



PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS PATOLOGÍAS OCULARES ASOCIADAS A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL



TRABAJO FIN DE GRADO EXPERIMENTAL

Álvaro Santana Garrido

**Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Doble Grado en Farmacia y en Óptica y Optometría



TRABAJO FIN DE GRADO

Trabajo de carácter experimental

**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS PATOLOGÍAS OCULARES
ASOCIADAS A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

Tutores: Alfonso Mate Barrero

Carmen María Vázquez Cueto

Álvaro Santana Garrido

Sevilla, 6 de julio de 2017

RESUMEN:

El estrés oxidativo se asocia con diversas enfermedades oculares y sistémicas y con el proceso de envejecimiento. Muchos estudios relacionan la hipertensión arterial (HTA) con una variación del estado oxidativo, y cómo este hecho puede favorecer la aparición de diferentes patologías en diversos órganos. Además, estudios epidemiológicos recientes apuntan que la HTA podría ser la responsable del desarrollo de cataratas, y de la aparición de muchos otros desórdenes oculares, entre ellos, la retinopatía hipertensiva, coroidopatías o el glaucoma. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos precisos implicados en el efecto nocivo de la HTA sobre el sistema visual.

El objetivo de este trabajo es relacionar el papel del estrés oxidativo en las enfermedades oculares asociadas a la HTA mediante el estudio de la actividad y expresión de la enzima NADPH oxidasa (principal enzima relacionada con el aumento de estrés oxidativo en la HTA mediante la producción de anión superóxido). Dicho estudio se ha llevado a cabo en globos oculares utilizando un modelo animal de hipertensión inducida con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

En nuestro trabajo hemos observado un aumento en la actividad NADPH oxidasa y un incremento en la expresión proteica de sus isoformas, así como de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), por lo que podemos concluir que la HTA produce un aumento del estrés oxidativo local en el globo ocular que podría ser relevante en la fisiopatología de ciertas enfermedades oculares.

Palabras Claves: Estrés oxidativo, hipertensión arterial, L-NAME, NADPH oxidasa, ojos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. Estrés oxidativo y enfermedades oculares	8
I.2. La hipertensión arterial en la patología ocular.....	10
II. OBJETIVOS DEL TFG	11
III. METODOLOGÍA	11
III.1. Animales y tratamiento.....	11
III.2. Materiales, instrumentos y reactivos	12
III.3. Obtención y tratamiento de las muestras	14
III.4. Estudio de la actividad de la enzima NADPH oxidasa	15
III.4.1. Homogenización de los tejidos	15
III.4.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	16
III.4.3. Determinación de la actividad NADPH oxidasa.....	17
III.4.4. <i>Western blotting</i>	18
III.4.5. Análisis estadístico	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
IV.1. Características generales de los animales de experimentación	23
IV.2. Actividad NADPH oxidasa en el globo ocular	24
IV.3. Expresión proteica de las enzimas NADPH oxidasa y eNOS	25
V. CONCLUSIONES	30
VI. BIBLIOGRAFÍA	31

ABREVIATURAS

- $\cdot\text{O}_2^-$: Anión radical superóxido.
- $\cdot\text{OH}$: Radical hidroxilo.
- DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad.
- eNOS: Isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa.
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno.
- HTA: Hipertensión arterial.
- L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil éster.
- MT: Malla trabecular.
- NADPH: β -nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducido.
- NO: Óxido nítrico.
- NOS: Óxido nítrico sintasa.
- NOX: Isoformas de la enzima NADPH oxidasa.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ONOO $^-$: Anión peroxinitrito.
- PA: Presión arterial.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- POAG: Glaucoma de ángulo abierto.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SDS: Dodecilsulfato sódico.
- URL: Unidades relativas de luz.

I. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo desempeña un importante papel en el desarrollo de varias enfermedades oculares y sistémicas, así como en el proceso de envejecimiento; puede definirse como un desbalance entre las sustancias oxidantes (radicales libres) y antioxidantes del organismo a favor de las primeras, que conduce a la producción de daño tisular (Jensen, 2003).

Los radicales libres son moléculas que tienen un número impar de electrones y, por lo tanto, son sustancias muy inestables y reactivas con otras moléculas, de las cuales tratan de capturar un electrón para ganar estabilidad (Oduntan y Mashige, 2011). Cuando estas moléculas pierden su electrón, se convierten a su vez en radicales libres, produciéndose una cadena de reacciones que pueden ser nocivas para diferentes componentes celulares y que activan vías de señalización que influyen en numerosos procesos celulares, muchos de ellos ligados al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad.

Los radicales libres incluyen las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), que engloban una gran variedad de especies químicas como el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Una gran parte de estas ROS se originan como productos del metabolismo anaeróbico de la mitocondria, en componentes endógenos de ésta como son los peroxisomas mitocondriales, las lipooxigenasas y la NADPH oxidasa (Jensen, 2003). Además, existen fuentes exógenas de ROS entre las que se incluyen la luz ultravioleta, la radiación ionizante, quimioterapéuticos, toxinas ambientales, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Finkel y Holbrook, 2000; Wickens, 2001; Jensen, 2003; Saleh y cols., 2010).

El estrés oxidativo causado por los radicales libre puede dañar lípidos, proteínas, enzimas, carbohidratos y ácidos nucleicos induciendo la muerte celular por fragmentación de ácidos nucleicos y peroxidación de lípidos, lo que desencadena numerosas patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurodegenerativos, diabetes o procesos autoinmunes (Feldmen, 2003; Brownlee, 2005; Ratnam y cols., 2006; Kowluru y Kanwar, 2009) (Figura 1).

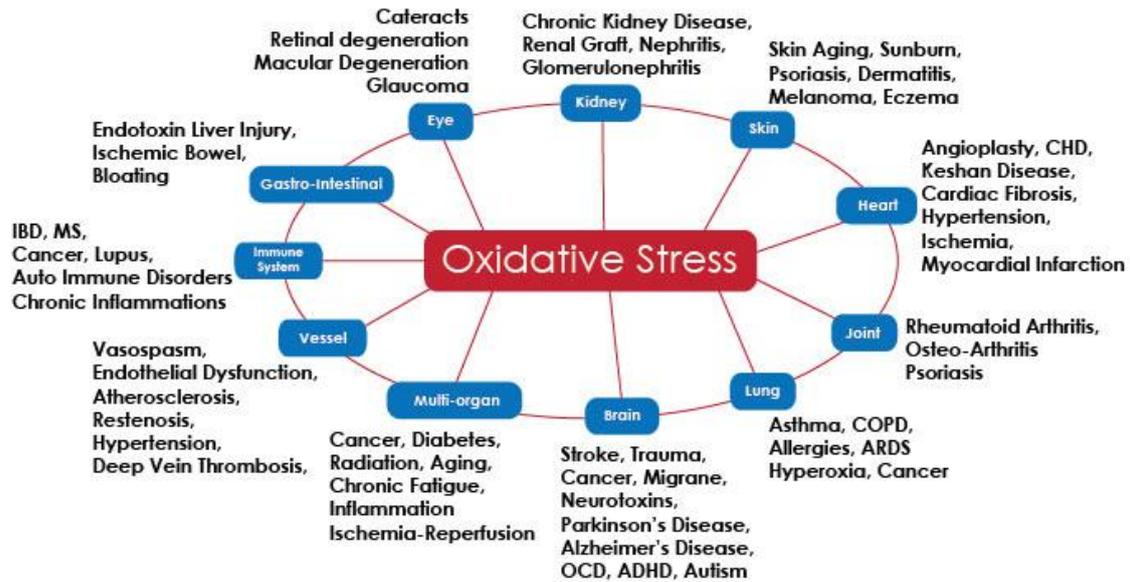


Figura 1. *Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.* Relación del estrés oxidativo en diferentes enfermedades organizadas según el órgano al que afectan.

I.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES OCULARES

El ojo es el único órgano que se encuentra relativamente desprotegido y en constante exposición a la radiación, al oxígeno atmosférico, a los químicos medioambientales y a la abrasión física. Además, es un órgano con una gran actividad metabólica relacionada con la recepción y absorción de luz, por lo que los procesos foto-oxidativos son cruciales en el desarrollo de patología ocular.

Estos factores contribuyen a la generación de ROS y por tanto a un aumento del estrés oxidativo. En relación a esto, se ha demostrado que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de muchos trastornos oculares, incluyendo patologías corneales (ojo seco, conjuntivocalasia, queratocono, etc), cataratas, degeneración macular, retinopatía diabética, uveítis y retinitis pigmentaria, entre otros (Oduntan y Mashige, 2011). Los problemas oculares de mayor prevalencia relacionados con el estrés oxidativo son los siguientes:

- **Patologías de la superficie corneal:** La exposición intensa a la luz, la actividad metabólica y la alta tensión de oxígeno hacen que las células corneales sean vulnerables al daño producido por el estrés oxidativo, de modo que el aumento de ROS juega un importante papel en la propagación del daño celular que resulta en desórdenes de la superficie anterior del ojo, como son el ojo seco, la conjuntivocalasia, el daño del epitelio ocular inducido por tabaco o el daño inducido por radiación ultravioleta (Dogru y cols., 2009). Además, el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de enfermedades de la superficie corneal

relacionadas con procesos inflamatorios, metabólicos, degenerativos o de causas iatrogénicas (Shoham y cols, 2008).

- **Cataratas:** La opacificación del cristalino se considera la principal causa de ceguera en el mundo, representando casi la mitad de los casos de ceguera según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kaur y cols., 2017). El cristalino, debido a su elevada actividad metabólica y capacidad de filtración de la luz, es quizás uno de los tejidos con mayor estrés oxidativo en el cuerpo. Las proteínas del cristalino presentan grupos tioles que son rápidamente oxidados a puentes disulfuro (Lou, 2000) que unen a las proteínas formando un aglomerado que produce opacidad y favoreciendo con ello la formación de la catarata. Esta oxidación del cristalino está mediada por procesos relacionados con la exposición a la luz ultravioleta, la peroxidación lipídica y la carencia de antioxidantes obtenidos en la dieta.
- **Glaucoma:** En los últimos años han aumentado las evidencias que sugieren que las ROS juegan un papel clave en la patogénesis del glaucoma de ángulo abierto (*primary open-angle glaucoma*, POAG) (Izzotti y cols., 2006). Así, se ha observado un incremento significativo en el daño oxidativo producido en el ADN de la malla trabecular (MT) de pacientes glaucomatosos en comparación con pacientes controles. Este daño no solamente se ha encontrado a nivel de la MT, sino también alrededor de la cabeza del nervio óptico, y se ha observado cómo modifica la composición del humor vítreo y humor acuoso pudiendo producir la alteración en la MT (Saccà y Izzotti, 2008). También se ha observado un incremento de la expresión y actividad enzimática de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, enzima implicada en la síntesis de óxido nítrico, NO) y de nitrotirosina (marcador del estrés oxidativo) en la MT de pacientes con POAG, con una relación directamente proporcional a los defectos en el campo visual (Fernández-Durango y cols., 2008).
- **Degeneración macular asociada a la edad (DMAE):** La DMAE es la principal causa de ceguera en los países desarrollados de acuerdo con la OMS (Resnikoff y cols., 2004). La etiología de esta enfermedad es multifactorial, y entre los factores de riesgo bien reconocidos se encuentran la edad (>60 años), genética, tabaco, baja concentración de agentes antioxidantes en plasma, hipertensión e hipercolesterolemia (Carneiro y Andrade, 2017). Estos factores producen una atrofia progresiva del epitelio pigmentario afectando a la nutrición macular como consecuencia de la alteración del sistema antioxidante interno de la retina, lo cual conduce a la muerte de los fotorreceptores y causa una ceguera progresiva.

I.2 LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN LA PATOLOGÍA OCULAR

La hipertensión arterial (HTA) se considera el factor de riesgo cardiovascular más importante actualmente. Según las últimas directrices de las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología, la HTA se establece cuando la presión arterial sistólica es mayor o igual a 140 mmHg y/o el valor de la presión arterial diastólica es mayor o igual de 90 mmHg (Mancia y cols., 2013). El estrés oxidativo ha ganado protagonismo como uno de los mecanismos principales responsables en el desarrollo de la HTA, ya que las ROS tienen un importante papel en la homeostasis de la pared vascular, pudiendo contribuir en el mecanismo de la hipertensión (Fraser-Bell y cols., 2017). A consecuencia de estas modificaciones en la pared vascular, se desencadenan una serie de cambios en la organización de los vasos que conducen a muchas patologías vasculares. El sistema visual, dada su alta vascularización a nivel de la coroides y de la retina, podría ser uno de los sistemas del organismo más expuesto a las consecuencias de las alteraciones vasculares producidas por la hipertensión sistémica.

Por tanto, a nivel ocular, la HTA es la causante de desencadenar una serie de alteraciones que afectan especialmente a la retina, a la coroides y al nervio óptico, por ser las zonas de mayor irrigación vascular. Aunque la retinopatía hipertensiva es la manifestación más común a nivel del sistema ocular, debido a que la retina es la zona más irrigada del globo ocular, la elevada presión arterial también puede provocar fibrosis y necrosis de la propia coroides (Fernando, 2013). Esta afectación en la coroides impide la perfusión por los capilares coroideos, desencadenando una isquemia en los lugares que irriga la coroides, entre ellos, el nervio óptico (Konstantinidis y Guex-Crosier, 2016). Además pueden aparecer otros problemas relacionados con la hipertensión, como son las oclusiones venosas y/o arteriales, y los macroaneurismas arteriales a nivel de la retina (Fraser-Bell y cols., 2017) y otras patologías oculares como el glaucoma (Langman y cols., 2005) o la DMAE (Miyazaki y cols., 2003), que pueden ocasionar pérdida de visión. Otros estudios epidemiológicos sugieren también la responsabilidad de la HTA en el desarrollo de cataratas (Yu y cols., 2014) (Figura 2).



Figura 2. Ejemplos de enfermedades oculares relacionadas con la hipertensión arterial. Cataratas, retinopatía hipertensiva y macroaneurisma retiniano en la arcada temporal superior, respectivamente.

A pesar de los trabajos que indican el efecto nocivo de la HTA sobre la estructura y función ocular, se conoce poco sobre los mecanismos implicados en estos desórdenes. Trabajos muy recientes indican que el estrés oxidativo forma parte de la patogénesis involucrada en la formación de las cataratas como consecuencia de la HTA; así, se han observado modificaciones en el sistema enzimático antioxidante del cristalino en la HTA (Khan y cols., 2016; Singh y cols., 2016). Por otro lado, numerosos estudios han confirmado la importancia de la enzima NADPH oxidasa, principal productora del anión superóxido, en el desarrollo del estrés oxidativo asociado a la HTA (Montezano y Touyz, 2012; Zambrano y cols., 2013).

Así pues, el estudio del estado oxidativo producido por la HTA podría ser clave para conocer el mecanismo por el cual se producen estas enfermedades oculares.

II. OBJETIVOS DEL TFG

Debido a lo expuesto anteriormente sobre la importancia del estrés oxidativo y la HTA en la etiología y fisiopatología de diferentes enfermedades oculares, el objetivo de este TFG experimental es analizar el papel de la enzima NADPH oxidasa en el estrés oxidativo desarrollado en el globo ocular tras la HTA. Para ello, utilizamos ratas con HTA inducida mediante la administración de la N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, sustancia inhibidora de la síntesis de NO) junto con ratas no tratadas que nos servirán de controles del estudio. En ambos grupos de estudio analizaremos la actividad de la enzima NADPH oxidasa y la expresión proteica de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa en el globo ocular. También mediremos la expresión de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) para profundizar en los mecanismos involucrados en el desarrollo del estrés oxidativo ocular en la HTA.

III. METODOLOGÍA

III.1 ANIMALES Y TRATAMIENTO

Para la realización de este trabajo hemos utilizado ratas macho de entre 10 y 12 semanas de edad, pertenecientes a la cepa Wistar y procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Todos los procedimientos llevados a cabo cumplen con la normativa en vigor a nivel internacional, nacional y autonómico relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos¹.

¹ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010. Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero (BOE núm. 34 de 8 de febrero). Decreto 80/2011 de 12 de Abril (BOJA núm. 82 de 28 de abril).

Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos experimentales de 7 animales cada uno: i) ratas control (grupo CONTROL), ii) ratas tratadas con 20 mg de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)/kg de peso/día (grupo L-NAME). El tratamiento con L-NAME fue administrado en el agua de bebida durante 12 semanas, ajustándose semanalmente la concentración del fármaco en función del peso y de la ingesta líquida diaria de los animales. No se observaron diferencias significativas en el consumo medio de agua en ambos grupos. Durante el periodo experimental, los animales se mantuvieron en condiciones estándar (23 \pm 1 $^{\circ}$ C, ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad) en el estabulario de la Facultad de Farmacia, y se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial (Panlab, S.L.) y con libre acceso al agua de bebida (en la cual iba disuelto el tratamiento, en su caso).

En el grupo L-NAME se realizó un control semanal de la presión arterial para comprobar la eficacia del tratamiento. Para ello, se introducían los animales en un cepo que permitía su inmovilización con objeto de medir la presión arterial con un esfigmomanómetro, colocando el manguito presurizador sobre la cola del animal (Figura 3). Previamente, se requiere aplicar calor sobre la cola del animal con una lámpara infrarroja, para dilatar la arteria y amplificar y homogeneizar las señales de pulso de presión en la arteria caudal. Para cada animal se realizaban 3-4 mediciones sucesivas, promediando los valores registrados.



Figura 3. Medidas de la presión arterial en ratas. Se utiliza un cepo especialmente diseñado para inmovilizar al animal, y se introduce el manguito y el transductor en la cola del mismo para recoger la señal de pulsos.

Una vez concluido el tratamiento, los animales se sacrificaron y se les extrajo el globo ocular para el estudio de la enzima NADPH oxidasa.

III.2 MATERIALES, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

- Materiales:
 - Contenedor para hielo
 - Placa de Petri
 - Material de cirugía: bisturí, tijeras quirúrgicas y pinzas
 - Homogeneizador de vidrio-teflón
 - Microtubos de 1,5 mL

- Papel de filtro Whatman nº 1
- Probetas
- Micropipetas
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos de poliestireno para luminómetro
- Microplacas ELISA de 96 pocillos

- Instrumentos:
 - Lupa binocular
 - Balanza analítica
 - Homogeneizador Heidolph RZR 2102
 - Baño termostaticado
 - Luminómetro de tubos (*BERTHOLD* Junior LB 9509)
 - Quimioluminómetro Amersham Imaging 600
 - Instrumental para Western blotting

- Reactivos:
 - Ácido acético glacial (Panreac, España)...Art. 11008.1102
 - Acrilamida/Bisacrilamida 30% (Bio-Rad Laboratories)...Art. 67784
 - Albúmina bovina sérica (Sigma-Aldrich)...Art. A7906-50G
 - Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)...Art. B-8026
 - Bio-Rad® Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.)...Art. 500-0006
 - Cloruro sódico (Panreac, España)...Art. 211939
 - Colorante Ponceau S (Sigma-Aldrich, España)...Art. R8875
 - CØmplete Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, España)...Art. 11697498001
 - Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, España)...Art. 3771
 - Gammaglobulina bovina (γ -globulina) (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.)...Art. 500-0005
 - Glicerol (Sigma-Aldrich, EEUU)...Art. G-5516
 - Glicina (Sigma-Aldrich, España)...Art. G-8898
 - Metanol (Panreac, España)...Art. 131091.1214
 - N,N,N',N-Tetrametiletildiamina (TEMED) (Bio-Rad Biosystems, USA)...Art. 161-0800
 - N,N'-Dimetil-9,9'-biacridinio dinitrato (Lucigenina) (Sigma-Aldrich, España)...Art. M8010
 - Persulfato de amonio (APS) (Sigma-Aldrich, España)...Art. A3678

- Tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, España)...Art. 14190-250
- Tris (Sigma-Aldrich, España)...Art.T1378
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, España)...Art. P1379
- β -nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducido (NADPH) (Sigma-Aldrich, España)...Art. N-6505

III.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez anestesiado el animal con hidrato de cloral (400 mg/Kg), se sacrifica, y se procede a la extracción de ambos globos oculares mediante la técnica de enucleación (Wilding y cols., 2015). Para ello se utiliza una pinza quirúrgica de acero inoxidable que nos permita abrir los bordes de los párpados del animal, y visualizar claramente el globo. A continuación, procedemos a extraer el globo ocular usando unas tijeras de punta curva que se introducen por debajo del mismo y nos permiten cortar a nivel del nervio óptico (Figura 4).



Figura 4. Cirugía de enucleación del globo ocular. Consiste en extraer el globo ocular sin el nervio óptico y manteniendo la integridad de los órganos anejos del ojo.

Tras extraer ambos ojos, se colocan en una placa de Petri en frío con solución de Krebs, y con ayuda de una lupa binocular, se procede a limpiar la muestra para eliminar cualquier resto de tejido muscular que haya quedado sobre el globo ocular. Seguidamente, con ayuda de un bisturí, se realiza un corte bajo la lupa en el centro de la córnea, que nos sirve para extraer el humor acuoso, el cristalino y el humor vítreo, que se desprecian, quedándonos con el resto de estructuras del globo ocular.

Ambos globos oculares se pesan juntos en una balanza analítica, se introducen en un microtubo eppendorf para su inmediata congelación en N_2 líquido, y se guardan a $-80^{\circ}C$ hasta su posterior análisis.

III.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NADPH OXIDASA

III.4.1 HOMOGENIZACIÓN DE LOS TEJIDOS

REACTIVOS

Tampón de Homogeneización de tejidos:

- PBS..... 900 μ L
- Inhibidor de proteasas 100 μ L

Hay que tener en cuenta que la anatomía del ojo de los roedores tiene algunas diferencias con la del humano (Figura 5); entre ellas, hay que destacar que el cristalino ocupa mayor proporción del globo ocular en los roedores, lo que afecta considerablemente al peso de la muestra.

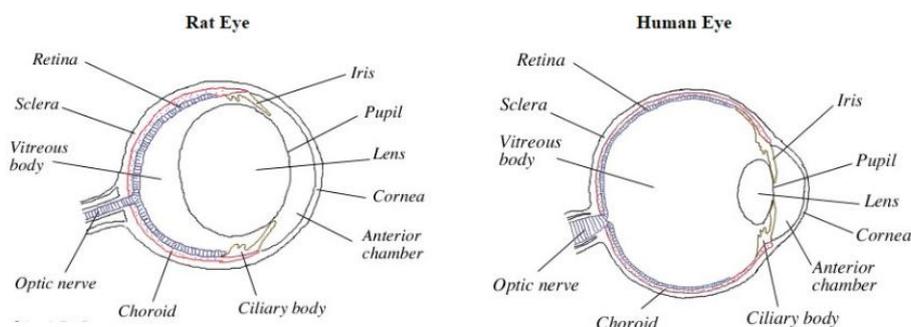


Figura 5. Comparación anatómica del ojo de ratas con el ojo del humano. Se observa la diferencia proporcional del humor vítreo, cristalino, humor acuoso y córnea entre los ojos ambas especie.

La muestra, sumergida en el tampón de homogeneización, se deposita en un homogeneizador de vidrio junto a 500 μ L del tampón de homogeneización. Inmediatamente después, se realiza una homogeneización vidrio-teflón en un homogeneizador *Heidolph RZR 2102*, aplicando al émbolo de teflón acoplado al motor una velocidad de rotación de 400 rpm. Para evitar un sobrecalentamiento que eventualmente pudiera desnaturalizar las proteínas, la homogeneización se realiza en frío y secuencialmente, en intervalos de 15 segundos intercalados con periodos de reposo de 5-10 segundos, hasta observar un homogeneizado uniforme (hay que tener en cuenta que la esclerótica y la córnea no se homogeneizan del todo, ya que son tejidos conectivos con propiedades viscoelásticas).

Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar restos de orgánulos celulares, y el sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de proteínas y de la actividad NADPH oxidasa.

III.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

REACTIVOS

- Bio-Rad® Protein Assay
- Solución patrón de gammaglobulina

La concentración de proteínas en los homogeneizados de ojos se ha determinado siguiendo el método colorimétrico descrito por Bradford (1976) utilizando el reactivo Bio-Rad® Protein Assay (que contiene ácido fosfórico y metanol). Este método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo, dando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. La técnica consiste en incubar, en una microplaca de ELISA 5 μ L de los homogeneizados (diluidos 1/40 con agua bidestilada² y procesados por triplicado), o de los estándares en su caso (por duplicado), con 250 μ L del reactivo de Bio-Rad® (previamente diluido 1:5 con agua bidestilada y filtrado a través de un papel Whatman nº 1) durante 10 minutos a temperatura ambiente (Figura 6). Una vez transcurrido el tiempo, la placa se introduce en un lector de placas (Asys UVM 340) asociado a un programa de análisis y lectura de datos (MikroWin2000), expresándose los resultados en mg/mL de proteínas.



Figura 6. Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Ejemplo de microplaca ELISA completada para colocar en el lector de datos del ordenador.

Las soluciones estándares se preparan a partir de una solución de gammaglobulina bovina de concentración igual a 1,56 mg/mL. A partir de ésta, se realizan diluciones seriadas, para obtener los siguientes puntos de la curva patrón (en mg/mL): P1 = 0,0975; P2 = 0,195; P3 =

² Las muestras se diluyen apropiadamente en base a experimentos previos realizados para que las medidas posteriores puedan interpolarse dentro del rango de la curva patrón.

0,39; P4 = 0,78; P5 = 1,56. Conociendo las concentraciones de los estándares y sus absorbancias, se elabora la correspondiente curva patrón, la cual permite conocer las concentraciones de proteínas de los homogeneizados de ojo a partir de los correspondientes valores de absorbancias.

III.4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA

REACTIVOS

- PBS (pH=7).....25 mL
- NADPH3 mM
- Lucigenina (N,N'-Dimetil-9,9'-biacridinio dinitrato)5,3 μ M

Para el estudio de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, utilizamos una técnica, basada en la quimioluminiscencia, puesta a punto previamente en nuestro laboratorio (Zambrano y cols., 2013) y adaptada al estudio del órgano que nos compete. El fundamento de la técnica se basa en la capacidad que posee el anión superóxido (producto de la reacción que cataliza la NADPH oxidasa) de oxidar la lucigenina³, en una reacción que produce fotones de luz que son rápidamente medidos en un luminómetro estándar (*BERTHOLD* Junior LB 9509).

La reacción se lleva a cabo en tubos de poliestireno para luminómetro. Tras haber determinado la concentración de proteínas según lo descrito en el apartado III.4.2, se deposita en la parte inferior del tubo un volumen de la muestra a analizar equivalente a 100 μ g de proteínas (generalmente se añaden 10 μ L de muestra previamente diluida hasta una concentración proteica de 10 mg/mL); seguidamente se añaden 10 μ L de NADPH 3 mM (cuidando de evitar el contacto prematuro de este reactivo con la muestra, tal como se muestra en la Figura 7), y se deja incubar el tubo durante 5 minutos en un baño a 37°C. Pasado este tiempo, se añaden 280 μ L de lucigenina 5,35 μ M y se introduce el tubo en el luminómetro, programado para un tiempo de registro de 4 minutos. Los resultados se expresan en unidades relativas de luz (URL) por cada 100 μ g de proteínas. Para eliminar la contribución inespecífica de los reactivos a las lecturas de URL, se realiza también un blanco de muestra, procesado de la misma forma pero con la salvedad de que no añadimos NADPH (sustrato de la enzima NADPH oxidasa).

³ La lucigenina es fotosensible, por lo que debe de protegerse de la luz durante su uso.

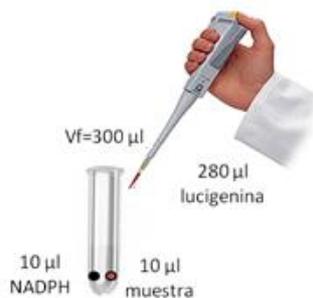


Figura 7. Determinación de la actividad NADPH oxidasa. La figura muestra la disposición del sustrato y la muestra en el tubo de poliestireno antes de iniciar la reacción mediante la adición de la lucigenina.

III.4.4 WESTERN BLOTTING

La técnica de *Western blotting* permite la separación de proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y su identificación gracias al empleo de anticuerpos específicos.

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

REACTIVOS

- Tampón de muestra (2X):

-Tris/HCl (pH=6,8)	0,125 mM
-Glicerol	25%
-SDS.....	2%
-Azul de bromofenol.....	0,01%

Se mezclan volúmenes iguales de los homogeneizados proteicos de ojos (equivalentes a la cantidad de proteína previamente optimizada para la detección de la proteína objeto de estudio) y de tampón de muestra 2X. La mezcla se hierve a 100°C durante 5 minutos, para desnaturizar las proteínas. Transcurrido este tiempo, se colocan inmediatamente en hielo hasta la realización de la electroforesis.

REACTIVOS

- Gel separador de poliacrilamida al 8%:

-H ₂ O	4,6 mL
-Acrilamida/Bisacrilamida 30%.....	2,7 mL
-Tris 1,5 M.....	2,5 mL

-SDS 10%.....	100 µL
-APS 10%.....	100 µL
-TEMED	6 µL

B. ELECTROFORESIS

REACTIVOS

- Gel separador de poliacrilamida al 8%:

-H ₂ O	4,6 mL
-Acrilamida/Bisacrilamida 30%.....	2,7 mL
-Tris 1,5 M.....	2,5 mL
-SDS 10%.....	100 µL
-APS 10%.....	100 µL
-TEMED	6 µL

- Gel concentrador de poliacrilamida:

-H ₂ O	5,5 mL
-Acrilamida/Bisacrilamida 30%.....	1,3 mL
-Tris 1,5 M.....	1 mL
-SDS 10%.....	80 µL
-APS 10%.....	80 µL
-TEMED	8 µL

- Tampón de electroforesis 10X:

-Tris	250 mM
-Glicerina	1,92 M
-SDS 10%.....	50 mL

La electroforesis de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida, cuyo grado de polimerización permite obtener diferentes tamaños de poro por el cual migran las proteínas, lo que permite la separación y caracterización de las proteínas de interés.

El gel de electroforesis se compone de dos tipos de geles: un gel concentrador (que concentra todas las proteínas en un determinado lugar) y un gel separador (cuya función es la de separar las proteínas según su peso molecular). En nuestro caso preparamos geles con una concentración final de la mezcla acrilamida/bisacrilamida del 8%. Una vez colocado el gel en la cubeta de electroforesis, se separan los peines (que permiten definir los diferentes pocillos para depositar las muestras) y se vierte tampón de electroforesis (preparado extemporáneamente a partir del concentrado 10X) hasta que los pocillos queden sumergidos. Las muestras se cargan en los pocillos, y se incluye también en uno de ellos un marcador de peso molecular (el cual permitirá identificar los distintos pesos moleculares de las correspondientes proteínas al final del proceso). Finalmente, se llena la cubeta con tampón de electroforesis, se cierra el circuito y se aplica un voltaje constante de 150V durante 1 hora.

C. TRANSFERENCIA

REACTIVOS

- Tampón de transferencia:

-Tris 20 mM

-Glicina 150 mM

-Metanol 20%

- Solución colorante Ponceau S:

-Colorante Ponceau S 0,5 g

-Ácido acético glacial 1 mL

-Agua bidestilada 99 mL

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida son transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro, mediante un sistema de electrotransferencia (*Mini Trans-Blot Cell*, Bio-Rad). Una vez que ha finalizado la electroforesis, se elimina el gel concentrador y se procede al montaje en un casete para realizar la transferencia, siguiendo las indicaciones del fabricante. El casete se coloca entonces dentro de la cubeta de transferencia, acompañado de un bloque de hielo y un agitador magnético. Se llena la cubeta con tampón de transferencia

y se cierra el circuito. Se aplica un voltaje constante de 100 V durante una hora a 4°C (Figura 8).



Figura 8. Equipo necesario para la realización de la técnica de Western blotting. Compuesto por sistemas de electroforesis y transferencia, y fuente de alimentación con electrodos, entre otros.

Una vez terminada la transferencia, y para confirmar que ésta se ha realizado adecuadamente, se coloca la membrana en un recipiente con colorante Ponceau S durante 1 minuto. Eliminando gradualmente el exceso de colorante mediante sucesivos lavados con agua, se debe distinguir en cada carril el patrón de bandas correspondientes a las diferentes proteínas que contienen las muestras.

D. INMUNODETECCIÓN

REACTIVOS

- Solución de lavado TBST (pH=7,5):
 - Tris 10 mM
 - NaCl 100 mM
 - Tween® 20 0,1 %
- Solución de bloqueo TBST-A:
 - Albúmina bovina sérica 5 g
 - TBST 100 mL

Consiste en la detección de la proteína en estudio en la membrana de nitrocelulosa mediante el empleo de anticuerpos específicos. Para ello, se incuba la membrana con solución de bloqueo al 5% durante 1 hora, con objeto de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Transcurrido este tiempo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico (diluido en solución de bloqueo), dejándolo toda la noche a 4°C con agitación suave.

Posteriormente se lava la membrana (8 lavados de 3 minutos cada uno) con solución de lavado (TBST), para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado. Después, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, y se repite el proceso de lavados con TBST. Por último, se procede al revelado de la membrana mediante una técnica que utiliza quimioluminiscencia, usando *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*. Las imágenes se capturan mediante un sistema de análisis de imágenes quimioluminiscentes (*Amersham Imaging 600*). Para la cuantificación, se analizan las bandas mediante densitometría óptica, utilizando el programa informático Image Studio Lite (versión 5.2).

Como control de carga, se realiza posteriormente en cada membrana la inmunodetección de la proteína GAPDH, que es una proteína expresada de forma constitutiva en todas las membranas analizadas. En la Tabla 1 se indican los anticuerpos utilizados en este TFG y sus correspondientes diluciones.

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	DILUCIÓN ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti-NOX1	Conejo policlonal	1:1.000	Goat Anti-Rabbit	1:2.000
Anti-NOX2	Conejo monoclonal	1:8.000	Goat Anti-Rabbit	1:12.000
Anti-NOX4	Conejo policlonal	1:2.000	Goat Anti-Rabbit	1:2.000
Anti-eNOS	Ratón monoclonal	1:2.000	Goat Anti-Mouse	1:4.000
GAPDH	Ratón monoclonal	1:40.000	Goat Anti-Mouse	1:50.000

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones utilizados en los estudios de Western blotting.

III.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como media \pm error estándar. La comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ha realizado utilizando el test de ANOVA, y en aquellos casos que han mostrado significación estadística, se ha aplicado el test de Tukey, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$. Se ha utilizado el software estadístico GraphPad InStat v3.10.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Al finalizar el periodo de tratamiento de los animales, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de animales en el peso corporal ni en el peso relativo de los globos oculares (Tabla 2).

Parámetro	Control	L-NAME
Peso inicial (g)	261±15	263±4
Peso final (g)	390±18	390±9

Tabla 2. Pesos corporales. Pesos iniciales y finales de ratas controles (Control) y ratas tratadas con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

Como era de esperar, en base a estudios previos llevados a cabo en este laboratorio, se observó un incremento de la presión arterial sistólica (PAS) y de la presión arterial diastólica (PAD) en las ratas tratadas con L-NAME cuando se comparó con los valores recogidos en las ratas normotensas (Figura 9).

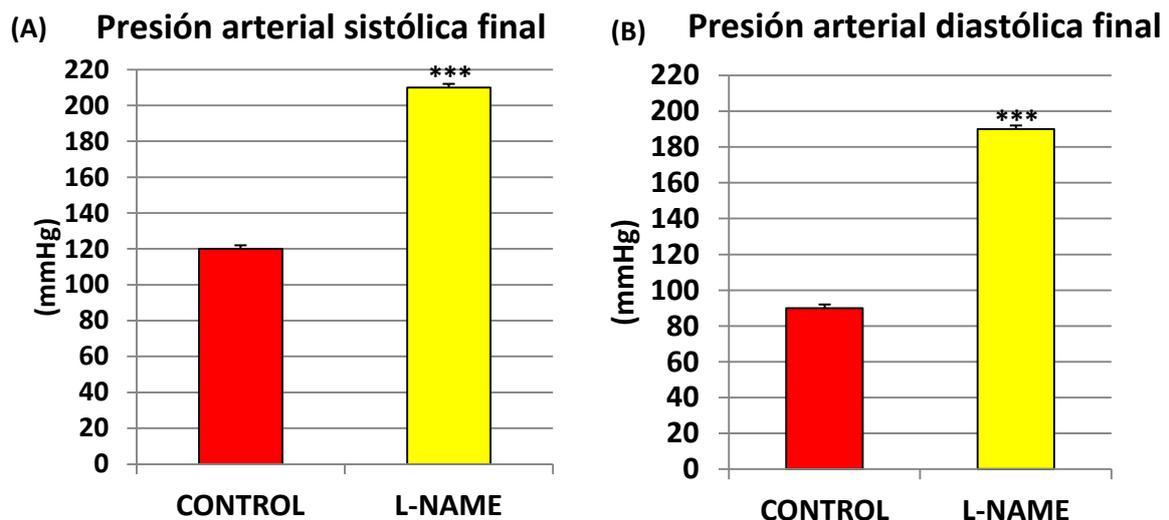


Figura 9. Cifras de presión arterial. (A) Presión arterial sistólica (PAS) y (B) presión arterial diastólica (PAD), de ratas controles (Control) y ratas tratadas con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mmHg), y representan la media de \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con el grupo Control.

Entre los diversos modelos de experimentación animal que se han desarrollado en los últimos años para el estudio de los mecanismos implicados en el origen, desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial (HTA), se encuentra nuestro modelo de tratamiento de animales con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). El L-NAME es un compuesto que produce vasoconstricción gracias a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con la consiguiente disminución en la síntesis de una de las principales sustancias vasodilatadoras del organismo, el óxido nítrico (NO). Por ello, la administración crónica de L-NAME causa

hipertensión persistente, que se asocia a un daño en diferentes órganos (Dornas y cols., 2011), con la participación del sistema renina-angiotensina (SRA) (Cachoeiro y cols., 1996). Por esta razón, las ratas con hipertensión inducida por L-NAME constituyen un buen modelo experimental para el estudio de la fisiopatología y terapéutica de la HTA.

Nuestro estudio no ha encontrado diferencias significativas en cuanto al peso corporal de los animales tras el tratamiento con L-NAME, coincidiendo con lo observado previamente por otros autores (Rodríguez-Gomez y cols., 2003; Gomez-Guzman y cols., 2011; Zambrano y cols., 2013).

En relación a la presión arterial (PA), se observó un aumento en el grupo de ratas tratadas con L-NAME al compararlas con los valores medidos en el grupo de ratas controles, tal como cabría esperar basándonos en la literatura leída previamente y en otras experiencias llevadas a cabo en el seno del grupo de investigación (Zambrano y cols., 2013).

IV.2 ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN EL GLOBO OCULAR

En nuestro estudio, se observó un incremento del 134% en la actividad NADPH oxidasa en los globos oculares de ratas hipertensas con respecto a las ratas controles (Figura 10).

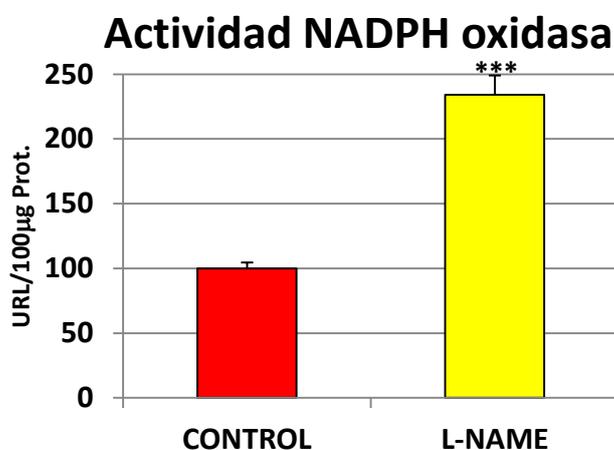


Figura 10. Actividad NADPH oxidasa en globo ocular. Se compara los niveles de actividad NADPH oxidasa entre el grupo control (Control) y el grupo de ratas tratadas con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Todos los valores están expresados en URL (Unidades Relativas de Luz) referidos a 100 μ g de proteínas y representan la media de \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con el grupo Control.

Tal como se mencionó anteriormente, la enzima NADPH oxidasa es la principal fuente de radicales libre en los sistemas cardiovascular y renal. Se conoce su alta relación con la fisiopatología de la HTA, y se ha descrito un incremento de su actividad tanto en pacientes hipertensos (Touyz y Schiffrin, 2001) como en modelos experimentales de hipertensión (Zalba y cols., 2000; Gomez-Guzman y cols., 2011; Zambrano y cols., 2013). Nuestros resultados

coinciden con estudios previos en el seno de nuestro grupo de investigación en otros órganos dianas como el corazón (Gomez-Amores y cols., 2006; Miguel-Carrasco y cols., 2010), el hígado (Gomez-Amores y cols., 2006) y en el riñón de ratas hipertensas (Zambrano y cols., 2013).

A nivel específico de globo ocular, algunos estudios muestran la implicación de la NADPH oxidasa en diferentes patologías oculares, como la inflamación de la red vascular a nivel de retina (Al-Shabrawey y cols., 2008), la angiogénesis patológica en retina (Rojas y cols., 2013) o en coroides (Wang y cols., 2014), o la isquemia retiniana (Al-Shabrawey y cols., 2005), entre otros. A nuestro entender, no existen datos previos a este estudio sobre la medida de la actividad de la NADPH oxidasa en globos oculares completos de ratas, si bien algunos autores han medido la actividad de esta enzima con otros fines en diferentes regiones oculares como la retina (Sicard y cols., 2007), cristalino (Rao y cols., 2004) o células corneales (O'Brien y cols., 2006).

Sicard y cols. (2007) realizaron la medida de la actividad NADPH oxidasa en células retinianas de ratas con hipertensión espontánea, observando un incremento de los niveles de actividad NADPH oxidasa con respecto al grupo control. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, por lo que podemos pensar que la hiperactividad de la enzima en el globo ocular se debe en parte realmente a la presencia de células retinianas en nuestros homogenados. No obstante, podrían estar implicadas células de otras regiones oculares, ya que, como se muestra en los trabajos de Rao y cols. (2004) y O'Brien y cols. (2006), existe una actividad NADPH oxidasa fisiológica en diferentes estructuras oculares.

IV.3 EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS ENZIMAS NADPH OXIDASA Y ENOS

Para complementar el estudio de la actividad NADPH oxidasa en el globo ocular como órgano diana en la patología hipertensiva, se llevó a cabo el análisis mediante *Western blotting* de la expresión proteica de diferentes isoformas de la enzima NADPH oxidasa (NOX1, NOX2 y NOX4), así como de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS). La expresión proteica de todas estas enzimas se vio aumentada en el grupo de ratas hipertensas, observándose aumentos de 3,1 veces en NOX1, 4,9 veces en NOX2, 3,3 veces en NOX4 y 3,6 veces en eNOS, con respecto a los valores correspondientes medidos en el grupo control.

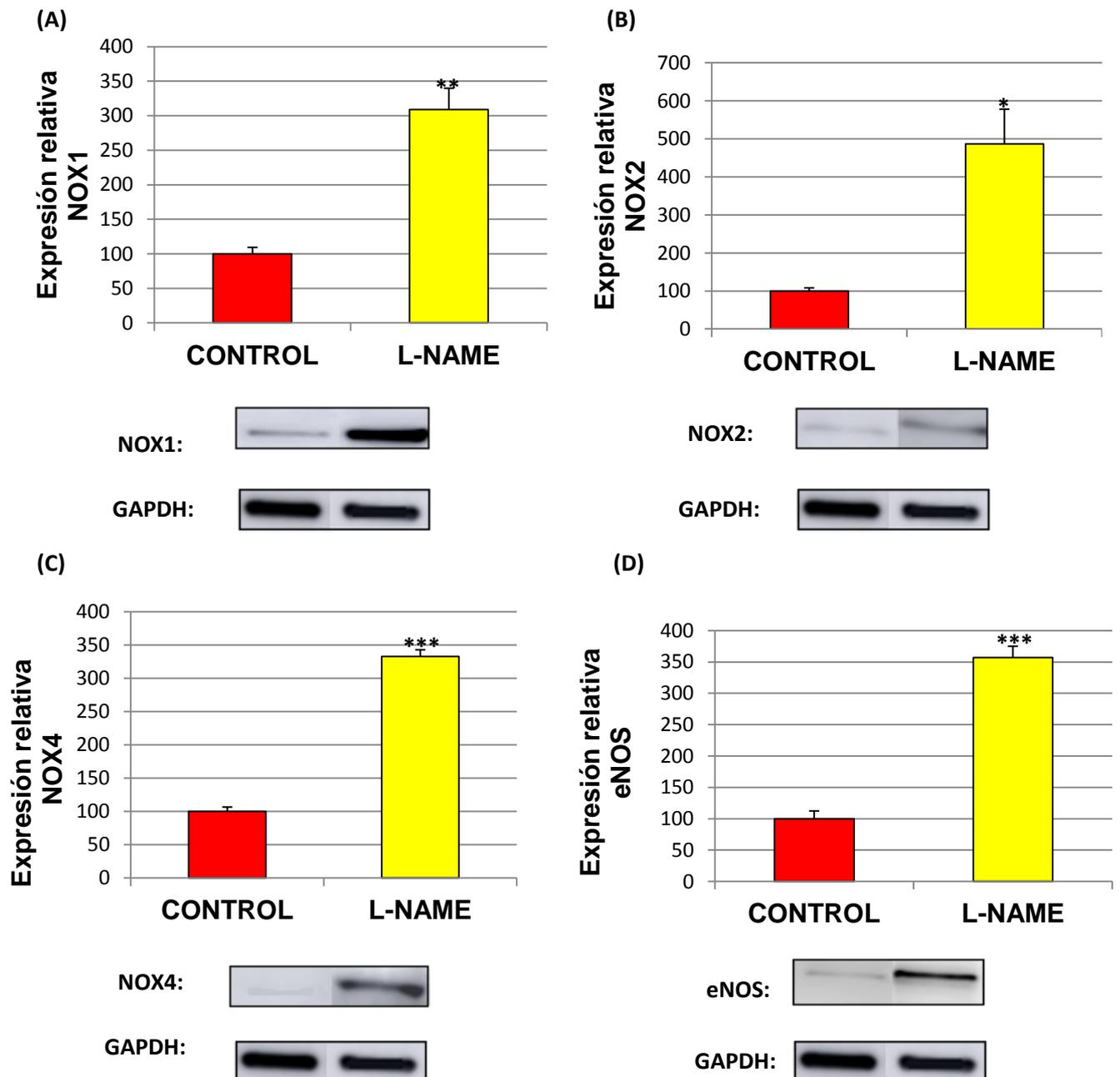


Figura 11. Expresión proteica de las enzimas antioxidantes en el globo ocular. Expresión proteica de (A) NOX1, (B) NOX2, (C) NOX4 y (D) eNOS, respectivamente, en globos oculares de ratas controles (Control) y ratas tratadas con L-NAME (L-NAME). Los valores de (A), (B), (C) y (D) corresponden a la expresión proteica de NOX1, NOX2, NOX4 y eNOS respectivamente. Los valores representan la media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con el grupo Control.

La NADPH oxidasa es un complejo multienzimático que cataliza la producción de anión superóxido, mediante la transferencia de un electrón procedente de una molécula de NADPH hasta el oxígeno molecular. Todas las isoformas de la NADPH oxidasa poseen una serie de propiedades estructurales comunes: sitio de unión a NADPH, sitio de unión a flavina adenina dinucleótido, 6 dominios transmembrana conservados, y 4 histidinas altamente conservadas asociadas a grupos hemo (Bedard y Krause, 2007; Sedeek y cols., 2013). Se trata de una

enzima que interviene en numerosas funciones fisiológicas, entre las que destacan: señalización celular, mediación de efectos hormonales, regulación de la actividad de canales iónicos, sensor de O₂, diferenciación de adipocitos, expresión génica, reproducción, proliferación celular, senescencia, apoptosis y defensa inmunitaria (Jones y cols., 2000; Lambeth, 2004; Sedeek y cols., 2013).

Diferentes estudios han demostrado la existencia de hasta 7 isoformas que componen en la actualidad la familia de las NADPH oxidasas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2 (Taylor-Fishwick, 2013). En nuestro estudio hemos elegido las principales isoformas de la familia con implicaciones cardiovasculares, a saber: NOX1, NOX2 y NOX4. La isoforma NOX3 no está asociada actualmente a ninguna enfermedad cardiovascular (Banfi y cols., 2004); NOX5 no se expresa en roedores (Banfi y cols., 2001; BelAiba y cols., 2007); y DUOX1-2 realizan su papel principal en la biosíntesis de hormonas tiroideas (Sedeek y cols, 2009).

- NOX1 se ha detectado principalmente en células epiteliales de colon, próstata, útero, células endoteliales, fibroblastos adventicios y fibras de músculo liso (Suh y cols., 1999; Ago y cols., 2011). Se localiza en la membrana plasmática, caveolas y endosomas (Lassegue y Griendling, 2010).
- NOX2 fue la primera NADPH oxidasa descrita. Se ha encontrado en células fagocíticas y células no fagocíticas como las vasculares, cardíacas, renales, neuronas, miocitos y hepatocitos. En estos casos, la localización subcelular de NOX2 depende del tipo de célula (Sedeek y cols., 2009).
- NOX4 está abundantemente representada en riñón. Además se expresa en células endoteliales, fibroblastos, osteoclastos, células de la musculatura lisa vascular y cardiomiocitos (Sedeek y cols., 2009; Ago y cols., 2011). Se localiza en la membrana plasmática, en las membranas de vesículas perinucleares y en el retículo endoplásmico (Lassegue y Griendling, 2010; Von Lohneisen y cols., 2010).

En referencia al sistema visual, algunos artículos hablan de la posible evidencia de las isoformas NOX en diferentes situaciones fisiopatológicas en las que se han analizado distintas regiones de la anatomía del globo ocular. Por ejemplo, se ha evidenciado la posible implicación de NOX2 en disfunciones celulares en un modelo de glucolipototoxicidad y diabetes en diferentes células permeables como las células del endotelio de la retina (Kowluru y cols., 2014), o su implicación en la respuesta inflamatoria y de neovascularización ante lesiones

químicas en la córnea (Chan y cols., 2016). También se observó la producción de ROS mediada por NOX1, NOX4 y NOX5 en fibroblastos de células estromales de córneas humanas (O'Brien y cols., 2009), y se ha estudiado el papel de NOX4 en la angiogénesis que se produce en la retinopatía diabética (Li y cols., 2015) o en el retinoblastoma (Singh y cols., 2016).

En la actualidad no está descrito el perfil de expresión proteica de las diferentes isoformas de la enzima NADPH oxidasa a nivel del globo ocular en una situación de hipertensión arterial. Curiosamente, nuestros datos muestran que el ojo es un órgano rico en las principales isoformas de la enzima; además, hemos puesto de manifiesto un claro aumento de su expresión proteica con la hipertensión. Estos resultados concuerdan con otros obtenidos en el seno del grupo de investigación en diferentes órganos, y con los extraídos de la literatura en otras situaciones patológicas, por lo que nos revelan la implicación del estrés oxidativo producido por la hipertensión arterial a nivel ocular a través de la enzima NADPH oxidasa. El exceso de radicales libres, por tanto, representa un posible mecanismo fisiopatológico que favorecería la aparición de diferentes patologías oculares como son las retinopatías, las alteraciones coroides, las cataratas o el glaucoma.

Por otro lado, el óxido nítrico (NO) es uno de los factores clave en los sistemas cardiovascular y renal, ya que se trata de una molécula con alto poder vasodilatador que regula la neurotransmisión, el tono de los vasos sanguíneos, la agregación plaquetaria, la permeabilidad vascular, la eliminación de algunos radicales libres y la interacción leucocitos-endotelio (Moncada, 1999). La síntesis de NO se estimula por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la que se conocen tres isoformas: nNOS (neuronal), iNOS (inducible) y eNOS (endotelial), siendo clave esta última como enzima constitutiva en el sistema cardiovascular (Forstermann y Sessa, 2012).

Una elevación en los niveles de ROS disminuye la biodisponibilidad de NO (Kalinowski y Malinski, 2004), ya que esta molécula puede reaccionar con $\cdot\text{O}_2^-$, generando peroxinitrito (ONOO^-), en una reacción que es más rápida que la eliminación de $\cdot\text{O}_2^-$ por el sistema antioxidante. Además, el ONOO^- tiene una capacidad prooxidante mayor que la del propio O_2^- , por lo que la interacción del NO con las ROS no solo disminuye su biodisponibilidad, sino que favorece la generación de estrés oxidativo (Dikalova y cols., 2010). Es por ello que cabría esperar un aumento de expresión proteica de la enzima NOS en situaciones fisiopatológicas donde aumenta el estrés oxidativo.

En el sistema visual se ha visto que estas isoformas contribuyen a regular la hemodinámica ocular y a la protección de las células endoteliales de los lechos vasculares y de células o fibras nerviosas contra factores patogénicos asociados a glaucoma, isquemia y diabetes mellitus (Toda y Nakanishi-Toda, 2007). Cada una de las isoformas de la NOS tiene importancia a diferentes niveles de la anatomía ocular:

- nNOS se ha encontrado en fotorreceptores, células amacrinas, ganglionares y del epitelio pigmentario de la retina. En la coroides se asocia su presencia con las fibras nerviosas perivasculares, células del músculo liso de las arterias y algunas células del estroma (Neufeld y cols., 2000; Bhutto y cols., 2009).
- eNOS se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina (Bhutto y cols., 2009), en el endotelio coriocapilar y en menor medida en las células endoteliales de grandes vasos coroideos y células del estroma de la coroides (McLeod y cols., 2012).
- iNOS se ha observado en la retina donde aumenta su actividad en situaciones de isquemia (Du y cols., 2016); asimismo, en la úvea se ha descrito un aumento de la expresión de iNOS cuando se produce una uveítis (Goureau y cols., 1995; Chen y cols., 2017).

En nuestro estudio se ha evaluado la expresión proteica de eNOS por ser la isoforma con una mayor implicación en la hipertensión arterial por su relación con el endotelio. Pese a no encontrar literatura previa que relacione la hipertensión arterial con la expresión de eNOS en el globo ocular, el aumento de la expresión proteica de eNOS de nuestro estudio concuerda con experiencias previas llevadas a cabo en otros órganos y con el aumento de la expresión de eNOS en otras situaciones patológicas del globo ocular como la DMAE (Bhutto y cols., 2009) o el glaucoma (Xiang y cols., 2016).

V. CONCLUSIONES

En nuestro estudio experimental del papel del estrés oxidativo en las enfermedades oculares relacionadas con la hipertensión arterial mediante la evaluación de la actividad y expresión proteica de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa, así como de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS), podemos extraer las siguientes conclusiones:

- ❖ La hipertensión arterial produce un aumento del estrés oxidativo local en el globo ocular que podría estar relacionado con mecanismos fisiopatológicos conducentes al desarrollo de enfermedades oculares.

- ❖ Las isoformas NOX1, NOX2 y NOX4 de la enzima NADPH oxidasa, una de las enzimas más importantes en relación al estrés oxidativo en la hipertensión arterial, se encuentran presente en el globo ocular y aumentan su expresión en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas.

- ❖ La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se encuentra sobreexpresada a nivel local en el globo ocular de las ratas hipertensas, lo que resalta la relación entre hipertensión, estrés oxidativo y posible disfunción endotelial asociada. Como continuación de este estudio, sería interesante cuantificar la expresión de la forma activa de la enzima (por ejemplo, fosforilada en el residuo Ser-1177), así como de la isoforma inducible de la enzima (iNOS).

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. *Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system –review and perspective-*. Circ J. 2011; 75(8):1791-1800.
2. Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, Matragoon S, Behzadian MA, Caldwell RW, Caldwell RB. *Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy*. Am J Pathol. 2005; 167(2):599-607.
3. Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, El-Remessy A, Bartoli M, Parpia AK, Liou G, Caldwell RB. *Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(7):3239-44.
4. Bedard K, Krause KH. *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev. 2007; 87(1):245-313.
5. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. *NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear*. J Biol Chem. 2004; 279:46065-72.
6. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N, Krause KH. *A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes*. J Biol Chem. 2001; 276(40):37594-601.
7. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Görlack A. *NOX 5 variants are functionally active in endothelial cells*. Free Radic Biol Med. 2007; 42(4):446-59.
8. Bhutto IA, Baba T, Merges C, McLeod DS, Luty GA. *Low nitric oxide synthases (NOS) in eyes with age-related macular degeneration (AMD)*. Exp Eye Res. 2009.
9. Bradford, M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 1976; 72:248-254.

10. Brownlee M. *The pathophysiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes. 2005; 54:1615-1625.
11. Cachofeiro V, Maeso R, Muñoz-García R, Lahera V. *The potential role of nitric oxide in angiotensin II-receptor blockade*. Blood press Suppl. 1996; 2:29-35.
12. Carneiro A, Andrade JP. *Nutritional and lifestyle interventions for Age-Related Macular Degeneration*. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017; 2017:6469138.
13. Chan EC, Van Wijngaarden P, Chan E, Ngo D, Wang JH, Peshavariya HM, Dusting GJ, Liu GS. *NADPH oxidase 2 plays a role in experimental corneal neovascularization*. Clin Sci (Lond). 2016; 130(9):683-96.
14. Chen CL, Chen JT, Liang CM, Tai MC, Lu DW, Chen YH. *Silibinin treatment prevents endotoxin-induced uveitis in rats in vivo and in vitro*. PLoS One. 2017; 12(4).
15. Dikalova AE, Gongora MC, Harrison DG, Lambeth JD, Dikalov S, Griendling KK. *Upregulation of NOX1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium dependent relaxation via eNOS uncoupling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010; 299(3):H673-9.
16. Dogru M, Wakamatsu T, Kojima T, Matsumoto Y, Kawatika T, Schnider CCO, Tsubota K. *The role of oxidative stress and inflammation in dry eye disease*. Cornea. 2009; 28:S70-S74.
17. Dornas, W.C. SME. *Animal models for the study of arterial hypertension*. J Biosci. 2011; 36(4):731-737.
18. Du R, Wang JL, Wang YL. *Role of RhoA/MERK1/ERK1/2/iNOS signaling in ocular ischemic syndrome*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016; 254(11):2217-2226.
19. Feldmen EL. *Oxidative stress and diabetic retinopathy: a new understanding of an old problem*. J Clin Invest. 2003; 111:431-433.
20. Fernández-Durango R, Fernández-Martínez A, García-Feijoo J, Castillo A, de la Casa JM, García-Bueno B, Pérez-Nievas BG, Fernández-Cruz A, Leza JC. *Expression of nitrotyrosine and*

- oxidative consequences in the trabecular meshwork of patients with primary open-angle glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49:2506-2511.
21. Fernando Arévalo J. *Retinal and choroidal manifestations of selected systemic diseases*. New York: Springer science+Business media; 2013.
 22. Finkel T, Holbrook NJ. *Oxidants, oxidative stress and biology of aging*. Nature. 2000; 408:239-247.
 23. Forstermann U, Sessa WC. *Nitric oxide synthases: Regulation and function*. Eur Heart J. 2012; 33(7):829-37.
 24. Fraser-Bell S, Symes R, Vaze A. *Hypertensive eye disease: a review*. Clin Experiment Ophthalmol. 2017; 45(1):45-53.
 25. Gomez-Amores L, Mate A, Revilla E, Santa-Maria C, Vazquez CM. *Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats*. Life Sci. 2006; 78(17):1945-1952.
 26. Gomez-Guzman M, Jimenez R, Sanchez M. *Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats*. Br J Nutr. 2011; 106(9):1337-1348.
 27. Goureau O, Bellot J, Thillaye B, Courtois Y, de Kozak Y. *Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase*. Journal of immunology. 1995; 154(12):6518–23.
 28. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. *The role of oxidative stress in glaucoma*. Mutat Res. 2006; 612: 105-114.
 29. Jensen SJK. *Oxidative stress and free radicals*. J Mol Struct. 2003; 666-667:387-392.
 30. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. *NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?* Free Radic Biol Med. 2000; 29(5):416-24.

31. Kalinowski L, Malinski T. *Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction*. Acta Biochim Pol. 2004; 51(2):459-469.
32. Kaur A, Gupta V, Christopher AF, Malik MA, Bansal P. *Nutraceuticals in prevention of cataracts – an evidence based approach*. Saudi J Ophthalmol. 2017; 31(1):30-37.
33. Khan SA, Choudhary R, Singh A, Bodakhe SH. *Hypertension potentiates cataractogenesis in rat eye through modulation oxidative stress and electrolyte homeostasis*. J Curr Ophthalmol. 2016; 28:123-130.
34. Konstantinidis L, Guex-Crosier Y. *Hypertension and the eye*. Curr Opin Ophthalmol. 2016; 27:514-521.
35. Kowluru A, Kowluru RA. *Phagocyte-like NADPH oxidase [Nox2] in cellular dysfunction in models of glucolipotoxicity and diabetes*. Biochem Pharmacol. 2014; 88(3):275-83.
36. Kowluru RA, Kanwar M. *Oxidative stress and the development of diabetic retinopathy: Contributory role of matrix metalloproteinase-2*. Free Rad Biol Med. 2009; 46:1677-1685.
37. Lambeth JD. *Nox enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol. 2004; 4(3):181-9.
38. Langman M, Lancashire R, Cheng K, Stewart PM. *Systemic hypertension and glaucoma: mechanisms in common and co-occurrence*. Br J Ophthalmol. 2005; 89:960-963.
39. Lassegue B, Griendling KK. *NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature*. Arteriocler Thromb Vasc boil. 2010; 30(4):653-61.
40. Li J, Wang JJ, Zhang SX. *NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy*. Journal of Diabetes Research. 2015; 13.
41. Lou MF. *Thiol regulation in the lens*. J Ocul Pharmacol Ther. 2000; 16:137–48.

42. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. *European Society of Hypertension - European Society of Cardiology: guidelines for the management of arterial hypertension*. J. Hypertens. 2013; 31:1281.
43. McLeod DS, Baba T, Bhutto IA, Luttly GA. *Co-expression of endothelial and neuronal nitric oxide synthases in the developing vasculatures of the human fetal eyes*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250(6):839-48.
44. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM. *The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension*. Am J Hypertens. 2008; 21 (11):1231-1237.
45. Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M. *Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study*. Br J Ophthalmol. 2003; 87:469-472.
46. Moncada S. *Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine*. J R Soc Med. 1999; 92:164-169.
47. Montezano AC, Touyz RM. *Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician*. The Canadian Journal of Cardiology. 2012; 28:288-295.
48. Neufeld AH, Shareef S, Pena J. *Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina*. J Comp Neurol. 2000; 416:269-275.
49. Oduntant OA, Mashige KP. *A review of the role of oxidative stress in the pathogenesis of eye disease*. South Africa Optometry. 2011; 70(4):191-199.
50. O'Brien WJ, Heimann T, Rizvi F. *NADPH oxidase expression and production of superoxide by human corneal stromal cells*. Mol Vis. 2009; 15:2545-43.

51. O'Brien WJ, Crema C, Heimann T, Zhao H. *Expression of NADPH oxidase in rabbit corneal epithelial and stromal cells in culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47(3):853-63.
52. Rao PV, Maddala R, John F, Zigler JS. *Expresion of nonphagocytic NADPH oxidase system in the ocular lens*. Mol Vis. 2004; 10:112-21.
53. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj AV, Sahana DK, Kumar MNVR. *Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective*. J Controlled Release. 2006; 113:189-207.
54. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D. *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bulletin of the World Health Organization. 2004; 82(11):884-851.
55. Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Atucha NM. *Effects of omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L-NAME plus DOCA-treated rats*. Am J Hypertens. 2003; 16(1):33-38.
56. Rojas M, zhang W, Xu Z, Lemtalsi T, Chandler P, Toque HA, Caldwell RW, Caldwell RB. *Requirement of NOX2 expression in both retina and bone marrow for diabetes-induced retinal vascular injury*. PLoS One. 2013; 17:8(12).
57. Saccà SC, Izzotti A. *Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye*. Prog Brain Res. 2008; 173:385-407.
58. Saleh MA, Clark S, Woodward B, Deolu-Sobogun SA. *Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils*. Ethn Dis. 2010; 20:S178-82.
59. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL. *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe*. J Am Soc Nephrol. 2013; 24(10)1512-8.
60. Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. *Molecular mechanisms of hypertension: role of NOX family NADPH oxidases*. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2009; 18(2):122-7.

61. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. *Oxidative stress in the disease of the cornea*. Free Rad Biol Med. 2008; 45:1047-1055.
62. Sicard P, Acar N, Grégoire S, Lauzier B, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Bretillon L, Vergely C, Rochette L. *Influence of rosuvastatin on the NAD(P)H oxidase activity in the retina and electroretinographic response of spontaneously hypertensive rats*. British Journal of Pharmacology. 2007; 151:979-986.
63. Singh A, Khan SA, Bodakhle SH. *Cinnamaldehyde attenuates cataractogenesis via restoration of hypertension and oxidative stress in fructose-fed hypertensive rats*. J Pharmacopuncture. 2016; 19:137-144.
64. Singh L, Saini N, Pushker N, Sen S, Sharma A, Kashyap S. *Prognostic significance of NADPH oxidase-4 as an indicator of reactive oxygen species stress in human retinoblastoma*. Int J Clin Oncol. 2016; 21(4):651-7.
65. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B. *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. Nature. 1999; 401(6748):79-82.
66. Taylor-Fishwick DA. *NOX, NOX who is there? The contribution of NADPH Oxidase One to beta cell dysfunction*. Front Endocrinol. 2013; 4:40.
67. Toda N, Nakanishi-Toda M. *Nitric oxide: Ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy*. Progress in retinal and eye research. 2007; 26(3):205-238.
68. Toyz RM, Schiffrin EL. *Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: Role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways*. J Hypertens. 2001; 19(7):1245-1254.
69. Von Löhneysen K, Noack D, Wood MR, Friedman JS, Knaus UG. *Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization*. Mol Cell Biol. 2010; 30(4):961-75

70. Wang H, Jiang Y, Shi D, Quilliam LA, Chrzanowska-Wodnicka M, Wittchen ES, Li DY, Hartnett Me. *Activation of Rap1 inhibits NADPH oxidase-dependent ROS generation in retinal pigment epithelium and reduces choroidal neovascularization*. FASEB J. 2014; 28(1):265-74.
71. Wickens AP. *Aging and free radical theory*. Resp Physiol. 2001; 128:397-391.
72. Wilding LA, Uchihashi M, Bergin IL, Nowland MH. *Enucleation for Treating Rodent Ocular Disease*. 2015; 54:328-332.
73. Xiang Y, Dong Y, Li X, Tang X. *Association of common variants in eNOS gene with primary open angle glaucoma: a meta-analysis*. J Ophthalmol. 2016; 1348347.
74. Yu X, Lyu D, Dong X, He J, Yao K. *Hypertension and risk of cataract: a meta-analysis*. Plos one. 2014.
75. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G. *Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension 2000; 35(5):1055-1061.
76. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, Carrasco JLM, Revilla E, Santa-María C, Mate A, Vázquez CM. *The renoprotective effect of L-carnitine in hypertension rats is mediated by modulation of oxidative stress gene expression*. Eur J Nutr. 2013; 52:1649-1659.