their morphological changes are often accompanied by changes in signaling and gene expression.<sup>60</sup> They are involved in phagocytosis, secretion of trophic factors, and active remodeling of neurons and synapses.<sup>56</sup>

Retinal microglial cells perform various tasks that are essential for the normal physiological development of the retina, and are constantly in a close relationship with neurons.<sup>25</sup> The morphology of astrocytes in the human retina changes from the star shape in the GCL to the elongated shape in the RNFL. The somas of human astrocytes can mainly be found in the layers mentioned above, but extensions of these can be found even in the inner nuclear layer.<sup>61</sup> Mouse astrocytes, however, are star-shaped and can only be found in the GCL and in the RNFL.<sup>62</sup>

Müller cells are an anatomical link between the retinal neurons and structures such as the retinal blood vessels, the vitreous body, and the subretinal space, which need to exchange various molecules.<sup>63</sup> Astrocytes and Müller cells maintain the ion and water homeostasis of the retinal tissue, including the pH,<sup>64</sup> as well as the homeostasis of neurotransmitters such as glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA).<sup>65</sup>

Macroglial cells are also involved in retinal glucose metabolism, providing retinal neurons with the necessary nutrients for oxidative metabolism, and in removing metabolic waste products. Müller cells and astrocytes have also been demonstrated to be more resistant to oxidative damage than neurons, due to their high concentrations of antioxidants that protect them against such damage.<sup>25</sup> These antioxidants, such as glutathione, which are provided

to the neurons, eliminate free radicals and reactive oxygen compounds.<sup>63</sup> Another neuroprotective mechanism is the uptake and/or detoxification of potentially harmful substances, which involves the phagocytosis of debris from dead neurons or retinal pigment epithelial cells.<sup>66</sup> Astrocytes and Müller cells are involved in regulating local blood flow in response to changes in neuronal activity. Substances such as prostaglandins (PG), NO, and arachidonic acid (AA), which regulate blood flow in the CNS, are produced by astrocytes.<sup>67</sup> Macroglial cells exercise their barrier properties in the retinal capillaries, called the BRB.<sup>25</sup>

As mentioned above, astroglial cells defend the CNS, and therefore the retina, from damage through a process called reactive gliosis. This gliosis is triggered in response to trauma, ischemic damage, neurodegeneration, or neuroinflammation.<sup>68</sup> Müller cells, due to their radial distribution, are usually one of the first types of glial cells to detect retinal damage, providing rapid response to any change in the retinal microenvironment.<sup>69</sup> Müller cell gliosis is characterized by both non-specific and therapeutic responses, upregulation of GFAP, and the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK).<sup>63</sup> GFAP upregulation is therefore used as a common marker for reactive Müller cells and as an indicator of retinal stress, retinal injury, and Müller cell activation. Practically all retinal diseases are associated with Müller cell gliosis.<sup>70</sup>

After retinal detachment, Müller cells migrate to the affected area and react by establishing a glial scar, replacing degenerated neurons and photoreceptors.<sup>71</sup> Glial scars involve the expression of inhibitory molecules on the surface of reactive glial cells, which inhibit both regular tissue repair and neurodegeneration, harming the function and structure of retinal neurons.<sup>69</sup>

Müller cell gliosis has both cytoprotective and cytotoxic effects on retinal neurons.<sup>72</sup> In the context of a threat to the retina, the so-called conservative or non-proliferative gliosis is neuroprotective, releasing neurotrophic factors and antioxidants which favor neuronal survival and limit the extent of the tissue damage.<sup>73</sup> The most severe injuries provoke another response described as massive or proliferative, in which gliosis becomes detrimental to the retinal tissue and increases neuronal death.<sup>63</sup>

A possible trigger for the transition from conservative to massive gliosis is a breakdown of the BRB, augmenting both the retinal and vitreous content of growth factors, cytokines and inflammatory factors, and allowing the infiltration of blood-derived immune cells.<sup>74</sup> The excessive and prolonged expression of VEGF after massive gliosis can lead to retinal inflammation, neovascularization and vascular lesions.<sup>75</sup> High concentrations of NO after Müller cell activation can damage neurons,<sup>76</sup> while lower levels may have a protective effect, as in the protection of neurons against glutamate excitotoxicity and decreased retinal ischemia via its vasodilator effect.<sup>77</sup>

Another important feature of gliotic Müller cells is their potent cross-communication with cells from the immune system. Molecules from inflammatory cells may activate Müller cells, and these cells may express a wide variety of inflammation related factors, such as TNF- $\alpha$ .<sup>69</sup>

**Table 2** Glial activation in Alzheimer's disease.

Human retinas	
Microglial activation increased MHC-II	78
Macroglial activation	41
Retinas of transgenic mice	
Microglial activation increased F4/80	47,80,84
Morphological changes	80,81
Increased IBA-1	39,81,84
Macroglial activation increased GFAP and S100	81,85,86
Morphological changes in astrocytes	85,87,88
Polarization	82

### Retinal glia in AD

Retinal glial cells can establish significant communication amongst themselves, which have been suggested to act as mediators of neuronal-glial interactions, acting as sensors for neurotransmission signals, and contributing to the maintenance of neuronal activity and homeostasis in the healthy CNS.<sup>2</sup>

The glia, as a population of immune cells residing in the retina and optic nerve, are able to activate and respond rapidly to any type of damage.<sup>75</sup> Changes in glial cells have been found in the retinas of AD patients (Table 2). Upregulation of MHC-II expression (a microglial reactivity marker) has been observed in the donor retinas of AD patients in comparison to those donated by normal patients. This increase occurs in the absence of lymphocytic infiltrate, suggesting that the pathogenesis of the retina in AD may be different from that observed in certain areas of the brain.<sup>78</sup>

Blanks et al.<sup>79</sup> observed an increase in the proportion of astrocytes and their immunoreactivity, especially in RGCs, as well as in the radial processes of Müller cells in the retinas of AD patients.

Different models of transgenic mice have been used to study the retinal glia in AD. Ning et al.<sup>47</sup> used two strains of mouse models of AD with gene mutations for PSEN-1 and APP to study the immunoreactivity of F4/80 glycoprotein (mouse retinal microglial marker), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), APP and A $\beta$ , as well as to perform a TUNEL test (Terminal deoxy-nucleotidyl-Uridin-triphosphate, dUPT, Nick-End Labeling assay) which determines cell death by apoptosis. Sample comparisons were made between different age groups (7.8, 10.5, and 27 months) and between transgenic mice and the wild-type control group (WT). The results showed that there was an age-associated increase in the inflammatory cytokine MCP-1 and the microglial marker F4/80 in the APPswe/PSM146L transgenic mice. This suggests that RGCs increase the production of MCP-1 in response to A $\beta$ , and that the microglia proliferate to the stimulation of MCP-1. This occurs in parallel with the increased apoptosis in the GCL.

In a study by Pérez et al.<sup>80</sup>, the retinas of APPswe/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mice and non-transgenic mice between 12 and 19 months of age were compared, finding greater microglial activation in the mutant mice than in the control group at all ages evaluated. This was evidenced by an increase in F4/80 immunoreactivity as well as in morphological changes, including increased thickness

in the microglial processes, which made them appear more dendritic in the transgenic group than in the control. However, no changes were observed in cell body size. The same study evaluated patterns of GFAP immunoreactivity, revealing similar patterns in both mutated and non-transgenic mice regardless of age and sex. This immunoreactivity was restricted to the distal portion of Müller cells and astrocytes.

The retinas of Tg2576 transgenic mice studied by Liu et al.<sup>81</sup> showed A $\beta$  plaques with increased microvascular deposition of A $\beta$  and inflammation. Immunization with A $\beta$  and amylin hormone, or islet amyloid polypeptide (IAPP) reduced retinal A $\beta$  deposits, but increased microvascular deposition of retinal A $\beta$  and increased neuroinflammation. The neuroinflammation was observed to be partly due to microglial infiltration, as evidenced by increased immunoreactivity in microglial marker IBA-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1), which in some cases was associated with a loss of retinal architecture from the GCL to the outer nuclear layer, and partly due to astrogliosis (labeled with anti-GFAP), which was observed in transgenic mice not only in the NFL and in the GCL, as in the control group, but also in the astrocyte extensions that penetrated the GCL to reach deeper layers. Müller cell process staining was also increased. These observations support the idea that A $\beta$  immunotherapy increases the neuroinflammatory response in the retina. Microglial activation and astrogliosis may play an important role in the clearance of A $\beta$  from the CNS.<sup>81</sup>

Macroglial cells have been found to be polarized, meaning that their membranes have different domains with differentiated molecular functions and organization. Some studies indicate that this polarization is lost in some diseases, including AD, and that this loss is characterized by a lack of some molecules in certain membrane domains normally rich in these, which entails a loss of normal function. The membrane domain of the perivascular endfeet of astrocytes and Müller cells contains a large amount of aquaporin-4 protein (AQP4) and other integral membrane molecules that differentiate it from the presynaptic membrane. This high concentration of AQP4 is the result of several anchoring mechanisms, including interaction with DAPC, a dystrophin associated protein complex such as  $\alpha$ -syntrophin. Enger et al.<sup>82</sup> performed a mouse study to analyze the effect of a lack of dystrophin and  $\alpha$ -syntrophin on the macroglia polarization in three brain regions and in Müller cells using AQP4 as a marker. They concluded that both proteins played an important role in the organization of the plasma membrane molecules in the endfeet of these macroglial cells, but that they were not solely responsible for polarization. Other studies demonstrated how  $\beta$ 1-integrin deletion affects the polarized expression of AQP4 and dystrophin. In addition, the increase of utrophin following a lack of dystrophin suggests that utrophin may also play a role in structuring the membranes of the terminal feet.<sup>82</sup>

In the study by Edwards et al.<sup>26</sup> with 3xTG-AD mice and a control group found signs of glial activation in Müller cells and astrocytes in the retinas of the transgenic group. Müller cells activation was evidenced via antibodies against GFAP and S100 proteins. These proteins are not normally expressed by Müller cells, however, GFAP is expressed when they become reactive. Astrocyte activation was evidenced through the observation of a large number of these cells

demonstrating a reactive hypertrophic morphology in the 3xTgAD retinas in comparison to the control group. It should be noted that these signs of retinal glial activation preceded the signs of glial activation in the brain. The S100B protein increases the production of A $\beta$ , which may potentially contribute to the formation of plaques. In the study by Edwards et al. there also appeared to be an increase in the secretion of the S100 protein in the retinas of the transgenic mice, although it remains to be investigated whether this protein is secreted by the astrocytes and Müller cells, and what consequences this increase has in the retina. A study of changes in the expression of the GS enzyme in the retinas of these mice was also conducted, finding no significant changes. This was contrary to expectations, since reduced levels of protoplasmic astrocyte expression of this enzyme had been observed in the brain. However, it was noted that changes in GS expression were observed mostly in astrocytes associated with amyloid plaques, and no such plaques were observed in the sections of the retinas of the 3xTG-AD mice used for this study.

Studies of the retina using this 3xTgAD mouse model that focused on the microglia also detected microglial activation, but without conclusive results with respect to the control group.<sup>26</sup>

A study of 19-month-old TgF344-AD transgenic mice by Tsai et al.<sup>45</sup> showed glial activity through GFAP expression revealed by Müller cell staining. Although the control group also showed this type of activity, it was much less significant than in the transgenic mice.<sup>45</sup>

There is still a long road ahead in investigating retinal glia to understand glial activation. Attention must be paid to the size and number of processes in the microglia, their protein markers of activation, and the increased number of these cells observed in retinal diseases.<sup>26</sup> The loss of macroglial polarization has become a feature to be studied in AD and its models. Future research should address studies with mouse lines lacking utrophin and dystrophin to provide an additional insight into the polarization mechanisms of macroglial cells like Müller cells.<sup>32</sup> Bosco et al.<sup>33</sup> observed early and progressive microglial activation in the retinas of mouse models of glaucoma. Several authors describe similarities between the retinal manifestations of glaucoma and AD, so it is fair to consider that the techniques used in the study of glia in glaucoma can be used to evaluate these cells in the retina with AD.<sup>2</sup>

Given the functional importance of mitochondria in microglial activation, and that mitochondrial alterations are recognized in the brain in AD, but have not yet been evaluated in the retina (specifically in the retinal microglia), it seems to be a good hypothesis that the early stages of microglial activation can be detected using neuroimaging of specific mitochondrial markers.<sup>8</sup> Along these lines, mitochondrial translocator protein (TSPO; 18 kDa), which is expressed by reactive glia and is a biomarker of gliosis, seems a promising candidate as a molecular marker for the visualization of retinal inflammatory cells.<sup>2</sup>

## Conclusion

As part of the CNS, and because of its similarities to brain tissue, the retina can be analyzed to detect markers of AD,

and is therefore an important tool for visualization of the disease. Analyses of the retinal tissue of AD patients in combination with analyses of populations of transgenic mice models reveal the changes that retinal glial cells undergo as Alzheimer's disease develops. The study of morphological changes, numbers, microglial and macroglial protein markers, microglial mitochondrial markers, and macroglial polarization status are new opportunities for research in AD.

## Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ophthalmological Network OFTARED (RD16/0008/0005) of the Institute of Health of Carlos III of the Spanish Ministry of Economy; by the PN I+D+i 2008–2011, by the ISCIII-Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, and by the European programme FEDER. Grants to Elena Salobar-García are currently supported by a Predoctoral Fellowship (FPU13/01910) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

## References

1. Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2017;13:325–373.
2. Madeira MH, Ambrosio AF, Santiago AR. Glia-mediated retinal neuroinflammation as a biomarker in Alzheimer's disease. *Ophthalmic Res*. 2015;54:204–211.
3. Meraz-Rios MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernandez J, Campos-Pena V. Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci*. 2013;7:59.
4. Ridolfi E, Barone C, Scarpini E, Galimberti D. The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an eye on microglia. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:939786.
5. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006312.
6. Javadi FZ, Brenton J, Guo L, Cordello MF. Visual and ocular manifestations of Alzheimer's disease and their use as biomarkers for diagnosis and progression. *Front Neurol*. 2016;7:55.
7. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010;9:119–128.
8. Krantic S, Torriglia A. Retina: source of the earliest biomarkers for Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 2014;40:237–243.
9. Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. 2014;42:1291–1301.
10. Kettenmann H, Verkhatsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*. 2008;31:653.
11. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28:138–145.
12. Kolb H. Gital cells of the retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: the organization of the retina and visual system*. University of Utah Health Sciences Center; 1995. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11530/>.
13. Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, et al. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2760–2768.

14. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50:427–434.
15. Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte development and myelination in neurodevelopment: molecular mechanisms in health and disease. *Curr Pharm Des*. 2016;22:656–679.
16. Ramirez-Exposito MJ, Martinez-Martos JM. Structure and functions of the macroglia in the central nervous system. Response to degenerative disorders. *Rev Neurol*. 1998;26:600–611.
17. Newman EA. Electrophysiology of retinal glial cells. *Prog Retinal Res*. 1988;8:153–171.
18. Rojas B, Gallego BI, Ramirez AI, et al. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation*. 2014;11, 133-2094-11-133.
19. McCarthy CA, Widdop RE, Delyanti D, Wilkinson-Berka JL. Brain and retinal microglia in health and disease: an unrecognized target of the renin-angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40:571–579.
20. Nacher-Carda V. La microglia y su función inmunitaria en el sistema nervioso. *Fórum Recerca*. 1995;1:173–189.
21. Qir REM. Función neuroinmunológica de la glia en los procesos desmielinizantes. *Rev Esp Méd Quir*. 2014;19:336–346.
22. Santiago AR, Baptista FI, Santos PF, et al. Role of microglia adenosine A2(A) receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm*. 2014;465694.
23. Pérez Capote K. Doctoral Thesis *Respuesta de las células gliales al daño neuronal "in vitro"*. Universitat de Barcelona; 2006. Available: <http://hdl.handle.net/10803/876>.
24. Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1971–1980.
25. de Hoz R, Rojas B, Ramirez AI, et al. Retinal macroglial responses in health and disease. *BioMed research international*. 2016;2954721.
26. Edwards MM, Rodriguez JJ, Gutierrez-Lanza R, Yates J, Verkhatsky A, Luttj GA. Retinal macroglia changes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Eye Res*. 2014;127:252–260.
27. Harvey H, Durant S. The role of glial cells and the complement system in retinal diseases and Alzheimer's disease: common neural degeneration mechanisms. *Exp Brain Res*. 2014;232:3363–3377.
28. Dehabadi MH, Davis BM, Wong TK, Cordeiro MF. Retinal manifestations of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis Manag*. 2014;4:241–252.
29. Leger F, Femagot PO, Cannon MH, et al. Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70:63–68.
30. Salobarra-Garcia E, Hoyas I, Leal M, et al. Analysis of retinal peripapillary segmentation in early Alzheimer's disease patients. *Biomed Res Int*. 2015;636548.
31. Coppola G, Di Renzo A, Ziccardi L, et al. Optical coherence tomography in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10:e0134750.
32. Marziani E, Pomati S, Ramolfo P, et al. Evaluation of retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer thickness in Alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:5953–5958.
33. Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging*. 1996;17:377–384.
34. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Koronyo Y, et al. Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2016;79:90–109.
35. Kromer R, Serbecic N, Hausner L, Aboul-Enein F, Froelich L, Beutelspacher S. Detection of retinal nerve fiber layer defects in Alzheimer's disease using SD-OCT. *Front Psychiatry*. 2014;5:22.
36. Moschos M, Markopoulos M, Chatziralli I, et al. Structural and functional impairment of the retina and optic nerve in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9:782–788.
37. Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina. *Acta Neuropathol*. 2016;132:767–787.
38. Danesh-Meyer HV, Birch H, Ku JY, Carroll S, Gamble G. Reduction of optic nerve fibers in patients with Alzheimer disease identified by laser imaging. *Neurology*. 2006;67:1852–1854.
39. Frost S, Kanagasangam Y, Sohrabi H, et al. Retinal vascular biomarkers for early detection and monitoring of Alzheimer's disease. *Trans Psychiatry*. 2013;3:e233.
40. Iseri PK, Altinas O, Tokay T, Yuksel N. Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease. *J Neuroophthalmol*. 2006;26:18–24.
41. Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging*. 1996;17:385–395.
42. van Wijngaarden P, Hadoux X, Alwan M, Keel S, Dirani M. Emerging ocular biomarkers of Alzheimer disease. *Clin Exp Ophthalmol*. 2017;45:54–61.
43. Kesler A, Vakhpova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M. Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113:523–526.
44. Berisha F, Fekete GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL. Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2285–2289.
45. Tsai Y, Lu B, Ljubimov AV, et al. Ocular changes in TgF344-AD rat model of Alzheimer's Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:523–534.
46. Gharbiya M, Trebbastoni A, Parisi F, et al. Choroidal thinning as a new finding in Alzheimer's disease: evidence from enhanced depth imaging spectral domain optical coherence tomography. *J Alzheimer Dis*. 2014;40:907–917.
47. Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J. Amyloid- $\beta$  deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:5136–5143.
48. Cheung CY, Ong Y, Ikram MK, Chen C, Wong TY. Retinal microvasculature in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*. 2014;42(s4):S339–S352.
49. Williams MA, McGowan AJ, Cardwell CR, et al. Retinal microvascular network attenuation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015;1:229–235.
50. Fekete GT, Hyman BT, Stern RA, Pasquale LR. Retinal blood flow in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015;1:144–151.
51. Bateman R. Alzheimer's disease and other dementias: advances in 2014. *Lancet Neurol*. 2015;14:4–6.
52. Valenti DA. Alzheimer's disease: screening biomarkers using frequency doubling technology visual field. *ISRN Neurol*. 2013;2013:989583.
53. Kayabasi U, Sergott RC, Rispoli M. Retinal examination for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Ophthalmic Pathol*. 2016;2014.
54. Ramirez AI, de Hoz R, Salobarra-Garcia E, et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, parkinson, and glaucoma. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:214.
55. Bringmann A, Wiedemann P. Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*. 2012;227:1–19.
56. Coorey NJ, Shen W, Chung SH, Zhu L, Gillies MC. The role of glia in retinal vascular disease. *Clin Exp Optom*. 2012;95:266–281.
57. Provis JM, Diaz CM, Penfold PL. Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol*. 1996;3:213–222.

58. Huang T, Cui J, Li L, Hitchcock PF, Li Y. The role of microglia in the neurogenesis of zebrafish retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421:214–220.
59. Checchin D, Senmlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3595–3602.
60. Beynon SB, Walker FR. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience.* 2012;225:162–171.
61. Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:5690–5696.
62. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation.* 2012;9, 92-2094-9-92.
63. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25:397–424.
64. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of muller cells. *Glia.* 2013;61:651–678.
65. Sanderson J, Dartt DA, Trinkaus-Randall V, et al. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Müller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Exp Eye Res.* 2014;127:270–279.
66. Triviño A, Ramírez A, Salazar J, Rojas B, De Hoz R, Ramírez J. Retinal changes in age-related macular degeneration. *Focus Eye Res.* 2005:1–37.
67. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007;10:1369–1376.
68. Peng L, Parpura V, Verkhratsky A. Neuroglia as a central element of neurological diseases: an underappreciated target for therapeutic intervention. *Curr Neuropharmacol.* 2014;12:303–307.
69. Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, et al. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28:423–451.
70. Luna G, Lewis GP, Banna CD, Skalli O, Fisher SK. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol Vis.* 2010;16:2511–2523.
71. Burke JM, Smith JM. Retinal proliferation in response to vitreous hemoglobin or iron. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20:582–592.
72. Bringmann A, Reichenbach A. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001;6:E72–E92.
73. Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* 2009;54:143–160.
74. Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247:865–883.
75. Wang JJ, Zhu M, Le YZ. Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J Diabetes.* 2015;6:726–733.
76. Roth S. Role of nitric oxide in retinal cell death. *Clin Neurosci.* 1997;4:216–223.
77. Kashii S, Mandai M, Kikuchi M, et al. Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.* 1996;711:93–101.
78. Liew SC, Penfold PL, Provis JM, Madigan MC, Billson FA. Modulation of MHC class II expression in the absence of lymphocytic infiltrates in Alzheimer's retinae. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53:150–157.
79. Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging.* 1996;17:385–395.
80. Perez SE, Lumayag S, Kovacs B, Mufson EJ, Xu S. B-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APPsw/PS1ΔE9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:793–800.
81. Liu B, Rasool S, Yang Z, et al. Amyloid-peptide vaccinations reduce β-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *Am J Pathol.* 2009;175:2099–2110.
82. Enger R, Gundersen GA, Haj-Yasein NN, et al. Molecular scaffolds underpinning macroglial polarization: an analysis of retinal Müller cells and brain astrocytes in mouse. *Glia.* 2012;60:2018–2026.
83. Bosco A, Romero CO, Breen KT, et al. Neurodegeneration severity can be predicted from early microglia alterations monitored in vivo in a mouse model of chronic glaucoma. *Dis Model Mech.* 2015;8:443–455.
84. Parnell M, Guo L, Abdi M, Cordeiro MF. Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:786494.
85. Edwards MM, Rodríguez JJ, Gutierrez-Lanza R, Yates J, Verkhratsky A, Luttj G. Retinal macroglia changes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Eye Res.* 2014;127:252–260.
86. Shimazawa M, Inokuchi Y, Okuno T, et al. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Neurochem.* 2008;107:279–290.
87. Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A, Chvatal A, Sykova E, Rodríguez JJ. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Anat.* 2012;221:252–262.
88. Yeh CY, Vadhwana B, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro.* 2011;3:271–279.



