

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *El estrés oxidativo generado por etanol, activa una respuesta inflamatoria en el Epitelio Pigmentario de la Retina*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: LORENA VIDAL GIL

TUTOR/A: MARÍA DESAMPARADOS PASCUAL-AHUIR GINER

CO-TUTOR/A: FCO. JAVIER SANCHO PELLUZ

*Curso Académico: 2015-2016*

VALENCIA, 3 De Marzo de 2016



## **Resumen**

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es el tejido implicado en la supervivencia y función de los fotorreceptores y de la coroides. Estudios previos “in vivo” e “in vitro” han demostrado que el estrés oxidativo inducido por consumo de alcohol genera especies reactivas de oxígeno (ROS), activando vías de señalización celular como son la inflamación, muerte celular o autofagia en otros tejidos. En este trabajo se estudiará en condiciones “in vitro” la respuesta de las células ARPE-19, modelo celular de RPE, a la exposición crónica de etanol (EtOH). Para ello se estudiará la viabilidad celular, generación de ROS, expresión génica y proteica de marcadores de estrés oxidativo e inflamación, así como la integridad de las uniones intercelulares (Tight Junctions, TJ).

**Palabra clave:** Etanol, estrés oxidativo, inflamación, tight junctions.

## **Abstract**

The Retinal Pigment Epithelium (RPE) is a tissue involved in the survival and function of photoreceptors and choroid. Previous studies “in vivo” and “in vitro” have shown that oxidative stress is induced by ethanol (EtOH), it generates Reactive Oxygen Species (ROS) activating cellular signalling pathways such as, inflammation, cell death or autophagy in other tissues. We are going to study “in vitro” ARPE-19 cells response, a cellular model of RPE, at the chronic exposure to EtOH. Therefore, cell viability, ROS generation, gene and protein expression of oxidative stress and inflammation markers, and the tight junction (TJ) integrity in these cells will be investigated.

**Key words:** Ethanol, oxidative stress, inflammation, tight junctions.

AUTORA: Lorena Vidal Gil

TUTORA: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

CO-TUTOR: Fco. Javier Sancho Pelluz





**INFORME TUTOR TRABAJO FIN DE MÁSTER** (para cualquiera de las modalidades)

Informe del tutor (per a qualsevol de les modalitats del treball fin de master)

**TUTOR'S REPORT** (for any type of final Master's degree thesis) **CURSO - Curs - Academic year 2015-2016**

**DATOS DEL ALUMNO/A - Dades de l'alumne/a - Student's identification**

Máster (Màster –Master's degree):

Biotecnología Biomédica

Apellidos (Cognoms - Surname(s)): VIDAL GIL

Nombre (Nom – Name): LORENA

DNI (ID card nr.): 45842003 J

Teléfono (Telèfon - Phone nr.): 670799423

Correo electr. (Correu electr. – email):

lorena\_vidal\_gil@outlook.es

**TÍTULO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER - Títol del Treball Fi de Màster - Title of the Final Master's degree thesis**

**El estrés oxidativo generado por etanol activa una respuesta inflamatoria en el Epitelio Pigmentario de la Retina**

Tutor/a (Tutor): MARÍA DESAMPARADOS PASCUAL-AHUIR GINER

Cotutor/a (Co-Tutor): FCO. JAVIER SANCHO PELLUZ

**Considero que el TFM está finalizado y se puede aceptar para la defensa del mismo**

X

*Considere que el TFM està finalitzat i es pot acceptar la defensa d'aquest*

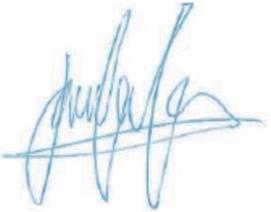
*I consider that the TFM is completed and can accept for the defense*

**Evaluación de la calidad del TFM y la labor del estudiante.**

*Avaluació de la qualitat del TFM i la labor del estudiant.*

*Evaluation of the quality of the Final Master's degree thesis and the work of the student*

Lorena Vidal Gil ha realizado un excelente trabajo de fin de Master. Los objetivos son lógicos y estructurados, la metodología es la adecuada para este tipo de estudio y se apoya sobre una robusta base bibliográfica. Las conclusiones se presentan con rigor y son fieles a los resultados experimentales. En general el estudiante ha realizado un gran esfuerzo que se refleja en la calidad del trabajo.

|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>El tutor/a – Tutor:</p>  <p>Fdo. –<br/>Signed_ Mª Desamparados Pascual-Ahuir Giner_____</p> | <p>El cotutor/a – Co-Tutor:</p>  <p>Fdo. –<br/>Signed Fco. Javier Sancho Pelluz_____</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**FECHA (Data) Date:** \_\_Valencia, 29 de Febrero de 2016\_\_\_\_\_

Universitat Politècnica de València  
Departamento de Biotecnología  
Edificis 3J bajo. Camí de Vera, s/n, 46022 València Tel.  
+34 96 387 74 20 • Fax +34 96 387 74 29  
depbtc@upv.es

**AUTORIZACIÓN DEL COTUTOR PARA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA**

EL(LA) COTUTOR(A):

D./D.ª FRANCISCO JAVIER SANCHO PELLUZ

Adscrito al organismo UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA donde se ha realizado el Trabajo

Fin de Máster titulado:

EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ETANOL ACTIVA UNA  
RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

de la que es AUTOR(A)

D./D.ª LORENA VIDAL GIL

**AUTORIZA(N)** la presentación del TRABAJO FIN DE MÁSTER para su defensa.

Valencia a 29 Febrero 2016  
(lugar, fecha y firma)

EL(LA) COTUTOR(A)



Fdo.: D./D.ª



# ÍNDICE

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### I. INTRODUCCIÓN

|           |                                                                        |       |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.1       | EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES VISUALES.....                        | 1     |
| 1.2       | EL OJO HUMANO                                                          |       |
| 1.2.1     | Estructura anatómica del ojo humano: El globo ocular.....              | 2-3   |
| 1.2.2     | La retina                                                              |       |
| 1.2.2.1   | Estructura y función de la retina.....                                 | 3-4   |
| 1.2.3     | El EPR                                                                 |       |
| 1.2.3.1   | Estructura del EPR.....                                                | 5     |
| 1.2.3.2   | Funciones del EPR                                                      |       |
| 1.2.3.2.1 | Componente de la barrera hematorretiniana.....                         | 6     |
| 1.2.3.2.2 | Transporte de nutrientes, iones y agua: Transporte transepitelial..... | 7     |
| 1.2.3.2.3 | Absorción de luz y protección frente a la fotooxidación.....           | 7-8   |
| 1.2.3.2.4 | Reciclaje del retinal: El ciclo visual.....                            | 8-9   |
| 1.2.3.2.5 | Fagocitosis.....                                                       | 10    |
| 1.2.3.2.6 | Secreción de factores esenciales.....                                  | 10    |
| 1.2.3.3   | Factores de crecimientos derivados del EPR                             |       |
| 1.2.3.3.1 | PEDF.....                                                              | 10-11 |
| 1.2.3.3.2 | VEGF y sus receptores (VEGFRs).....                                    | 11-12 |
| 1.3       | ESTRÉS OXIDATIVO                                                       |       |
| 1.3.1     | Generación de ROS.....                                                 | 12-13 |
| 1.3.2.    | Relación entre inflamación y ROS                                       |       |
| 1.3.2.1   | Liberación de citoquinas.....                                          | 13-14 |
| 1.3.2.2   | Activación de MMPs.....                                                | 15    |
| 1.3.3     | Relación entre hipoxia y ROS.....                                      | 15-16 |
| 1.3.4     | Angiogénesis mediada por ROS                                           |       |
| 1.3.4.1   | Papel del VEGF y VEGFRs.....                                           | 16-18 |

|                                                                        |       |
|------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.3.4.2 Otras vías de activación de la angiogénesis.....               | 18-19 |
| 1.3.5 Alteración de las uniones intercelulares TJs por ROS.....        | 20-21 |
| 1.4 CONSUMO DE ALCOHOL Y DEGENERACIÓN DE LA RETINA.....                | 21-22 |
| 1.5 MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DEL EPR                          |       |
| 1.5.1 ARPE-19 como modelo celular de EPR.....                          | 22-24 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....                                         | 25    |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS                                              |       |
| 3.1 SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO.....                        | 26    |
| 3.2 VIABILIDAD CELULAR.....                                            | 26    |
| 3.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ROS.....                           | 27    |
| 3.4 ARRAY DE ANGIOGENESIS.....                                         | 27-28 |
| 3.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....                        | 28-29 |
| 3.6 DETERMINACIÓN DE MMPS POR ELISA.....                               | 29-30 |
| 3.7 RT-PCR CUANTITATIVA (Q-PCR).....                                   | 30-31 |
| 3.8 INMUNOCITOQUÍMICA.....                                             | 31    |
| 3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                                          | 31    |
| IV. RESULTADOS                                                         |       |
| 4.1 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR Y PRODUCCIÓN DE ROS INTRACELULAR..... | 32-33 |
| 4.2 ESTUDIO DE LOS MARCADORES IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS.....       | 33-36 |
| 4.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE VEGF Y SUS RECEPTORES.....         | 36-37 |
| 4.4 DETERMINACIÓN DE MMPS.....                                         | 38-39 |
| 4.5 ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DE LAS UNIONES INTERCELULARES (TJ).....   | 39-40 |
| V. DISCUSIÓN.....                                                      | 41-48 |
| VI. CONCLUSIONES.....                                                  | 49    |
| VII. BIBLIOGRAFÍA.....                                                 | 50-61 |

## ***Índice de abreviaturas:***

Organización Mundial de la Salud: **OMS**

National Eye Institute: **NEI**

Retinopatía Diabética: **RD**

Degeneración Macular Asociada a la Edad: **DMAE**

Epitelio Pigmentario de la Retina: **EPR**

Segmentos Externos de los Fotorreceptores: **SEF**

Parte Interna de los Receptores: **IRR**

Membrana Externa e Interna: **ME/MIME**

Capa Nuclear Externa de los Fotorreceptores: **CNEF**

Capa Plexiforme Externa: **CPE**

Capa Nuclear Interna: **CNI**

Capa de Células Ganglionares: **CCG**

Capa de Fibras Nerviosas: **CFN**

Barrera Hematorretiniana Externa e Interna: **BHE/BHEI**

Trombospodina: **TSP**

Factor de Crecimiento Vascular Endotelial: **VEGF**

Metaloproteinasas: **MMPs**

Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas: **TIMPs**

Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas: **PDGF**

Plasminógeno tipo Urokinasa: **uPA**

Receptor de uPA: **uPAR**

Proteína Asociada a Latencia: **LAP**

Peroxidasa de rábano: **HRP**

Diacetato Diclorodihidrofluoresceína: **H2DCFDA**

Error Estándar de la Media: **SEM**

Presión Intraocular: **PIO**

Tight Junctions: **TJs**

Especies Reactivas de Oxígeno: **ROS**

Superóxido Dismutasa: **SOD**

Retinol Aciltransferasa: **LRAT**

Citocromo 2E1: **CYP2E1**

Factor de Crecimiento Derivado del Epitelio Pigmentario: **PEDF**

Factor de Crecimiento de Fibroblastos: **FGF**

Factor de Crecimiento Neural: **NGF**

Interleucinas/Interleuquinas: **ILs**

Factores de Necrosis Tumoral  $\alpha$ : **TNF $\alpha$**

RNA mensajero: **RNA<sub>m</sub>**

Receptores de VEGF: **VEGFRs**

Etanol: **EtOH**

Factor Nuclear KB: **NFKB**

Matriz Extra-Celular: **MEC**

Factor de Hipoxia Inducible: **HIF**

Factor de Crecimiento Transformante: **TGF**

Factor de Crecimiento de Hepatocitos: **HGF**

Zónula Occludens: **ZO**

Célula Madre Pluripotente Humana: **hPSCs**

Célula Madre Pluripotente Inducible: **iPSCs**

Tampón fosfato: **PBS**

Ácido Bicarbonato: **BCA**

Albúmina de Suero Bovino: **BSA**



---

# I. INTRODUCCIÓN

---

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES VISUALES

En la actualidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1), alrededor de 285 millones de personas en el mundo presentan disfunciones visuales, de los cuales 39 millones se consideran legalmente ciegos y 246 millones presentan baja visión. Aproximadamente, un 90% de la discapacidad visual mundial se concentra en los países en vías de desarrollo y alrededor del 65% de las personas que padecen una disfunción visual son mayores de 50 años.

Según estudios epidemiológicos realizados por el National Eye Institute (NEI) en el año 2010 (2), existe un claro aumento de las enfermedades visuales. Además, estas disfunciones presentan una mayor incidencia en la población blanca y en el género femenino. Sus estudios retroactivos muestran el aumento de estas enfermedades desde el año 2000 hasta el año 2010 y, sus previsiones relacionadas con el deterioro de la visión estiman que en el año 2050 la población de adultos con trastorno de visión y enfermedades oculares relacionadas con la edad se triplicará (**Figura 1**).

Existe una gran variedad de disfunciones visuales, situándose entre las más comunes las cataratas, la retinopatía diabética (RD), la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y el glaucoma (2). Estas disfunciones se encuentran en constante aumento, ya que con la edad, la función de los tejidos del ojo se ve deteriorada, propiciando un aumento de la incidencia de las enfermedades oculares (3). Además, la gran prevalencia de la diabetes y otras enfermedades crónicas contribuirán a una población creciente de personas que experimenten pérdida de visión (4).

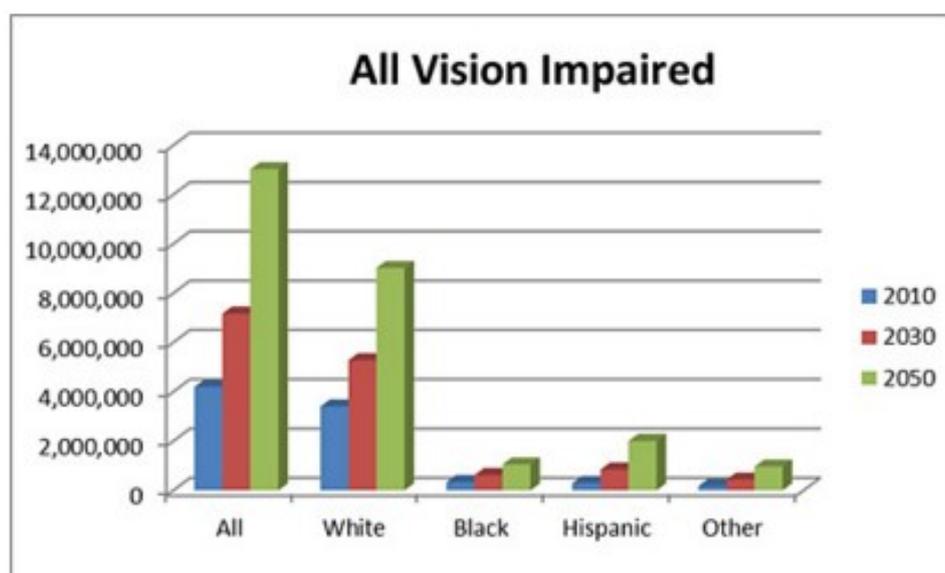


Figura 1: Previsiones del deterioro de la visión (2010-2030-2050) [Tomada de National Eye Institute. 2016]

## 1.2 EL OJO HUMANO

### 1.2.1 Estructura anatómica del ojo humano: El globo ocular

Para entender los procesos que ocurren durante las enfermedades de la retina es necesario conocer la anatomía y fisiología del ojo.

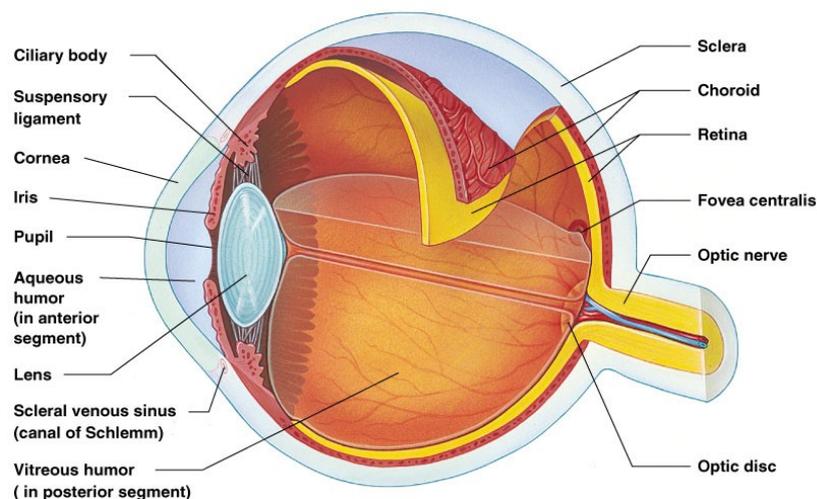
El ojo presenta una estructura muy organizada y compleja con un alto grado de especialización (5). Además, es considerado un órgano inmunológicamente privilegiado (6), ya que ha desarrollado mecanismos moleculares y celulares que limitan la respuesta inmune con la finalidad de preservar la visión. Estas características dificultan el estudio y la comprensión de las alteraciones visuales, así como su posible tratamiento (7).

En un corte lateral del globo ocular se distinguen tres capas: La **túnica externa**, la **túnica media** y la **túnica interna** sensorial.

La **túnica externa** se encuentra formada por colágeno. En ella se localiza la córnea, de mayor curvatura que el resto del globo ocular y a través de la cual entra la luz. La córnea se prolonga hacia atrás con la esclera, un tejido fibroso denso, blanco y opaco, que rodea y protege el globo ocular hasta la salida del nervio óptico.

La **túnica media**, fundamentalmente vascular, es denominada úvea. En ella se diferencian: el iris, situado en la parte anterior; el cuerpo ciliar, en la parte intermedia y, la coroides, en la parte posterior, que se encuentra en contacto con la retina.

La **capa más interna** del ojo es la retina, una extensión del sistema nervioso central que se encuentra conectada al cerebro por el nervio óptico (**Figura 2**) (8,9,10).



**Figura 2: Anatomía general del ojo** [Tomado de Mitchell ENM & Susan J. Marieb, E.N. & S. Mitchell, 2011. Human Anatomy and Physiology Laboratory Manual. 11th. Pearson Benjamin Cummings; 2012]

El interior del ojo está dividido en tres compartimentos:

1. La cámara anterior, entre la córnea y el iris, que contiene el humor acuoso
2. La cámara posterior, entre el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino, que contiene el humor acuoso.
3. La cámara vítrea, entre el cristalino y la retina, que contiene una masa gelatinosa transparente e incolora llamada humor vítreo o cuerpo vítreo.

Además, el ojo rota en su cavidad orbitaria gracias a la acción de seis músculos extrínsecos (9).

## 1.2.2 La retina

### 1.2.2.1 Estructura y función de la retina

Su estructura es muy compleja tanto anatómica como funcionalmente ya que se trata de una prolongación del sistema nervioso central donde comienza el proceso de análisis de la información lumínica (9). Se estima que 80 % de toda la información sensorial en los seres humanos es de origen retinal, lo que indica la importancia de la función de la retina por la capacidad de interactuar con el mundo exterior (11).

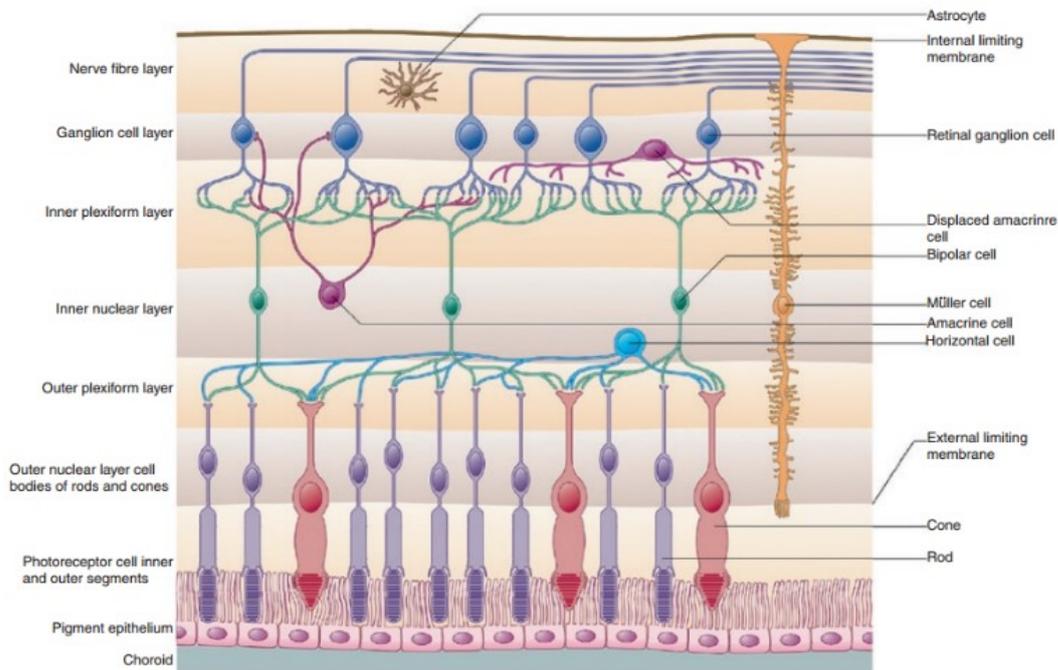
La retina se extiende sobre la superficie interna de la parte posterior del globo ocular hasta el cuerpo ciliar, internamente está en contacto con el cuerpo vítreo y externamente con la coroides (9).

De fuera hacia adentro encontramos: el epitelio pigmentario de la retina (EPR); los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF); la parte interna de los receptores (IR); la membrana externa (ME); la capa nuclear externa de los fotorreceptores (CNEF); la capa plexiforme externa (CPE), donde las células fotorreceptoras realizan la sinapsis con las interneuronas; la capa nuclear interna (CNI), que contiene las células bipolares, amacrinas y horizontales; la capa interna plexiforme, donde las interneuronas realizan la sinapsis con la capa de células ganglionares (CCG); la capa de fibras nerviosas (CFN) y, la membrana interna (MI).

Las capas internas de la retina, desde IR hasta IM son denominadas como retina neural y contienen siete tipos diferentes de neuronas: fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, células amacrinas, células horizontales, células ganglionares de la retina, así como las células de Müller que forman parte de células de la glía, (**Figura 3**) (11, 12).

Su complejidad estructural hace que se puedan diferenciar funcionalmente dos partes: una **interna** y una **externa**. La parte **interna** comprende la capa fotosensible de conos y bastones, y sus conexiones nerviosas que captan luz y la convierten en impulsos nerviosos eléctricos, los cuales son transmitidos mediante el nervio óptico.

La parte **externa** incluye el EPR y su lámina basal denominada membrana de Bruch, ambos mantienen la integridad de la barrera entre la coroides y la retina, también conocida como barrera hematorretiniana externa, (BHE).



**Figura 3: Visión general de la retina neural.** (Tomado de Gray's anatomy)

La coroides se encuentra entre la retina y la esclerótica y constituye la principal fuente de irrigación sanguínea de la mitad externa de la retina (13). Comienza en la región posterior del ojo, donde es más gruesa, y finaliza hacia la porción media en la región llamada cuerpo ciliar (8). Está formada por vasos sanguíneos, melanocitos, fibroblastos, células inmunocompetentes residentes, colágeno y tejido conjuntivo. Su función consiste en el suministro de oxígeno y nutrientes a la retina externa (14).

Además, también es capaz de secretar factores relacionados con angiogénesis, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y moléculas relacionadas con la extravasación y cambios vasomotores. Por otro lado, en ella son sintetizadas muchas metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs), lo que se encuentra relacionado directamente con cambios en la neovascularización (14).

La coroides también presenta otra serie de funciones como: absorción de luz; termorregulación a través de la disipación de calor; ajustes de la posición de la retina, por cambios de espesor de la coroides; modulación de la presión intraocular (PIO) a través de control vasomotor del flujo sanguíneo y, drenaje del humor acuoso de la cámara anterior, a través de la vía uveoescleral (14).

Cambios en la permeabilidad vascular a las proteínas plasmáticas desempeñan un papel en los cambios en el espesor de la coroides (14) y, defectos en la coroides causan cambios degenerativos y neovascularización (8).

### 1.2.3 El EPR

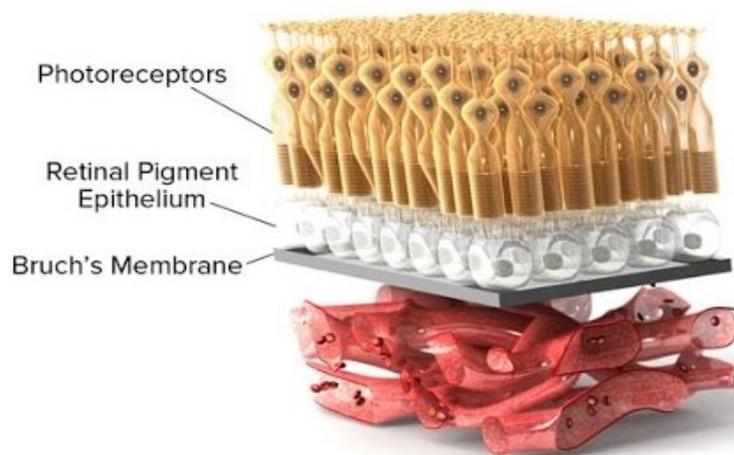
#### 1.2.3.1 Estructura del EPR

El EPR fue descrito en el año 1861 por Rudolf von Kölliker y desde entonces numerosos investigadores han dedicado sus esfuerzos a caracterizar su anatomía y describir su función (15).

Sus células, de origen neuroectodérmico (13) hexagonales y regulares constituyen una única capa de epitelio cuboidal (12). Las tight junction (TJ, uniones intercelulares estrechas) entre células del EPR adyacentes dan lugar a una monocapa de células pigmentadas que forman parte de la BHE (16), una importante barrera fisiológica a la libre circulación de moléculas entre la coroides y los fotorreceptores (11).

El límite interno, también conocido como membrana apical, se interdigita con los SEF. El límite externo o membrana basolateral, se enfrenta a la membrana de Bruch, la cual separa el EPR de los capilares fenestrados de la coroides.

En el lado apical de las células del EPR se extiende microvellosidades largas que hacen contacto directo con los segmentos externos de las células fotorreceptoras. En sus paredes laterales, las células EPR forman las TJ, adherens y gap junctions. En su parte basal, el EPR contacta con la membrana de Bruch subyacente, que separa el EPR de la coroides (**Figura 4**) (12,17).



**Figura 4:** El Epitelio pigmentario de la retina. [Tomada de The Angiogenesis Foundation]

### 1.2.3.2 Funciones del EPR

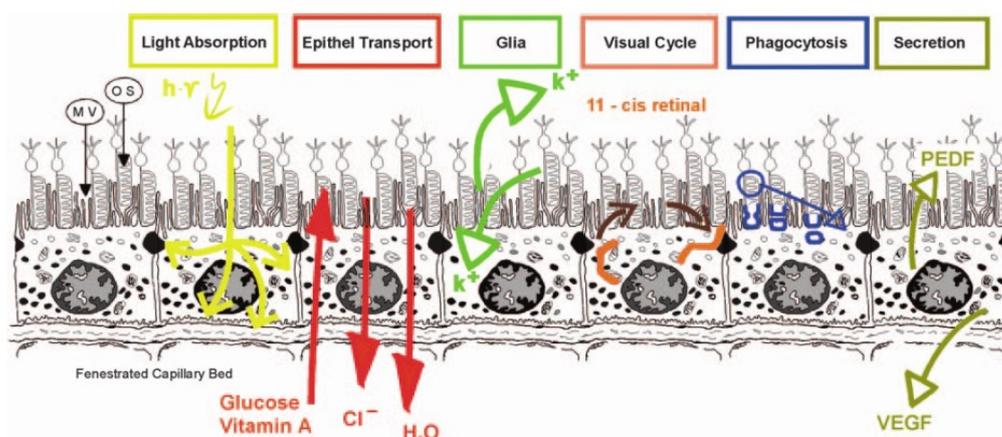
#### 1.2.3.2.1 Componente de la barrera hematorretiniana:

El EPR es uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo humano. Se encuentra directamente implicado en la visión, además la pérdida del EPR da lugar a la atrofia secundaria de los fotorreceptores adyacentes y de la coroides. Alteraciones en cualquiera de sus funciones pueden conducir a la degeneración de la retina y en la disminución de la agudeza visual, pudiendo llegar a la ceguera.

Su función principal es formar parte de la **barrera hematorretiniana, (BH)**. La BH, consiste en una barrera fisiológica restrictiva que regula el paso de iones, proteínas, y el flujo de agua dentro y fuera de la retina. Está compuesta por una parte interna y una parte externa. El EPR y la membrana de Bruch forman la barrera **BHE**, mientras que la barrera hematorretiniana interna (BHI) está constituida principalmente por las células endoteliales (18).

La presencia de TJ entre las células del EPR y del endotelio vascular es esencial para el control estricto del transporte de líquidos y solutos a través de la BH, así como para prevenir la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma en la retina. Por lo tanto, el EPR como componente esta barrera es esencial para la integridad de la retina (13,15), para el correcto mantenimiento de la de una función visual normal.

Además, el EPR estabiliza la concentración de iones en el espacio subretiniano, lo que resulta crucial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores. El EPR libera factores inmunosupresores que otorgan a esa zona la clasificación de espacio inmunoprivilegiado (**Figura 5**) (13,16).



**Figura 5: Resumen de las funciones del EPR.** (Tomada de *Introduction I. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function*. *Physiol Rev*. 2005;845–81)

#### *1.2.3.2.2 Transporte de nutrientes, iones y agua: Transporte transepitelial*

El EPR presenta mecanismos de transporte activo y facilitado de iones y moléculas, lo que permite el equilibrio del entorno extracelular de la retina externa. Los repliegues en la zona basal y apical aumentan la superficie celular del EPR, facilitando el transporte activo (12,16).

Existe un continuo movimiento de fluido entre los compartimentos dentro del ojo, y entre el ojo y la circulación sistémica (19). El transporte a través del EPR es bidireccional: Del espacio subretiniano hacia la coroides, el EPR transporta electrolitos y agua, y de la sangre hacia los fotorreceptores, el EPR transporta glucosa y otros nutrientes (13).

#### **Transporte del espacio subretiniano (de los receptores) hacia la sangre**

En la retina se produce una gran cantidad de agua, debido a la alta actividad metabólica de las neuronas y los fotorreceptores. Por otra parte, la PIO genera un movimiento constante de agua desde el cuerpo vítreo hacia la retina. Estos dos procesos hacen necesaria la constante eliminación de agua de la capa interna de la retina hacia la coroides.

El EPR es capaz de promover el flujo de iones y agua desde el espacio subretinal (situado en el lado apical), hacia la sangre (lado basolateral). Este transporte se realiza gracias a la energía aportada por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . El agua presente dentro de la retina es transportada por las células gliales de Müller, mientras que el agua presente en el espacio subretiniano se elimina a través del EPR. El transporte de productos metabólicos requiere de una eficiente regulación del pH, como es el sistema de transporte del  $\text{HCO}_3^-$  (16).

#### **Transporte de sangre hacia los receptores**

El EPR aporta a los fotorreceptores nutrientes como la glucosa, retinol, ácido ascórbico y ácidos grasos de la sangre. Este transporte es vital para el mantenimiento de una correcta función visual durante el proceso de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (16).

Además, el EPR garantiza el suministro de retinal a los fotorreceptores, necesario para el ciclo visual (13).

#### *1.2.3.2.3 Absorción de luz y protección frente a la fotooxidación*

La retina se encuentra constantemente expuesta a una gran cantidad de luz y de oxígeno (20,21), lo que favorece la fotooxidación (21) y la generación de una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (22).

El EPR es esencial para contrarrestar el estrés oxidativo que ocurre en la retina, y lo hace a través de dos mecanismos. Primero, el EPR absorbe y filtra la luz. Segundo, el EPR produce moléculas antioxidantes (13).

En el EPR encontramos dos pigmentos principales: lipofuscina y melanina. La melanina se encuentra en la cara apical de la célula, mientras que la lipofuscina se encuentra en la zona basal (23).

La lipofuscina se deriva de los segmentos externos de los fotorreceptores que no han sido degradados en los lisosomas de la EPR (21), es un producto no degradable que aumenta con la edad y con el daño celular, por lo que se considera marcador de senilidad y/o enfermedad (24).

La melanina, se encuentra en los melanosomas del EPR y en la coroides, absorbe la luz y elimina los radicales libres ayudando así a prevenir el daño foto-oxidativo a los fotorreceptores y el EPR. Existe una relación inversa entre la melanina y lipofuscina en el ojo humano y, aunque el mecanismo todavía se desconoce, parece que la melanina presentaría un efecto protector frente a la fotooxidación (21).

Como antioxidantes enzimáticos, el EPR contiene altos niveles de peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (13). Como antioxidantes no enzimáticos, el EPR acumula carotenoides, como la luteína y la zeaxantina que conforman los pigmentos amarillos maculares presentes en los axones de los conos. Estos son capaces de absorber la luz azul, protegiendo así a los fotorreceptores y EPR del daño fotooxidativo.

Por otro lado, el EPR también contiene antioxidantes como la vitamina E, la vitamina C y el glutatión que ayudan a minimizar los daños (21).

#### *1.2.3.2.4 Reciclaje del retinal: El ciclo visual*

El ciclo visual es una reacción enzimática secuencial para la vitamina A (todo-trans-retinol) que se produce en la capa externa de la retina, entre los fotorreceptores y el EPR (13), y es esencial para el mantenimiento de la visión (**Figura 6**) (25). Entre las proteínas que median estas reacciones enzimáticas encontramos la lecitina o retinol aciltransferasa (LRAT) y la proteína RPE65, específica del EPR (25).

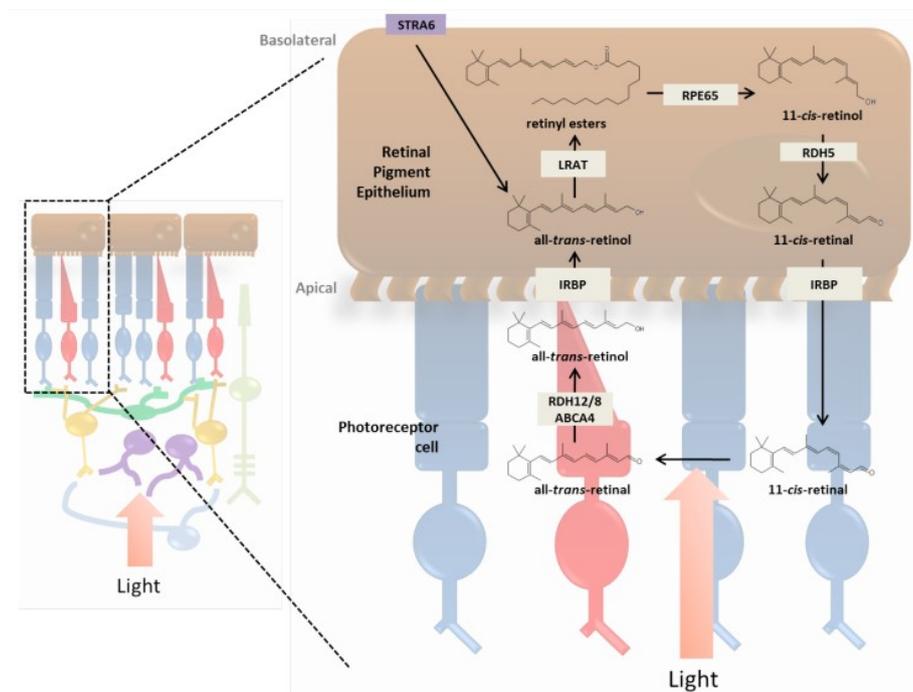
En los vertebrados la retina contiene dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones. Los primeros se encuentran especializados en baja intensidad lumínica, mientras que los segundos funcionan a una alta intensidad visual (25). Su capacidad fotorreceptora se debe a su contenido en **rodopsina** (en el caso de los bastones), una proteína transmembrana que consta de una parte proteica, la **opsina** y una no proteica derivado de la vitamina A como es el **11-cis retinal**. La opsina es un pigmento visual sensible a la luz que se encuentra unido covalentemente al cromóforo 11-cis retinal (16).

La fototransducción (conversión de un estímulo luminoso a impulso nervioso) se inicia con la absorción de los fotones por la rodopsina. La absorción de la luz cambia la conformación de 11-cis-retinal en todo-trans-retinal.

Este se metaboliza en trans-retinol y es transportado al EPR, a través de la circulación coroidal o por los segmentos externos de los fotorreceptores (25). En el EPR, el retinol es isomerizado por medio de la cis-trans isomerasa en 11-cis-retinal y vuelve de nuevo a los fotorreceptores (16).

Para el transporte de retinoides entre los compartimentos celulares y la solubilización del retinal y retinol es indispensable la proteína de unión a interfotorreceptores retinoides (IRBP) (16).

Como se puede observar, existe una estrecha interdependencia entre los fotorreceptores, el EPR y la coroides que los alimenta, por lo que en la disfunción cualquiera de estos componentes puede causar disfunción secundaria en los otros (23).



**Figura 6: El ciclo visual:** La absorción de luz por los pigmentos visuales provoca la isomerización del 11-cis retinal a todo-trans-retinal, lo que resulta en la fototransducción. El todo-trans-retinal se libera hacia el citosol por el transportador unido a ATP específico de fotorreceptores (ABCA4) y es reducido a todo-trans-retinol por enzimas deshidrogenasas (RDH8 y RDH12). Este último entra difunde al EPR a través de la membrana basolateral celular, por el receptor STRA6 donde es esterificado por la lecitina (LRAT) a ésteres todo-trans-retinol, que son almacenados en los retinosomas. Estos ésteres son isomerizados a 11-cis-retinol en una reacción mediada por la proteína específica de ERP de 65kDa (RPE65). El ciclo se completa por la oxidación del 11-cis-retinol a 11-cis retinal, mediado por la enzima retinol deshidrogenasa 5 (RDH5), que difunde de nuevo hacia los receptores y se combina con la opsina, regenerando los pigmentos visuales. [Imagen modificada de Perusek L, Maeda T. *Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases*. 2013; 2646–66].

#### 1.2.3.2.5 Fagocitosis

Otra función del EPR es la fagocitosis de los discos membranosos de los SEF. Se trata de un mecanismo de renovación, desde la base de los mismos, esencial para el adecuado funcionamiento y estructura proteica del retinal y las membranas celulares. A través del desprendimiento coordinado de dichos segmentos y la formación de nuevas extremidades, los segmentos externos mantienen una longitud constante. Las extremidades desprendidas de los segmentos externos son fagocitados por el EPR, el cual los digiere y entrega de vuelta a los fotorreceptores moléculas esenciales, tales como el ácido docosahexaenoico y el retinal (13).

#### 1.2.3.2.6 Secreción de factores esenciales

Se sabe que el EPR produce y secreta una variedad de factores de crecimiento, así como factores esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de la retina y la coroides, favoreciendo la supervivencia de los fotorreceptores y garantizando una estructura básica para la circulación óptima y suministro de nutrientes.

El EPR es capaz de secretar el factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF), VEGF, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5), el factor de crecimiento transformante- $\beta$ , el factor de crecimiento insulínico tipo I, el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro, la neurotropina-3, el factor neurotrófico ciliar, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento derivado del epitelio de la lente, varios miembros de la familia de las interleucinas (ILs), quimiocinas, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), factores estimulantes de colonias, y diferentes tipos de TIMPs (13).

PEDF y VEGF son considerados los factores más significativos liberados por el EPR (13) y, tanto ellos como sus receptores se encuentran directamente relacionados con procesos angiogénicos, por lo que serán tratados ampliamente a continuación.

### 1.2.3.3 Factores de crecimientos derivados del EPR

#### 1.2.3.3.1 PEDF

El PEDF es un miembro multifuncional perteneciente a la superfamilia de las serpinas (proteínas inhibidoras de serinproteasas). En el año 1999, Dawson y colaboradores identificaron el PEDF como un potente factor antiangiogénico endógeno. El PEDF es una glicoproteína altamente conservada en mamíferos y contiene un centro activo. Su función ha sido ampliamente estudiada, ya que juega un importante papel en procesos fisiológicos incluyendo neuroprotección, angiogénesis, fibrogénesis e inflamación (26).

El PEDF es codificado por el RNA mensajero (RNAm) SERPINF1 y se encuentra expresado en gran variedad de órganos, incluyendo el hígado, tejido adiposo, ojo, corazón, riñón, ovario, testículo, bazo, músculo esquelético, cerebro y hueso. Esta proteína juega un papel fundamental en la organogénesis y el mantenimiento homeostático en órganos y tejidos adultos, así como en el desarrollo embrionario y, defectos o una expresión deficiente se encuentran asociados a enfermedades angiogénicas (26). Además, PEDF disminuye con la edad, por lo que se encuentra considerado como un marcador de células jóvenes (27).

En retinas de humanos adultos, el PEDF se encuentra localizado en los fotorreceptores, la CNI, la CCG, la CPI, la coroides, la córnea endotelial y epitelial, el cuerpo ciliar, el musculo y las células del EPR (26).

Como ya se ha indicado, en el ojo sano, el EPR secreta PEDF por la zona apical (28), contribuyendo en el mantenimiento de la retina y la estructura de coroides de dos maneras: actúa como un factor neuroprotector y como un factor antiangiogénico (13)

#### *1.2.3.3.2 VEGF y sus receptores (VEGFRs)*

VEGF fue descrito originalmente como un factor angiogénico y un factor de vasopermeabilidad (29). En condiciones fisiológicas, el EPR secreta bajas concentraciones de VEGF (13) y ha sido demostrado que actúa no solo como factor de supervivencia de células endoteliales, sino también en otros tipos celulares como los fotorreceptores y las células de Müller (29).

La familia de VEGF es considerada uno de los más potentes moduladores de la biología vascular, tanto durante la embriogénesis como en la edad adulta (30).

Se han encontrado y descrito diferentes tipos de VEGF entre ellas destacan VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C (31). Entre estos, el factor más estudiado, y al que a menudo nos referimos como VEGF es VEGF-A. Diferencias en el splicing del pre-RNAm dan lugar a diferentes isoformas entre las que destaca la isoforma VEGF-A<sub>165</sub> (34,35,36).

Las señales de VEGF “corriente abajo” del endotelio vascular se producen mediante la unión a 3 receptores de tirosina quinasa. Estos son el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGFR1, también conocido como FLT-1) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2, también conocido como KDR/Flk-1) (32) y, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3 (VEGFR3) (30).

En el ojo, la quiescencia endotelial y la función de la BH dependen del balance entre el PEDF y el VEGF (29). La integridad de la BH es modulada por VEGF que presenta su receptor VEGFR2 orientado en la zona apical (29).

En el ojo sano, el PEDF se secreta en el lado apical del EPR, mientras que la secreción del VEGF se lleva a cabo en el lado basolateral. Por lo tanto, el PEDF actúa sobre los fotorreceptores mientras que la mayoría del VEGF secretado actúa sobre el endotelio de la coroides (13).

La angiogénesis, se produce a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Este proceso ocurre de manera natural durante el crecimiento y la reparación de tejidos, proporcionando un flujo sanguíneo constante de gases y nutrientes necesarios, así como la eliminación de productos de desecho (33). Estudios previos han demostrado que con la edad el EPR comienza a perder su capacidad metabólica y, los factores de estrés como la luz, la hipoxia y la inflamación hacen que la barrera del EPR se vea comprometida. Además, estos factores de estrés dan lugar a un aumento de los factores angiogénicos (34).

Se ha descrito que la sobreproducción de VEGF juega un papel esencial en el desarrollo de la RD y DMAE proliferativas (14, 35, 36, 37, 38, 39, 40) y que tanto el VEGF como las citocinas proinflamatorias participan en el desarrollo de la DMAE.

Además, el equilibrio entre factores proangiogénicos (VEGF) y antiangiogénicos (PEDF) resulta de suma importancia en el desarrollo de la RD (13).

## 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

### 1.3.1 Generación de ROS

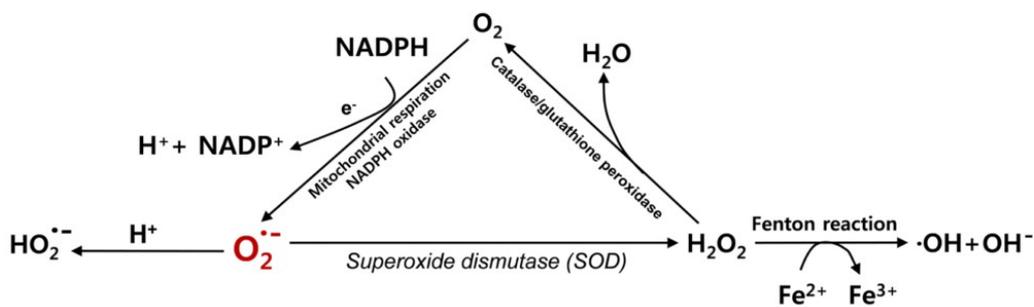
El estrés oxidativo es inducido por el desequilibrio en los estados redox celulares. Estos son producidos por una excesiva generación de ROS o por disfunción en el sistema antioxidante (41). Esto fue definido por Sies y colaboradores como “una disrupción en el balance pro-oxidante/antioxidante en favor del primero, produciendo un daño potencial” (42). En otras palabras, el estrés oxidativo se produce cuando el exceso de radicales libres excede la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo para detoxificarlo (12).

En la mayoría de las células, la mitocondria es la fuente principal de producción de ROS. La cadena de transporte electrónico mitocondrial se encuentra formada por 5 complejos enzimáticos, que a su vez se encuentran formados por distintas subunidades. El complejo I es denominado NADH deshidrogenasa; el complejo II es el succinato deshidrogenasa; el complejo III se encuentra formado por la coenzima-Q-citocromo-c reductasa; el citocromo C oxidasa forma el complejo IV y, por último, el complejo V se encuentra formado por la ATP sintasa. Debemos indicar que la capacidad de estas enzimas para generar ROS puede verse modificada en función del órgano o en presencia de una enfermedad.

El complejo I es en primera instancia el principal productor de ROS. Otra serie de enzimas antioxidantes se encuentran acopladas a este proceso, como la SOD, la catalasa, la glutatión peroxidasa y las ferroxiredoxinas (**Figura 7**) (41).

Como se ha comentado, el ojo es uno de los tejidos metabólicamente más activos y se encuentra expuesto a altos niveles de luz y de oxigenación. Estas características, favorecen la producción de ROS en el EPR y la retina neural. La excesiva acumulación de esta especie contribuye a la patogénesis retinal (22), dando lugar a procesos de peroxidación lipídica (43), oxidación proteica y daño en el DNA. Estos efectos se encuentran relacionados a su vez con el daño mitocondrial que puede resultar en apoptosis o necrosis celular (12)

Se ha demostrado, que cambios en el entorno extracelular de los tejidos, como el aumento de glucosa (44), etanol (EtOH) (43), luz (45), radiación ionizante (46), el tabaco (47) o la reducción de la actividad enzimática por la edad (22) dan lugar a estrés oxidativo, estimulando la producción de ROS. La acumulación excesiva de ROS se encuentra relacionada con una disminución en la producción de enzimas antioxidantes (22). La formación de ROS también parece encontrarse relacionada con procesos de hipoxia (48), isquemia (49), presencia de EtOH (50), reorganización de actina (51) y migración celular (43). Por otro lado, se ha observado que el inicio de actividad angiogénica mediado por células inflamatorias también parece estar relacionado con la producción de ROS (46).



**Figura 7: Producción de ROS.** El superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se genera a partir  $O_2$  como un subproducto de la cadena respiratoria en las mitocondrias o por NADPH oxidasa. La SOD, el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) puede ser transformado en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que puede transformarse en radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y aniones hidroxilo ( $OH^-$ ).

### 1.3.2. Relación entre inflamación y ROS

La inflamación es una respuesta adaptativa que se desencadena por estímulos nocivos y condiciones, tales como la infección y el daño tisular. La inflamación crónica sistémica se produce en una amplia variedad de enfermedades, incluyendo la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, esta inflamación parece no estar causada por los instigadores clásicos de inflamación (lesiones e infecciones), sino con el desequilibrio homeostático de uno o varios sistemas fisiológicos que no están directamente relacionados con la defensa del huésped o con un tejido de reparación (52).

La cascada inflamatoria es considerada una compleja red inmunológica, fisiológica y de comportamiento en la que los eventos producidos son coordinados por citoquinas, las moléculas de señalización inmune (53).

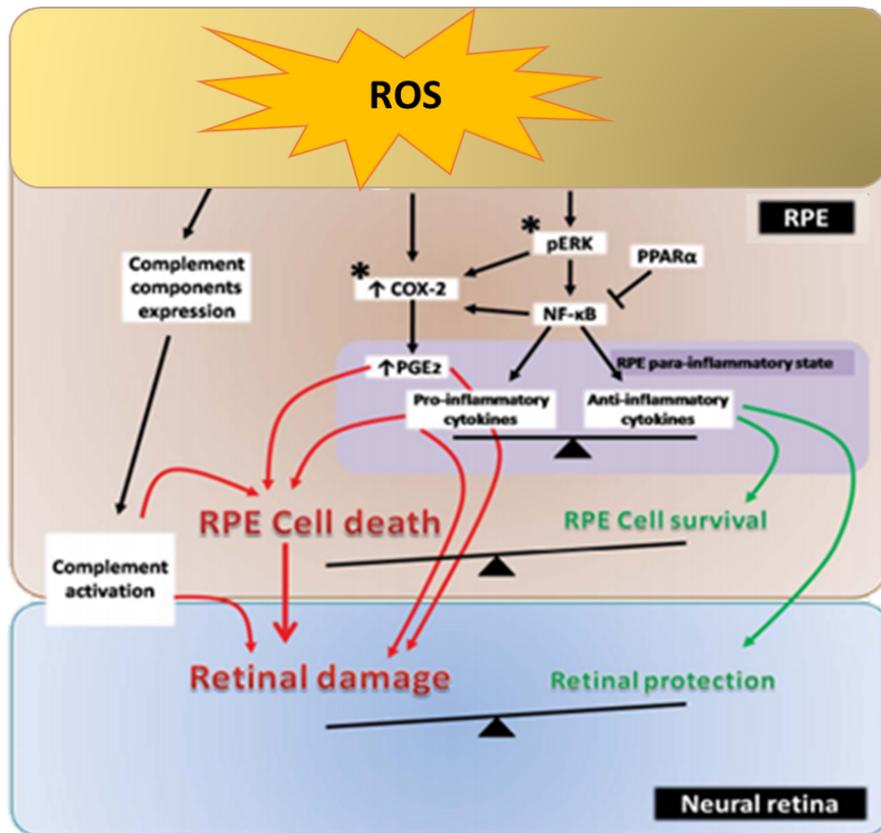
#### 1.3.2.1 Liberación de citoquinas

Como hemos indicado, la inflamación forma parte de la respuesta inmunitaria. Está iniciada por la liberación de citoquinas y quimioquinas por las células del sistema inmune con el fin de reclutar a otras células al lugar donde se ha producido el daño (54). Existen citoquinas

proinflamatorias como son las ILs 1, 2, 6, y 8 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) junto con el TNF- $\alpha$  y antiinflamatorias como la IL-10 y en determinadas situaciones IL-6. Las primeras citoquinas de la cascada inflamatoria son TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  que estimularán la producción de IL-6 (55).

La producción de ROS es esencial para la progresión de un proceso inflamatorio, este ROS es producido por las mismas células anteriormente mencionadas implicadas en llevar a cabo la respuesta inmune. Por tanto, podemos decir que el ROS generado actúa como molécula señalizadora y como mediador de la inflamación (55). Además, pueden actuar como segundos mensajeros modulando factores de transcripción en una variedad de vías de señalización inflamatoria incluyendo quinasas (MAPK), el factor nuclear kB (NF-kB), y la vía de señalización JAK-STAT en diferentes tipos celulares (56).

Existen trabajos que relacionan la producción de radicales libres en la retina, concretamente en el EPR, con los procesos inflamatorios y la liberación de VEGF. Esto ha sido estudiado en enfermedades como la RD y la DMAE (**Figura 8**) (52, 53, 54).



**Figura 8: Respuesta en células EPR inducida por ROS.** [Modificada de Mateos M V et al. *Ophthalmology and Clinical Research Inflammation and Oxidative Stress in Retinal Diseases: The Role of Intracellular Signaling in the Retinal Pigment Epithelium*. ClinMed. 2015]

### 1.3.2.2 Activación de MMPs

La matriz extracelular (MEC) está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina) (60). Tal variedad de componentes se encuentran interconectados y requieren una familia de proteasas denominadas MMPs de la MEC, que se encuentran implicadas tanto en procesos fisiológicos como patológicos e intervienen en la rotura de la MEC. Las MMP constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de zinc (60) capaces de degradar de forma bastante selectiva los componentes de la membrana basal y de la MEC. Entre sus funciones se encuentran las de participar en los procesos de neoformación vascular y la eliminación de tales restos celulares; igualmente, tienen un papel muy destacado en los procesos degenerativos y en los tumores (61).

Se han descrito 25 miembros de la familia MMP, que se clasifican en cuatro subfamilias (60):

- 1) Colagenasas (MMP-1, 8 y 13) que hidrolizan el colágeno intersticial.
- 2) Gelatinasas (MMP-2 y 9) que hidrolizan el colágeno desnaturalizado y algunas proteínas no fibrilares.
- 3) La familia de la estromelisinina (MMP-3, 7, 10, 11 y 12).
- 4) Las MMPs unidas a membranas (MMP-14, 15, 16 y 17).

Se ha observado la presencia de MMPs, concretamente MMP-1, MMP-3 y MMP-9, en la matriz situada entre los fotorreceptores; posteriormente se confirmó que la presencia de la MMP-2 aumenta tras la exposición a la luz. La participación de estas proteasas en los procesos fototóxicos (61)

Los inhibidores tisulares endógenos de las MMP, TIMPs reducen la degradación proteolítica excesiva de la MEC. Son proteasas extracelulares requeridas en numerosos procesos relacionados con el desarrollo, la regeneración y la enfermedad. La degradación de la MEC es crucial para el crecimiento tumoral maligno, invasión, metástasis y angiogénesis (60).

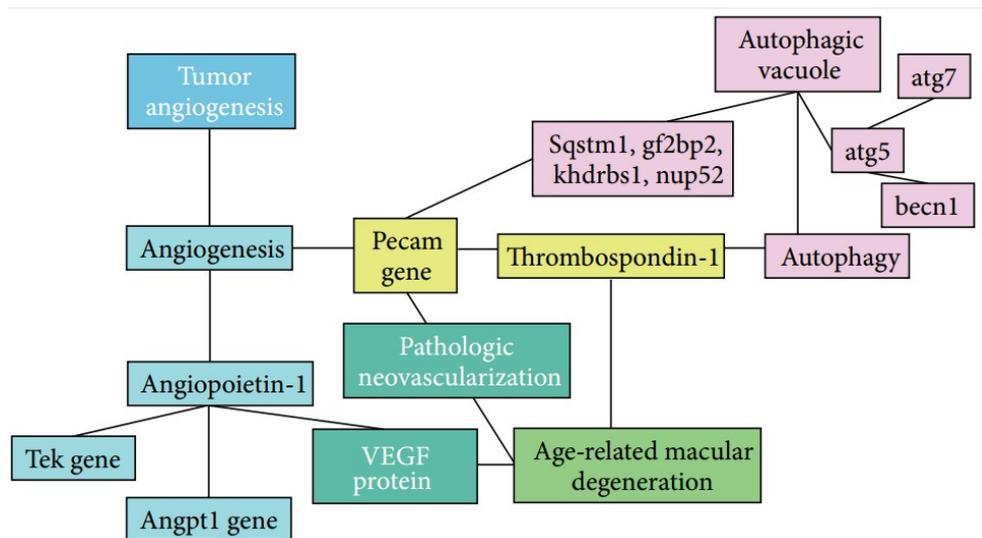
### 1.3.3 Relación entre hipoxia y ROS

La hipoxia se define como el umbral donde la concentración de oxígeno es limitante para los procesos celulares normales. Esto es debido a que el oxígeno es un factor esencial en los procesos metabólicos incluyendo la producción de ATP (energía). Un suplemento inadecuado de oxígeno cambiaría el estado metabólico, así como muchas otras funciones importantes en las células afectadas.

La exposición a hipoxia también puede inducir modificaciones en los niveles de especies reactivas de oxígeno en el organismo, generando un aumento de ROS (62).

Se ha observado que el factor de hipoxia inducible (HIF-1) se encuentra estrechamente relacionado con el VEGF y este, a su vez con distintos factores de crecimiento, oncogenes activados (por ejemplo, Ras) así como a distintas citoquinas (IL-1- $\alpha$  y IL-6), p53 mutado, estrógenos y óxido nítrico (NO) (14).

Al igual que ocurre con los procesos inflamatorios, se ha demostrado que existe un aumento de marcadores de hipoxia en muchas de las enfermedades de la retina que finalmente desencadenan procesos angiogénicos (**Figura 9**) (58, 59).



**Figura 9: EpiphaNet mapa interactivo para la angiogénesis, la autofagia, y relacionada con la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)** [Tomada de Blasiak J, Petrovski G, Ver-b Z, Facs-k- A, Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. Biomed Res Int. 2014;2014]

### 1.3.4 Angiogénesis mediada por ROS

La generación de ROS juega un papel crítico en el desarrollo de la angiogénesis. Bajos niveles de ROS en respuesta a diferentes estímulos propicia el inicio de la angiogénesis, pero el ROS generado también es capaz de actuar como segundo mensajero en vías de señalización antiangiogénicas. Esto genera un conflicto a la hora de describir los factores angiogénicos y antiangiogénicos, ya que la dosis de ROS y el tiempo de exposición así como los procesos redox celulares son críticos para determinar la respuesta celular.

Por otra parte, esta producción de ROS no solo parece estar implicada en el inicio de la angiogénesis, sino que también presentaría un papel crucial en el desencadenamiento de señales intracelulares durante esta (46).

#### 1.3.4.1 Papel del VEGF y VEGFRs

Hasta el momento se han identificado 4 receptores diferentes a los que se pueden unir los miembros de la familia de VEGF. Tres de ellos, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 son receptores del tipo tirosina quinasa y, el cuarto, neuropilina-1 (NP1), es una proteína transmembrana sin actividad tirosina quinasa.

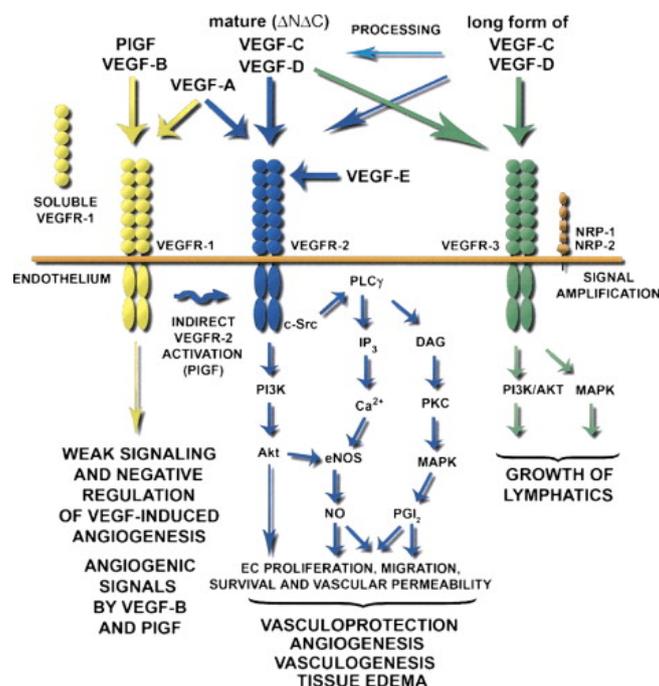
Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 son proteínas de membrana con siete dominios de similitud a inmunoglobulina en su parte extracelular, una única región transmembrana hidrofóbica y una secuencia consenso tirosina quinasa en su parte citoplasmática, que a su vez presenta la inserción de un dominio sin actividad catalítica.

Hay evidencias que apuntan a que la principal función del receptor VEGFR1 en el adulto es la de ser un regulador negativo de VEGFR2. Sin embargo, se ha observado que VEGFR1 es capaz de transmitir señales en respuesta a VEGF.

La mayoría de respuestas biológicas de VEGF tienen lugar tras la unión a VEGFR2. Al unirse, este receptor dimeriza y se activa mediante transfosforilación de los residuos situados en el dominio citoplasmático cinasa. Tras su activación se asocia a diferentes proteínas con dominios SH2, como son Grb2, Nck, Shc y las proteínas fosfatasa SHP1 y SHP2 (65). VEGF estimula la producción de superóxidos vía Rac-1, dependiente de la activación del NADPH oxidasa cuando el VEGF se une a VEGFR2.

El ROS producido por la NADPH oxigenasa inactiva las proteínas tirosina quinasas fosfatasas, que regulan negativamente VEGFR2. Se produce la autofosforilación de VEGFR2 y la señalización de VEGF da lugar a la proliferación y migración de células endoteliales. En primer lugar, VEGF induce la expresión del manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) vía NADPH oxidasa.

La sobreexpresión de MnSOD aumenta el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, que activa la quinasa-3-fosfatidilinositol (PI3K), activando señales “downstream”, incluyendo Akt. Además, también se activan otras vías de señalización de cascada como las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas), (**Figura 10**) (31, 41).



**Figura 10: Familia de los miembros de VEGF y los receptores de tirosinquinasa en el endotelio y la activación de las cascadas de señalización.** VEGFR2 y VEGFR3 son considerados los mayores reguladores de la formación de vasos sanguíneos y linfáticos bajo el efecto de VEGF. VEGFR1 parece mediar acciones específicas de unión a ligando, existiendo además como un receptor soluble que activa como regulador negativo de la angiogénesis. Quizá, la activación de VEGFR1 por PIGF y VEGFB estimula el crecimiento vascular. Además, VEGFR1 media la quimiotaxis de monocitos. VEGF-C y VEGF-E son procesados proteolíticamente a sus formas maduras, lo que permite su unión a VEGFR2. DAG: diacilglicerol; Enos: oxidonitrico sintetasa; EPC: Precursor endotelial celular; IP3: Inositol trifosfato; MAPK: Proteinkinasa activada por mitógeno; NO: Óxido nítrico; NPR: Neurofilina; PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina; PKC: Proteinkinasa C; PLC: fosfolipasa gamma. [Y. Hertzuala et al. *Vascular Endothelial Growth Factors. Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine.* J Am Coll Cardiol. 2007;49(10):1015–26.]

#### 1.3.4.2 Otras vías de activación de la angiogénesis:

Como ya se ha comentado en los apartados anteriores, tanto la **hipoxia** y como la **inflamación** dan lugar a la activación de procesos angiogénicos (49, 50, 51, 53, 57) .

Además del VEGF, existen distintas moléculas implicadas en la regulación de la angiogénesis, incluyendo al factor ácido de crecimiento de fibroblastos (FGFa), FGF básico (FGFb), factor de crecimiento transformante alfa y β (TGF-α y TGF-β), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), TNF-α, angiogenina, IL-8 y las angiopietinas (Ang-1 y -2) (8), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF derivado de la glándula endócrina (EG-VEGF), leptina, las prostaglandinas, lípidos, entre otros, algunos de ellos como el TGF-α y FGFb, actuando al menos en parte, regulando la expresión del VEGF, (**Figura 11**) (41, 61).

Existen alrededor de 19 miembros de la familia FGF (67) que participan en diferentes procesos como inflamación, reparación y regeneración. FGR-2, comúnmente conocido como FGFb, se encuentra implicado en el reclutamiento de células inflamatorias en la cicatrización de heridas. Además, las señales generadas por FGF-2 pueden estar implicadas en la migración celular endotelial. También, dentro de esta familia encontramos el factor de crecimiento de queratinocitos o FGF-7 que contribuye a la regeneración epitelial (68).

El **HGF**, es otro de los factores de crecimiento relacionado con actividad antiinflamatoria en órganos dañados. Por ejemplo, es capaz de atenuar la respuesta renal inflamatoria y proteger el hígado y los pulmones de los daños provocados por procesos inflamatorios (69).

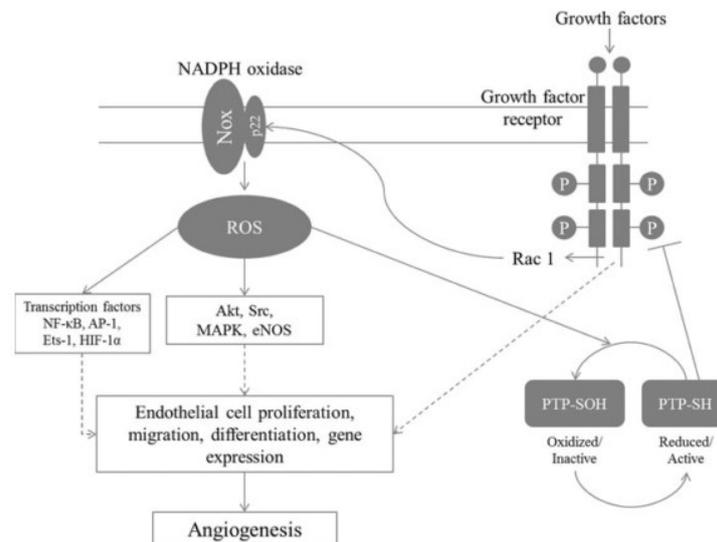
El **TGF-β** presenta tres isoformas, que se encuentran implicadas en procesos fisiológicos como el desarrollo embrológico, el control de la inmunidad y el mantenimiento de la homeostasis epitelial (70). Para su activación se requiere la participación de la **proteína asociada a latencia (LAP)**, se une a la región C-terminal (71)

Otra de las proteínas que se encuentra fuertemente asociada a la regulación de la angiogénesis es la **trombospodina-1 (TSP-1)**. La TSP-1 es una glicoproteína de MEC que posee múltiples dominios funcionales a los que se han atribuido diferentes actividades biológicas (72). Entre estas actividades cabe resaltar que es considerado es un potente inhibidor de la angiogénesis (73).

No debemos olvidar, mencionar el activador de **plasminógeno tipo urokinasa (uPA)**, capaz de unirse al receptor de urokinasa (uPAR). Numerosos estudios afirman que uPAR se encuentra implicado en diferentes procesos inflamatorios.

Se ha observado, que las células del musculo liso vascular son capaces de expresar este receptor y, además también sea visto implicado en remodelación y regeneración tisular (74).

Entre los inhibidores endógenos de la angiogénesis encontramos la angiostatina, que resulta de la degradación de plasminógeno, la endostatina que es un fragmento críptico de la colágena XVIII y, otros inhibidores endógenos de la MEC como la tumstatina, vasostatina y **vasoinhibina** (75)



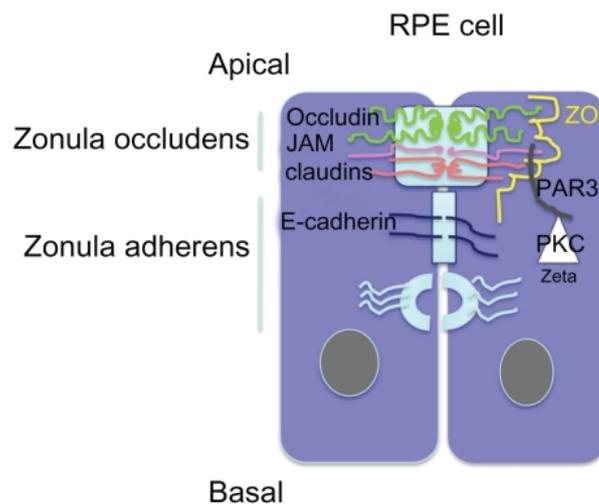
**Figura 11: Vías de señalización reguladas por NADPH oxidasa activada por ROS que conducen a la angiogénesis.** El factor de crecimiento se une a su receptor, que conduce a la translocación de la GTPasa Rac-1, que estimula la producción de ROS por la NADPH oxidasa. Este ROS inactiva negativamente la regulación de las proteínas tirosino kinasas fosfatasas (PTP-SH→PTP-SOH) que produce una mayor autofosforilación del receptor. Se activan múltiples vías de señalización que dan lugar a la activación de la angiogénesis. [Editor S, Gefen A, Aviv R. *Mechanical and Chemical Signaling in Angiogenesis, Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*. C. A. Rein. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.]

### 1.3.5 Alteración de las uniones intercelulares TJs por ROS

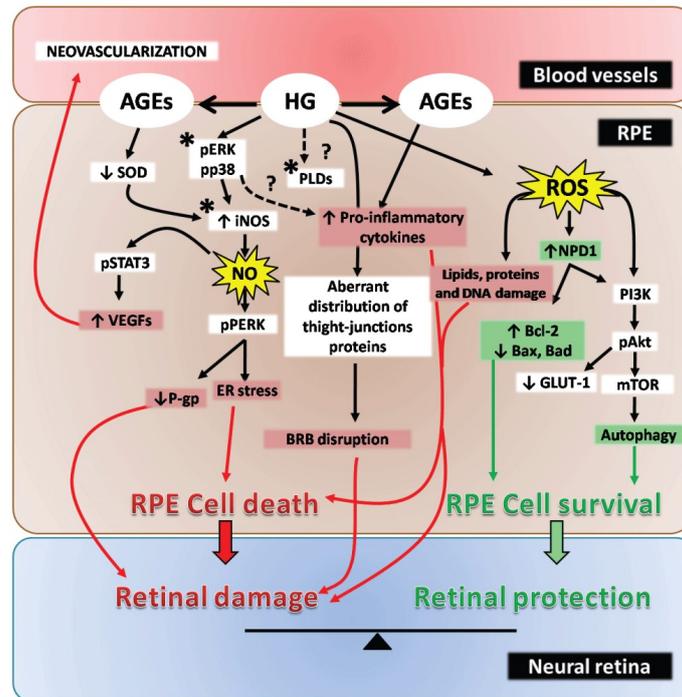
Las TJs forman una barrera al movimiento de sustancias en el espacio paracelular, limitando el paso de sustancias entre la membrana basal y la membrana basolateral. Se han identificado tres proteínas transmembrana en las TJ: ocludinas, claudinas y moléculas de adhesión. Entre estas, la ocludina parece ser la más importante y, por ello ha sido ampliamente caracterizada (**Figura 12**) (71, 72).

La ocludina, se une a miembros de la familia de zónula ocludens (ZO-1,ZO-2,ZO-3) (78) mediante su extremo C-Terminal y la interacción con estas proteínas parece ser crucial en el ensamblaje de las TJ, así como en el mantenimiento de la función de la barrera.

Estudios recientes muestran que el estrés oxidativo es capaz de interferir en la integridad de la barrera ya que afecta de manera negativa a las TJ del EPR induciendo, entre otras cosas, la disociación entre la ocludina y ZO-1 (76). Por otro lado, existen estudios que aseguran que la expresión de ZO-1 disminuye en condiciones de hipoxia (**Figura 13**) (52, 73).



**Figura 12: Representación esquemática del complejo de uniones apicales en células epiteliales.** Zonula occludens comprende las uniones estrechas constituidos por miembros de la familias claudina transmembrana, oclusión, y proteínas de adhesión de unión (JAM). Proteínas citoplasmáticas como ZO y PAR3,6 se encuentran vinculadas al citoesqueleto. PKC fosforila estas proteínas y, por lo tanto, interviene en la formación de complejos de unión apicales. [Tomada de S Omri et al. *The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications*. Clin Ophthalmol. 2010;4:183–95]



**Figure 13: Respuestas en las células del EPR inducidas por ROS.** Resumen esquemático de las vías de señalización producidas en el RPE bajo condiciones de ROS. [Tomada y modificada de Mateos M V et al. Ophthalmology and Clinical Research Inflammation and Oxidative Stress in Retinal Diseases: The Role of Intracellular Signaling in the Retinal Pigment Epithelium. ClinMed. 2015]

## 1.4 CONSUMO DE ALCOHOL Y DEGENERACIÓN DE LA RETINA

El consumo de alcohol es un factor de riesgo de muerte importante a nivel mundial ya que el consumo de este conduce a más de 60 enfermedades diferentes (79). De hecho, la dependencia al alcohol se correlaciona con un amplio espectro de enfermedades, psicológicas, de comportamiento y problemas sociales (80). El alcohol se ha convertido en la droga adictiva más aceptada socialmente en todo el mundo (81), teniendo como resultado el daño y deterioro funcional de muchos órganos del cuerpo.

Pero el consumo de alcohol no sólo supone un problema importante de salud sino también una carga económica debido al aumento de costes que generan las enfermedades crónicas asociadas a este, tales como enfermedades del corazón, accidente cerebrovascular, enfermedad hepática, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes mellitus y enfermedad de los huesos (76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83).

Que el consumo agudo y crónico de EtOH aumenta la producción de ROS se ha demostrado en una variedad de sistemas, células, y diferentes especies, incluyendo los seres humanos (89).

Recientemente, el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo ha demostrado que el EtOH puede ser metabolizado por las células del EPR humanas en condiciones “in vitro” aumentando la producción de ROS (43,50). Esta generación de radicales libres se corresponde por una disminución de la supervivencia celular y está causada en gran medida por la actividad del citocromo 2E1 (CYP2E1), isoforma del citocromo P450.

El CYP2E1 es considerado el mayor componente del sistema microsomal de la oxidación de etanol (MEOS) (90). CYP2E1 presentaría un papel protector a bajas concentraciones de EtOH, mientras que concentraciones superiores resultarían nocivas. Estos datos refuerzan el papel protector del EPR y sugiere la implicación de CYP2E1 en la visión (50).

El consumo de alcohol, así como la hiperglucemia, está implicado en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, ya que reduce los niveles de antioxidantes aumentando la generación de ROS (90). Este efecto nocivo se ha observado en diferentes órganos, entre los que se encuentra el intestino o el cerebro (91), en los que el EtOH afecta directamente a la integridad de la barrera epitelial y endotelial.

Existen diferentes estudios que relacionan directamente el consumo de drogas con enfermedades oculares. Entre estos estudios encontramos a algunos que afirman que existe una mayor predisposición a padecer DMAE en personas fumadoras (42,87), así como un potente factor de riesgo para la neovascularización de la coroides. Este último estudio indica, además que el consumo de tabaco daría lugar a un proceso ocular inflamatorio produciendo efectos adversos en la neovascularización, siendo necesarios estudios adicionales para dilucidar esta conexión (93).

Con respecto a la implicación del EtOH en enfermedades oculares el grupo de investigación donde se realizó este trabajo encontró evidencias de que el consumo de EtOH es capaz de producir estrés oxidativo, un incremento de la autofagia y mitofagia alterando la peroxidación lipídica en el EPR y afectando así al ciclo visual (43). Todo ello correlacionado con el aumento de la señalización celular mediante la liberación de exosomas (94). Todos estos resultados sugieren que podría existir una retinopatía alcohólica no descrita hasta la fecha.

## 1.5 MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DEL EPR

Debido a la dificultad que presenta la realización de ensayos “in vivo” resulta necesario recurrir a los estudios “in vitro”, ya que estos ofrecen ciertas ventajas prácticas, como la necesidad de un menor espacio de trabajo y abaratamiento de costes.

Existen diferentes tipos celulares y, también se pueden diferenciar según las técnicas empleadas para su generación. Los modelos celulares más utilizados generalmente en los laboratorios, son las **líneas celulares inmortalizadas**. Estas son líneas celulares que presentan una capacidad proliferativa aumentada o ilimitada, mostrando una mayor tasa de renovación.

Por otro lado, encontramos los **cultivos primarios**. Se llama cultivo primario a la obtención de células a partir de un trozo de tejido. Estos siempre van a ser más parecidos a la realidad pudiendo recrear un entorno más fiel al fisiológico. Pero estos cultivos tienen grandes limitaciones experimentales que sumadas a la disponibilidad limitada y su heterogeneidad entre donantes hace difícil trabajar con ellas (95).

Algunas de los cultivos primarios de epitelio pigmentario derivan de bancos de células y/o de donaciones de fallecidos, como las células de epitelio pigmentario humano criopreservadas. Por otro lado, existen cultivos primarios de células animales como ratones, ratas, cerdos o conejos (95).

Hasta la fecha se ha producido una gran variedad de líneas celulares de epitelio pigmentario de la retina (12). Algunos de estos modelos celulares de transformación espontánea son las líneas H80HrPE-6, ARPE-19, D407 y RPE-340. Entre las líneas celulares inmortalizadas encontramos la línea hTERT-RPE-1 derivada de la línea celular RPE-340. Las líneas celulares h1RPE-7 y h1RPE-116 fueron generadas a partir de una mujer de 50 años mediante la transfección a las células de un plásmido que contenía el antígeno T SV40. Estas células no presentan una resistencia eléctrica transepitelial (TER) normal y han sido empleadas en pocos estudios (95).

Por otra parte, un enfoque alternativo para la obtención de células de RPE consiste en generarlas desde células madre pluripotentes humanas (hPSCs) del propio paciente, ya sea a partir de células madre adultas o de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Actualmente, existe una gran cantidad de protocolos para el establecimiento de células iPSC provenientes del EPR (iPSC-RPE) que están siendo mejorados. Esto ha generado una considerable expectación debido al potencial que presentan estas células para el desarrollo de modelos biológicos *in vitro* (12).

Existen estudios, como el realizado por el grupo de la doctora Valeria Canto-Soler en el año 2015, en el Wilmer Eye Institute, con células iPSCs, en el que queda demostrada su alta capacidad autónoma para la recapitulación espaciotemporal de cada una de las etapas principales del desarrollo de la retina observadas "*in vivo*", y su potencial para la formación tridimensional de los vasos sanguíneos retinianos que contengan todos los tipos celulares de la retina, así como su disposición en las capas celulares adecuadas. Además, los fotorreceptores generados logran alcanzar una cierta madurez, ya que presentan segmentos externos a medio formar, además de cierta fotosensibilidad. Este hecho, nos acerca un poco más a la posibilidad del empleo de las iPSCs en enfermedades oculares y abre un camino hacia la posibilidad de terapias futuras (96).

### 1.5.1 ARPE-19 como modelo celular de EPR

La ARPE-19 es una línea celular de EPR humano aparecida espontáneamente, derivada en 1986 a partir de ojos normales de un donante varón de 19 años (97). Estas células expresan marcadores específicos del EPR, como la proteína RPE65 y la proteína de unión a retinaldehído celular, CRALBP (97). La velocidad de crecimiento de las células ARPE-19 en el medio de cultivo con suero (DMEM/F12 + 10% de FBS) es de aproximadamente 1 doblaje/48 h y el número total de pases es superior a 100. Las células ARPE-19 parecen presentar un fenotipo normal y crecen a un ritmo estable. Además, son capaces de formar mono capas estables, las cuales presentan polaridad morfológica y funcional (97)

células ARPE-19 han sido empleadas en estudios de estrés oxidativo, vías de señalización celular, estudio de toxicidad celular por drogas (95), autofagia, inflamación (12) y enfermedades como la DMAE, la RD o la retinitis pigmentosa, entre otras.

---

II. HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

---

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

El desarrollo de enfermedades de la retina como la DMAE o RD tiene en común el aumento de estrés oxidativo. Este aumento de ROS tiene como respuesta la activación de la angiogénesis y/o neovascularización en las células de la coroides dando lugar a una disfunción de la retina y en consecuencia a la pérdida de la visión.

Estudios previos demuestran que el consumo de alcohol aumenta el estrés oxidativo en la retina generando un desequilibrio en la respuesta antioxidante celular. Teniendo en cuenta estos resultados, el presente trabajo pretende identificar las rutas de señalización celular mediadas por la exposición crónica al alcohol y su posible implicación en los procesos angiogénicos y/o de neovascularización.

Por tanto, proponemos la siguiente **hipótesis**:

El consumo crónico de alcohol activaría una cascada inflamatoria en células del EPR teniendo como resultado el aumento de marcadores angiogénicos.

Como **objetivo general** proponemos demostrar que el etanol se encuentra implicado en procesos patológicos asociados a la retina, aumentando el estrés oxidativo y provocando un desequilibrio en el mantenimiento de la estabilidad vascular coroidal.

Los siguientes puntos fueron fijados como **objetivos específicos**:

1. Estudio de la viabilidad celular y el estrés oxidativo producido por el tratamiento crónico de etanol en la línea celular humana, ARPE-19.
2. Estudio de la modificación de los marcadores proangiogénicos y antiangiogénicos liberados por las células ARPE-19 bajo condiciones de alcoholismo crónico.
3. Determinación de la concentración de las MMPs tanto en condiciones control (no expuestas al EtOH) como tras el tratamiento, así como las modificaciones que este tratamiento provoca sobre la expresión de las mismas.
4. Estudio de la estabilidad de las uniones intercelulares, TJ entre las células ARPE-19 tras el tratamiento crónico con EtOH.

---

III. MATERIALES

Y

MÉTODOS

---

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 3.1 SIEMBRA, CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO

Las células ARPE-19 fueron cultivadas de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor (American Type Culture Collection [ATCC]). Las células fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F12, DMEM/F12, suplementado con 5 mM de HEPES buffer, 7.5% NaHCO<sub>3</sub>, 10% suero bovino fetal inactivado, FBSi, un 1% penicilina/estreptomina y 1% de anfotericina (Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en el incubador a humedad y temperatura óptima, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembró a una densidad de 20.0000 células por centímetro cuadrado. Dos días después de ser sembradas, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de EtOH (Bisolve), sin suero en el medio de cultivo, durante 24 horas. Todos los experimentos fueron realizados con un grupo control, es decir, células sembradas y cultivadas a las mismas condiciones excepto el tratamiento con etanol, que estas no llevaban.

## 3.2 VIABILIDAD CELULAR

Para los estudios de viabilidad celular se empleó el kit de XTT, (Cell Proliferation Kit II; Roche). Este mide la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial. El ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio XTT en presencia de un reactivo de acoplamiento de electrones, produciendo una sal de formazán soluble. Esta conversión se produce sólo en células viables.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos. La densidad utilizada fue de 20.000 células por centímetro cuadrado. Tras 24h de cultivo, se procedió a tratarlas con concentraciones crecientes de EtOH 200, 400, 600, 800 y 1200 mM durante 24 horas.

Tras el tratamiento las células fueron incubadas con el XTT de acuerdo al manual del fabricante. Una vez desarrollada el reactivo XTT a una concentración de 0.3 mg/ml (Mezcla los reactivos del kit) en el medio de cultivo, se procedió a añadir la mezcla a todos los pocillos y se incubó durante 4 horas en el incubador (37°C). Tras este periodo en el que se forman los cristales de formazán, se procedió a la cuantificación de la absorbancia a 550 nm se realizó mediante un lector de placas Victor X5 (Perkin). Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje respecto al grupo control (sin tratamiento con etanol) para su normalización. El ensayo se repitió tres veces de manera independiente, es decir tres réplicas del experimento.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ROS

Se midieron los niveles de ROS intracelular usando una sonda capaz de emitir fluorescencia. El diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína, H2DCFDA (Santa Cruz Biotechnology) que se convierte en un derivado no fluorescente (H2DCF) por las esterasas intracelulares. Esta molécula puede ser oxidada por los ROS intracelulares produciendo diclorofluoresceína (DCF), el cual presenta fluorescencia.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos con la superficie tratada. La densidad utilizada fue de 20.000 células por centímetro cuadrado. Tras 48h en cultivo, se procedió a tratarlas con concentraciones crecientes de EtOH 200, 400, 600, 800 y 1200 mM durante 24 horas.

Tras esto, las células ARPE-19 se lavaron dos veces con tampón fosfato (PBS) y se incuban con 15  $\mu$ M de H2DCFDA (diluido en medio de cultivo) durante 15 min en el incubador a 37°C. La producción de ROS intracelular se mide por fluorescencia con el lector de placas, Victor X5 (Perkin). Para ello se excitó a una longitud de onda de 485 nm y a 530 nm de emisión. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje respecto al grupo control (sin tratamiento con etanol). Además, para su normalización se relativizó con los niveles de viabilidad celular. El ensayo se repitió tres veces de manera independiente, es decir tres réplicas del experimento.

### 3.4 ARRAY DE ANGIOGENESIS

Para medir los marcadores angiogénicos y antiangiogénicos en las células ARPE-19 tras la exposición con EtOH, se utilizó el Human Angiogenesis Antibody Array (R&D Systems).

Brevemente, este kit proporciona una herramienta rápida, sensible para detectar simultáneamente los niveles relativos de 55 proteínas relacionadas con la angiogénesis en una sola muestra. Los analitos incluyen factores de crecimiento solubles y factores de diferenciación, los componentes de la matriz extracelular, proteasas, receptores unidos a la membrana, y moléculas de señalización intracelulares. Los anticuerpos se encuentran capturados por duplicado en las membranas de nitrocelulosa.

Para realizar este ensayo, se procedió a la extracción de proteínas de las células ARPE-19 tras ser tratadas con EtOH durante 24h a las concentraciones de 200, 400 y 600 mM, incluyendo también el grupo control. Para la obtención de las muestras, tratamiento se realizó 3 veces de manera independiente, es decir, tres réplicas del experimento.

La extracción de proteínas se realizó a partir de los pellets celulares congelados. Una vez descongelados se lisaron con RIPA buffer (Sigma Aldrich) mezclado con inhibidor de proteasas y fosfatasa dejando actuar durante 15 minutos en hielo.

Tras este tiempo se lisaron mediante ultrasonidos con un sonicador (Branson digital sonifier) a una amplitud de 20% en 2 ciclos de 3 segundos x 3 segundos en hielo. Después se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000xg a 4°C. El pellet resultante se descartó.

El sobrenadante, contenido proteico total, se cuantificó mediante la técnica del Ácido Bicinónico, BCA (Thermo Scientific). Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen el  $\text{Cu}^{++}$ .

Los iones  $\text{Cu}^+$  producidos, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica, de tal manera que ahora absorbe luz a 562 nm y aparecen púrpura. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente.

Para establecer la relación entre una cierta concentración de proteína y una cierta absorción, se preparó una recta patrón mediante diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA), partiendo de una concentración conocida. Paralelamente se llevó a cabo la reacción con nuestras muestras experimentales. Tras llevar a cabo la reacción de acuerdo con el manual del fabricante, se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro, Victor X5 (Perkin). Finalmente, con la recta patrón se pudo interpolar los valores de absorbancia de nuestra muestra frente a la concentración conocida de BSA.

Al tratarse de un ensayo semi-cuantitativo, se procedió a la mezcla de las muestras, mediante un pul de las tres réplicas independientes del experimento. De esta manera utilizamos una membrana del kit por cada grupo experimental. 100  $\mu\text{g}$  de proteína de la mezcla fueron incubados con un cóctel de anticuerpos biotinilados durante toda la noche. Tras la incubación se utilizó un anticuerpo secundario unido a estreptavidina y peroxidasa del rábano (HRP). La estreptavidina se unirá de manera específica a la biotina del anticuerpo primario, y la peroxidasa será la enzima utilizada para revelar esta unión de los anticuerpos primarios frente a los secundarios. Para ello se utilizarán reactivos de revelado y se detectará la quimioluminiscencia en una cámara CCD, (ImageQuant LAS4000mini G&E). La señal producida es proporcional a la cantidad de analito unido (**Ver Fig. 1 Anexo I**) (98).

La intensidad de la señal fue cuantificada por densitometría mediante el software ImageQuant TL (GE). Los resultados se expresaron en % respecto al control y se utilizó para normalizar los datos uno de los marcadores, el FGF básico, que no se vio afectado por el tratamiento.

### 3.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para el estudio de la expresión proteica de los marcadores angiogénicos, además del array de angiogénesis se utilizó la técnica del western blot SDS-PAGE. Esta técnica permite separar las proteínas en condiciones desnaturizantes y reductoras en un gel de acrilamida/bisacrilamida y, su posterior transferencia a una membrana. El SDS actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturizándolas y, dotándolas de carga

negativa. Además, se emplea  $\beta$ -mercaptoetanol, capaz de romper los puentes disulfuro y las muestras son calentadas a 96°C. Todo ello, permite que las proteínas migren únicamente en función de su peso molecular.

Para ello, se procedió a la extracción de proteínas de las células ARPE-19 tras ser tratadas con EtOH durante 24h a las concentraciones de 200, 400 y 600 mM, incluyendo también el grupo control. Para la obtención de las muestras, tratamiento se realizó 3 veces de manera independiente, es decir, tres réplicas del experimento.

La extracción de proteínas se realizó a partir de los pellets celulares congelados a -20°C. Una vez descongelados se lisaron con RIPA buffer (Sigma Aldrich) mezclado con inhibidor de proteasas y fosfatasa dejando actuar durante 15 minutos en hielo. Tras este tiempo se lisaron mediante ultrasonidos con un sonicador (Branson digital sonifier) a una amplitud de 20% en 2 ciclos de 3 segundos x 3 segundos en hielo. Después se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000xg a 4°C. El pellet resultante se descartó. El sobrenadante, contenido proteico total, se cuantificó mediante la técnica del, BCA (Thermo Scientific), arriba detallado.

La misma cantidad de proteína 35  $\mu$ g, fueron cargadas en los geles de acrilamida/bisacrilamida del 4% al 8%. La electrotransferencia se realizó en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore). Tras la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (TBS con un 3% de BSA y al 0.5% de tween 20). Después se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes: conejo anti-VEGFR2 (abcam), a una dilución, conejo anti-VEGFR1 (abcam) y ratón anti- $\beta$ actina (Santacruz Biotechnology), todos ellos diluidos en solución de bloqueo a una concentración de 1:500. Tras 3 lavados con tampón Tris-HCl, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios unidos a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Estos, cabra anti-conejo y cabra anti-ratón fueron empleados a una dilución 1:10.000 en el tampón tris-HCl. Para observar la quimioluminiscencia de las bandas de las membranas con la cámara CCD Image Quant LAS-4000 mini (GE), estas fueron incubadas con el reactivo revelador ECL (Fisher Scientific). Los niveles de proteína fueron cuantificados por densitometría empleando el software ImageJ. La intensidad de la expresión de proteínas se normalizó mediante la expresión de  $\beta$ actina, proteína de expresión constitutiva en la célula y que no se vio afectada por nuestro tratamiento (**Ver Fig. 2 Anexo I**) (99).

### 3.6 DETERMINACIÓN DE MMPS POR ELISA

La determinación de MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) fueron determinadas de manera cuantitativa mediante un kit ELISA, Mosaic™ ELISA Human MMP Panel, (R&D Systems) (**Ver Fig. 3 Anexo I**) (100) . De acuerdo al manual del fabricante, para el estudio, se emplearon los sobrenadantes (medio de cultivo del tratamiento) de las células ARPE-19 que se recogieron tras el tratamiento durante 24h a las concentraciones de 200, 400 y 600 mM, incluyendo también el grupo control. Para la obtención de las muestras, tratamiento se realizó 3 veces de manera independiente, es decir, tres réplicas del experimento.

El Kit cuenta con una placa de 96 pocillos, cada uno de estos contiene los 7 anticuerpos para cada MMP, además de uno de referencia (control positivo del experimento). Para la realización de este, se debe ensayar, de manera paralela a nuestras muestras una recta patrón para cada MMP de manera que se pueda cuantificar la cantidad en pg/ml de cada una de estas en nuestra muestra.

La misma cantidad de muestra fue depositada en un pocillo que contiene fijados anticuerpos específicos de captura para cada MMP, posteriormente se lavó el pocillo y se eliminó cualquier material que no hubiese quedado fijado formando un complejo. Se aplicaron anticuerpos de detección conjugados con HRP a cada pocillo formándose complejos “tipo sandwich” Anticuerpo de captura-MMP-Anticuerpo-HRP. Se volvió a realizar el lavado y se aplicó la mezcla de reactivos quimioluminiscentes que será detectada en una cámara CCD, (ImageQuant LAS4000mini, G&E).

Finalmente, la intensidad de la señal fue cuantificada por densitometría mediante el software ImageQuant TL (GE). Con la recta patrón de cada MMP se pudo interpolar los valores de quimioluminiscencia de nuestra muestra frente a la concentración conocida de dichas MMPs.

### 3.7 RT-PCR CUANTITATIVA (Q-PCR)

Para poder llevar a cabo los estudios de la expresión génica de las células ARPE-19 sometidas al tratamiento con EtOH, se procedió a la extracción de RNAm para poder realizar un estudio cuantitativo de dicha expresión de marcadores.

Para el aislamiento de RNAm, se recogió el pellet celular tras tratar las células durante 24 horas con EtOH, 200, 400 y 600 mM y las células sin tratamiento (grupo control). Las células ARPE-19 fueron recogidas con tripsina, lavadas con PBS y pasadas a un tubo de 1,5 ml y centrifugadas a 5000 xg a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, se empleó el kit RNeasy Mini (Qiagen), el procedimiento se realizó de acuerdo al manual del fabricante. La calidad y cantidad del RNA extraído se midió en el nanodrop (Thermo Fisher).

Para la síntesis de cDNA (DNA de cadena simple) se realizó la transcripción reversa con SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), bajo las siguientes condiciones: 65°C durante 5 minutos, 42°C durante 60 min y 70°C durante 10min.

Con la finalidad de poner a punto los primers, para la posterior realización de la PCR cuantitativa (Q-PCR), se realizó previamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (PCR master mix, Promega). Los primers empleados fueron VEGF y GAPDH. Este último se empleó como control interno. La secuencia de primers empleados fue la siguiente: 5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCA-3', 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3' para forward y reverse del primer VEGF, respectivamente. Para el gen GAPDH la secuencia empleada fue 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3' y 5'-TTCTCAGCCTTGACGGTGCCA-3', para forward y reverse, respectivamente. El gel de agarosa fue realizado al 2% y el número total de ciclos fue de 40.

La PCR cuantitativa o q-PCR es una variante de la PCR, empleada para la amplificación y cuantificación simultánea de DNA. Los reactivos utilizados son los mismos que la PCR convencional (dNTPs, tampón de reacción, DNA polimerasa termoestable y primers), sin embargo, en la q-PCR se emplea, además, un fluoróforo. Este fluoróforo al ser sometido a una determinada longitud de onda en un termociclador emite fluorescencia, lo que permite medir la tasa de generación de cada producto tras cada ciclo de amplificación.

Para Q-PCR se empleó el iTaq™ Universal SYBR Green Supermix, (BIO-RAD) de acuerdo con el manual del fabricante. El equipo empleado fue el LightCycler 480 II y, su software LightCycler 4.0 (Roche). Cada muestra se analizó por duplicado en cada una de las réplicas, y el número total de réplicas analizadas fue 5. La expresión de los genes fue normalizada empleando GAPDH como gen control. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 10 segundos, 56°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos y, el número total de ciclos fue de 45. Para el análisis de los resultados se empleó el ciclo umbral (Ct: Threshold cycle), el ciclo al cual comenzamos a ver fluorescencia. Estos datos fueron normalizados empleando el gen control GAPDH. De este modo obtuvimos el valor  $\Delta Ct$  (Ct VEGF-Ct GAPDH). Tras esto, comparamos cada una de las muestras tratadas frente al  $\Delta Ct$  del grupo control (muestras no tratadas), obteniendo el  $\Delta\Delta Ct$  [ $\Delta Ct$  (tratamiento - grupo control)]. Por último, para determinar el cambio de expresión en nuestro gen de interés empleamos la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **(Ver Fig. 4 y 5 Anexo I)** (101).

### 3.8 INMUNOCITOQUÍMICA

Las células ARPE-19 fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario Rabbit anti-ZO-1 (1:100; Invitrogen) a 4°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas tres veces con PBS, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. A continuación, las células fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit Ig (1:200; Molecular Probes, Invitrogen). Para la tinción de ADN, los núcleos se marcaron durante 10 minutos con 4,6-diamidino-2-fenilindol, DAPI (1:50; Sigma-Aldrich Corp.). Por último, los filamentos intermedios de actina se tiñeron de color rojo con faloidina. Para la observación celular se empleó un microscopio de fluorescencia (Eclipse Ti; Nikon), **(Ver Fig. 6 Anexo I)** (102).

### 3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). En cada grupo experimental n indica el número de réplicas independientes de cada experimento. Las diferencias estadísticas tratamiento. El análisis estadístico, mediante la prueba T. Student, ha sido realizado con el software Prims 5 (GraphPad Software Inc.,).

---

## IV. RESULTADOS

---

# IV. RESULTADOS

---

## 4.1 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR Y PRODUCCIÓN DE ROS INTRACELULAR.

Las imágenes que se muestran en la **figura 14** son los resultados obtenidos tras la realización de ensayos de viabilidad celular y producción de ROS intracelular en nuestro modelo celular, ARPE-19, tras una exposición crónica a etanol.

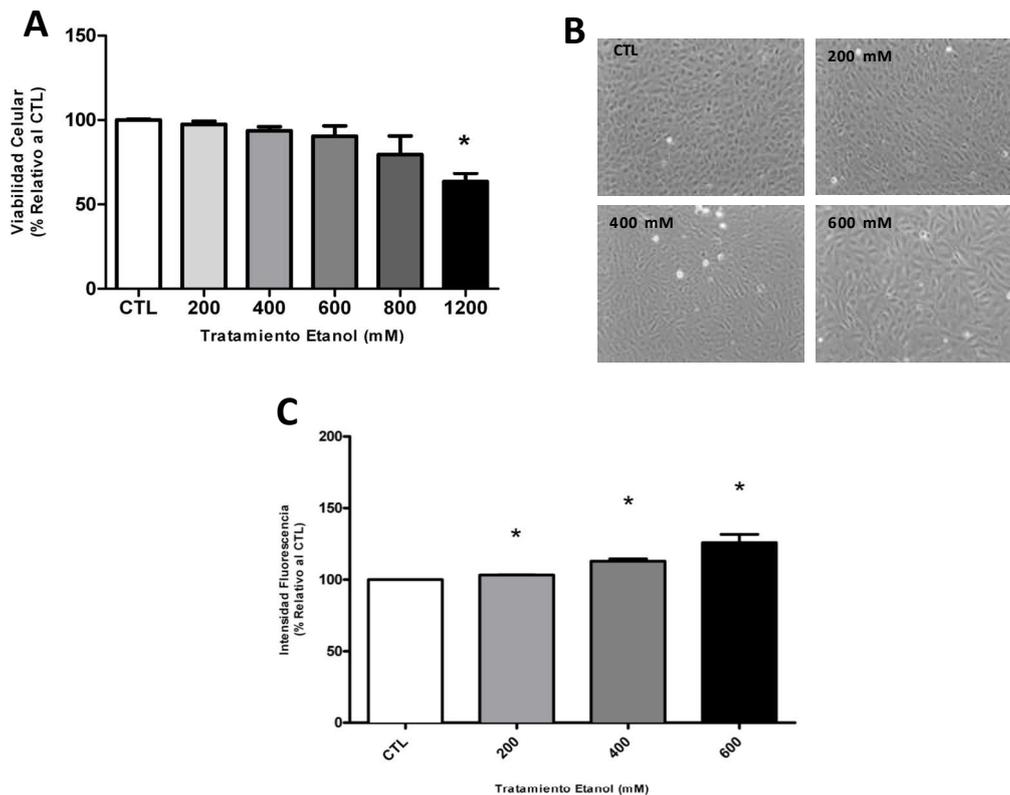
Los grupos experimentales fueron, el grupo control (sin tratamiento) y células tratadas con distintas concentraciones de EtOH, 200, 400, 600, 800 y 1200 mM. El tratamiento se realizó durante 24 horas.

Como se puede observar en la gráfica de la **figura 14.A**, el ensayo de XTT reveló que el tratamiento durante 24 horas con etanol disminuye la viabilidad celular. Cabe señalar que esta disminución no es significativa hasta concentraciones superiores a 800 mM de EtOH, como se puede apreciar en la gráfica, sólo observamos una disminución significativa en el grupo tratado con 1200 mM de EtOH, comparado con el grupo control.

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares, se determinó que para el resto de experimentos se utilizarían sólo las concentraciones sub-letales de etanol 200, 400 y 600 mM a los que se le sumaría el grupo control, quedando por tanto con 4 grupos experimentales diferentes.

Como se puede ver en la **figura 14.B**, imágenes obtenidas en el microscopio óptico, el tratamiento de 24h con EtOH, a las concentraciones seleccionadas, no parece afectar a la morfología celular. Se puede observar en todas las fotos adquiridas, células hexagonales que están densamente empaquetadas.

Para el ensayo de medición del ROS intracelular se utilizó el H2DCFDA. Como se puede observar en la **figura 14.C**, existe un aumento de la producción del ROS intracelular de una manera dependiente a la concentración de EtOH utilizada. Tras 24h de tratamiento, las células ARPE-19 mostraron un aumento significativo del ROS intracelular en todos los grupos experimentales. Este aumento fue superior en el caso del tratamiento con 600 mM de EtOH, (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 14: Viabilidad celular y ROS tras el tratamiento con etanol en ARPE-19.** **A)** Ensayo XTT tras el tratamiento a distintas concentraciones con EtOH. **B)** Imágenes de microscopía óptica de células ARPE-19 no tratadas (grupo control) y células tratadas con 200 mM, 400 mM y 600 mM de EtOH. **C)** Ensayo con H2DCFDA tras el tratamiento con etanol. El análisis estadístico se realizó con una prueba t \* $p < 0.05$ . Los puntos representan la media  $\pm$  SEM. (n=3 para cada grupo).

## 4.2 ESTUDIO DE LOS MARCADORES IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS

Como se ha visto con anterioridad, existe una relación muy estrecha entre los procesos angiogénicos y otras vías de señalización celular. En este trabajo nos hemos centrado en la vía de la inflamación. Para ello, hemos querido medir la posible respuesta inflamatoria de las células ARPE-19 tras ser sometidas al tratamiento crónico con EtOH.

Para poder establecer la relación entre respuesta inflamatoria y la activación de la angiogénesis, se realizó un array capaz de medir 55 proteínas relacionadas con angiogénesis en una sola muestra (**Figura 15**).

En una visión general de los resultados obtenidos, **figura 15.A**, podemos observar como en prácticamente todas las proteínas detectadas por el array de angiogénesis, presentan variaciones, aumentando o disminuyendo su expresión, tras el tratamiento.

En la **figura 15.B**, se muestra una selección de aquellas proteínas que presentan un cambio en su expresión más acusado, estas son: VEGF-A, uPA, TGF-  $\beta$ 1 (LAP), TIMP-1, HGF y FGF-7.

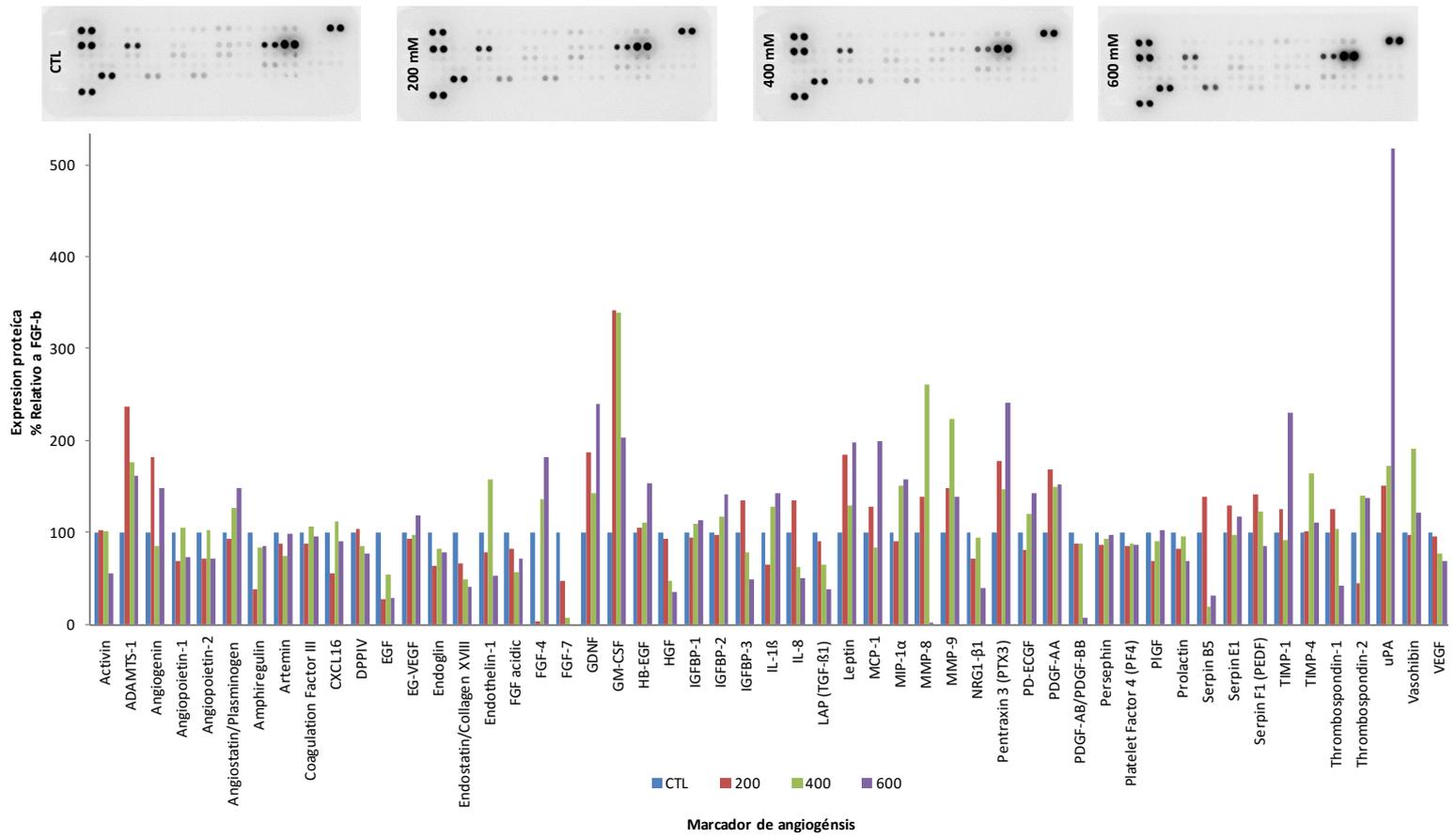
Como se puede observar en dicha figura, uPA, una proteína relacionada con procesos inflamatorios y a la cual se le atribuye capacidad angiogénica, encuentra aumentada su expresión de manera dependiente a la concentración utilizada. Este aumento de expresión llega a ser a 600 mM de EtOH alrededor de 5 veces superior con respecto al grupo control. Por el contrario, otros marcadores, también pro-angiogénicos, como son VEGF-A, TGF-  $\beta$ 1 (LAP), HGF y FGF-7 ven disminuida su expresión de manera dependiente al tratamiento con EtOH, con respecto al grupo control. Cabe destacar que FGF-7 presenta la disminución de expresión más acusada, llegando incluso a no expresarse o a tener una expresión tan mínima que el array de angiogénesis es incapaz de detectar a 600 mM de EtOH.

Cabe destacar, como se puede ver en la **figura 15.C**, que algunas de las proteínas medidas sufren modificaciones de su expresión sólo en uno de los grupos experimentales tratados con 200 mM de EtOH.

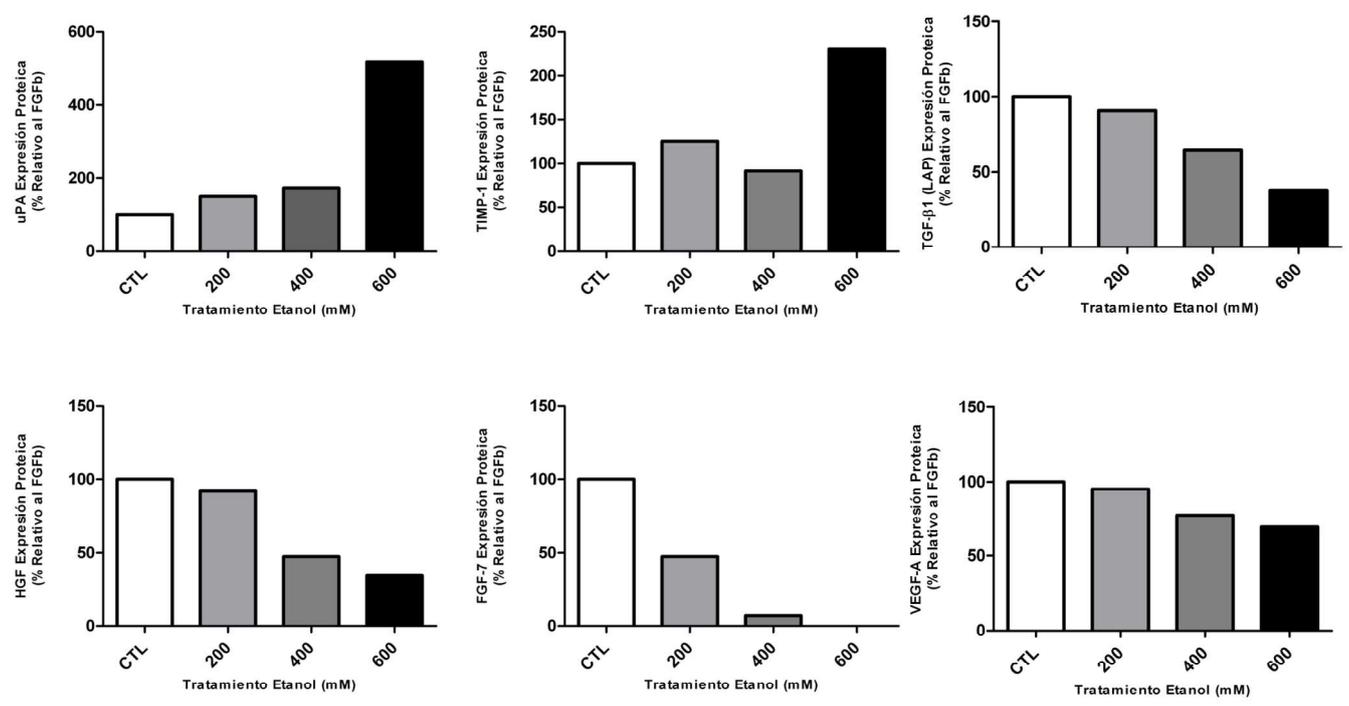
Tanto PEDF como TSP-1, dos marcadores inhibitorios de la angiogénesis, ven aumentada su expresión a 200 mM seguida de una disminución de la expresión a 400 mM y, que llega a situarse por debajo de la expresión del grupo control tras el insulto con 600 mM de EtOH. PEDF presenta una disminución de su expresión en torno a un 10%, mientras que para TSP-1 esta disminución supone un 50% de la expresión, ambas con respecto al grupo control. En cuanto a la citoquina proinflamatoria IL- $\beta$ , observamos una disminución de su expresión con respecto al grupo control a 200 mM de EtOH, seguido de un aumento de la expresión por encima de los valores control a mayores concentraciones del tratamiento.

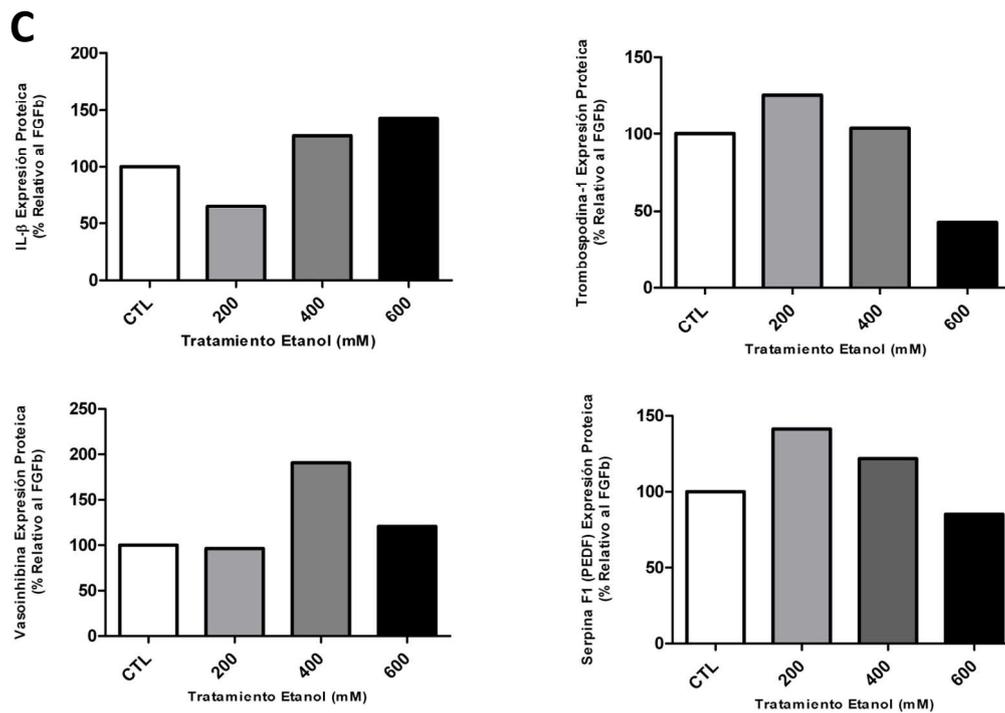
Con respecto a la vasoinhibina, un inhibidor endógeno de la angiogénesis, a 200 mM de EtOH no presenta variación de la expresión comparada con los niveles del grupo control, pero tras la exposición a dosis más elevadas del tratamiento puede verse un brusco aumento, que duplica su expresión con respecto al grupo control, (400 mM versus control). Tras este aumento se produce una disminución a 600 mM de EtOH, manteniéndose está por encima del nivel de expresión detectado en el grupo control.

**A**



**B**





**Figura 15: Estudio semi-cuantitativo de la angiogénesis en ARPE-19 tras el tratamiento con EtOH. A)** Gráfica con la totalidad de proteínas detectadas por el array de angiogénesis.. **B)** Representación gráfica de las proteínas que presenta una variación de expresión acusada tras el tratamiento con EtOH. Estas son; VEGF-A, uPA, TGF-  $\beta$ 1 (LAP), TIMP-1, HGF y FGF-7. **C)** Representación gráfica de proteínas que tras el insulto con EtOH ven afectada su expresión a 200 Mm o a partir de esta concentración. Estas proteínas son: IL- $\beta$ , vasoinhibina PEDF y TSP-1).

### 4.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE VEGF Y SUS RECEPTORES

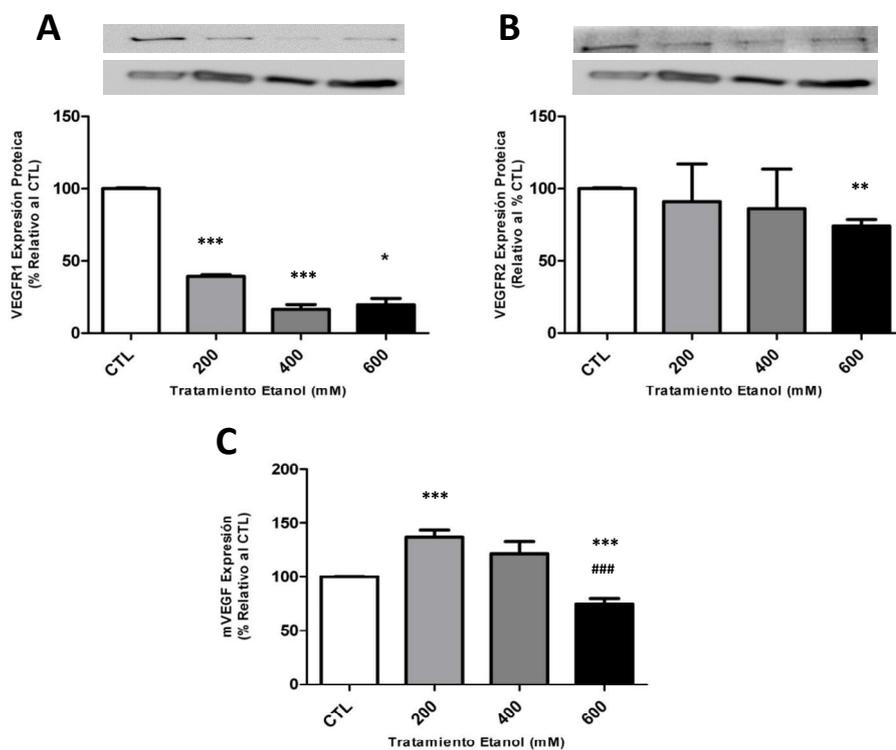
Con la finalidad de confirmar los datos obtenidos en el array de marcadores angiogénicos, se realizó un ensayo cuantitativo de marcadores angiogénicos más específicos como son VEGF y sus receptores (**Figura 16**).

Para medir de manera semi-cuantitativa la expresión proteica de los receptores de VEGF, (VEGFR1 y VEGFR2) se empleó la técnica de western blot (**Figura 16.A y 16.B**). Además, se realizó un ensayo cuantitativo mediante q-PCR de la expresión de RNAm de VEGF-A.

Los resultados obtenidos mediante cuantificación por densitometría de expresión proteica de los receptores de VEGF, **figura 16.A**, muestran un claro decaimiento de los niveles de VEGFR-1 tras la exposición a todas las concentraciones de EtOH. Esta disminución de la expresión proteica fue estadísticamente significativa con valores  $p < 0.001$  en todos los tratamientos con respecto al control.

También puede observarse una disminución de la expresión de VEGFR-2, **figura 16.B**, aunque mucho más leve que en el caso anterior, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) a la concentración más alta de EtOH empleada, 600 mM.

Estos datos se correlacionan con los obtenidos por q-PCR, esta técnica demostró que el gen presentaba un incremento de su expresión estadísticamente significativa, con respecto al control, tanto a 200 mM como a 600 mM de EtOH, **figura 16.C**. A 200 mM el p valor resultó ser de 0.0005 ( $p < 0.001$ ). Tras el tratamiento con EtOH a 400 mM podemos observar una leve disminución de la expresión con respecto al tratamiento con 200 mM de EtOH, y no presenta variación estadísticamente significativa con respecto al control. A 600 mM de EtOH esta disminución de la expresión del gen de VEGF-A resulta alcanzar valores por debajo del grupo control, siendo esta reducción de la expresión estadísticamente significativa con  $p < 0.001$ , tanto en comparación al control, como en comparación a 200 EtOH ( $p = 0.0025$  y  $p = 0.0001$ , respectivamente).



**Figura 16: Determinación de los niveles de expresión VEGF-A y de sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2.**

**A, B)** Niveles proteicos de expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 tras el tratamiento con EtOH, respectivamente (n=3 para cada grupo).

**C)** Expresión de RNAm VEGF-A tras el tratamiento con EtOH (n=5 para cada grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba t

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; #### $p < 0.05$  con respecto a 200 mM EtOH. Los puntos representan la media  $\pm$  SEM.

## 4.4 DETERMINACIÓN DE MMPS

Se quiso determinar si existía alguna variación, debida a nuestro tratamiento crónico con EtOH, en los niveles de MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) en las células ARPE-19.

Teniendo en cuenta que la medición de estas no sólo nos ayudaría a determinar el estado en el que podría encontrarse la MEC sino también a establecer una relación entre inflamación y angiogénesis, se cuantificó su expresión mediante un ELISA (**Figura 17**).

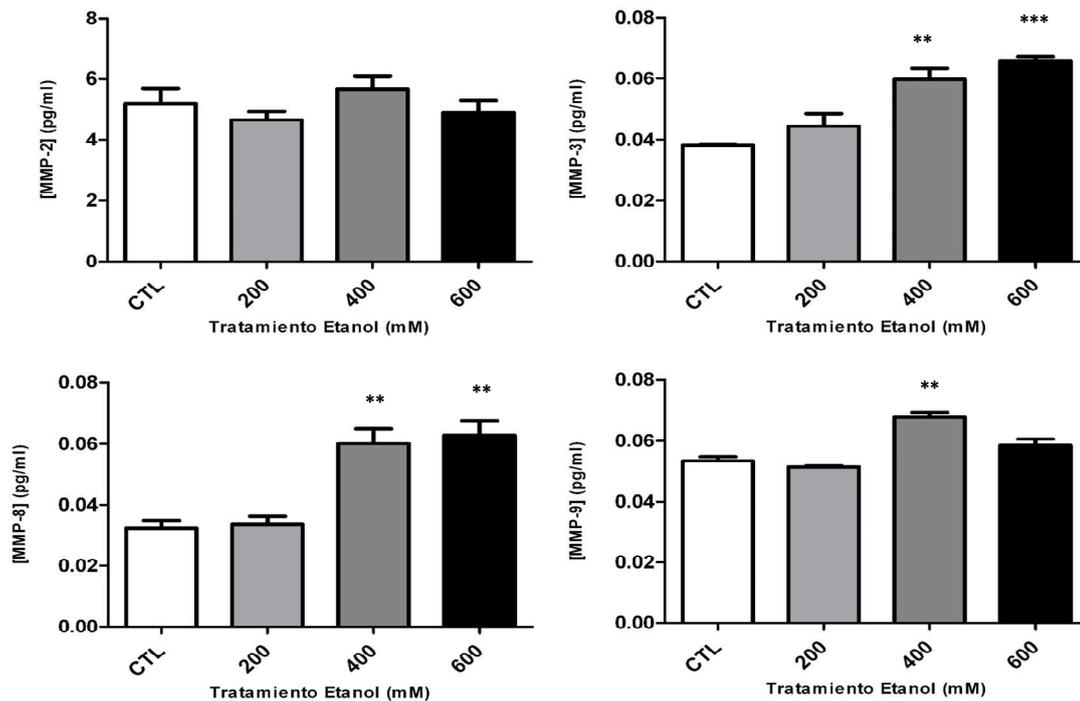
Los niveles de MMP-2 resultaron ser extremadamente superiores al resto de metaloproteinasas en todas las condiciones del estudio (**Tabla-1** y **Figura 17**). Algunas MMPs no presentaron cambios significativos tras 24 horas con el tratamiento con EtOH: MMP-1, MMP-2 y MMP-13.

Tanto MMP-3 como MMP-8 presentaron un aumento de la expresión estadísticamente significativa tras el tratamiento a 400 mM y 600 mM, **Figura 17**. MMP-3 presentó valores en torno a 0.06 y 0.07 pg/ml expresión, mientras que en el grupo control la expresión fue de 0.04 pg/ml. Además, los valores obtenidos resultaron ser estadísticamente significativos de  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , para 400 mM y 600 mM, respectivamente. Para MMP-8 obtuvimos valores de  $p < 0.01$  en ambas concentraciones, con una expresión de 0.06 pg/ml aproximadamente. La MMP-9 presentó un aumento de la expresión a 400 mM situándose en torno a 0.07 pg/ml ( $p < 0.01$ ) y, a una concentración de EtOH superior este aumento se ve revertido, aunque la expresión se mantiene por encima de la determinada para el grupo control y no presenta variación estadísticamente significativa (**Tabla 1**, y **figura 17**).

**Tabla1: Expresión de MMPs tras el tratamiento con EtOH**

|               | CTL        | 200 mM     | 400 mM        | 600 mM         |
|---------------|------------|------------|---------------|----------------|
| <b>MMP-1</b>  | 0,08082839 | 0,08678306 | 0,11666315    | 0,08425863     |
| <b>MMP-2</b>  | 5,19894286 | 4,65581536 | 5,68319835    | 4,90869389     |
| <b>MMP-3</b>  | 0,03813923 | 0,04447839 | ** 0,05965089 | *** 0,06586362 |
| <b>MMP-7</b>  | 0,00480181 | 0,00451448 | 0,00654021    | 0,00589047     |
| <b>MMP-8</b>  | 0,03245528 | 0,03366126 | ** 0,06008758 | ** 0,06279381  |
| <b>MMP-9</b>  | 0,05319047 | 0,05116843 | 0,06766616    | ** 0,05841234  |
| <b>MMP-13</b> | 0,02805804 | 0,02702502 | 0,03110206    | 0,02972249     |

La tabla muestra los niveles de expresión de MMPs tras el tratamiento con EtOH a 200mM, 400mM, 600 mM, así como los niveles de expresión obtenidos en el grupo control (sin tratamiento). El análisis estadístico se realizó con una prueba t \* $p < 0.05$ . Se realizó media  $\pm$  SEM. (n=3 para cada grupo).

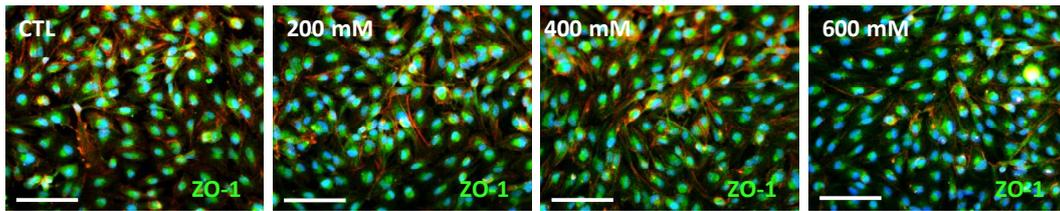
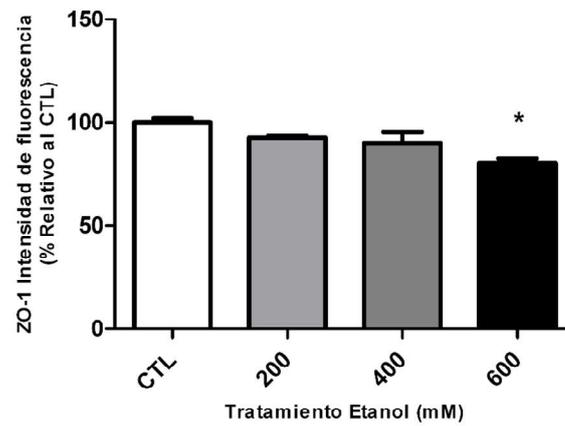


**Figura 17: Niveles de expresión de metaloproteinasas tras el tratamiento con EtOH. A)** Valores MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 y MMP-13 **B)** Representación gráfica de MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 y MMP-13. El análisis estadístico se realizó con una prueba t \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. Los puntos representan la media±SEM. (n=3 para cada grupo).

## 4.5 ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DE LAS UNIONES INTERCELULARES (TJ)

Teniendo en cuenta la importancia del EPR parte de la BH, quisimos finalizar este trabajo haciendo un análisis de la integridad de las uniones intercelulares en las ARPE-19 tras el tratamiento crónico con EtOH. Para ello se realizó una Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que se une a una de las proteínas más relevantes de las uniones intercelulares en el EPR, como es Z0-1, de color verde. Los filamentos intermedios de actina se tiñeron de color rojo con faloidina. (**Figura 18**).

Tal y como revela la **figura 18.A**, tras la obtención de las fotos y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia que estas mostraban, la gráfica de la **figura 18.B** muestra que existe una disminución en la expresión de esta proteína y, en consecuencia de la integridad de las TJ. El análisis estadístico de los resultados reveló que a 600 mM de EtOH hay una disminución significativa (p<0.05) de la expresión de esta proteína, situándose 20% por debajo del grupo control.

**A****B**

**Figura 18: Inmunofluorescencia de ZO-1 tras el tratamiento con EtOH. A)** Imágenes al microscopio de fluorescencia de células control (sin tratamiento), 200 mM, 400 mM y 600 mM de EtOH, respectivamente. **B)** Gráfica de la intensidad de fluorescencia de ZO-1 en células control, 200 mM, 400 mM y 600 mM de EtOH. El análisis estadístico se realizó con una prueba t \* $p < 0.05$ . Los puntos representan la media  $\pm$  SEM. (n=2 para cada grupo).

---

## V. DISCUSIÓN

---

## V. DISCUSIÓN

---

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que las células del EPR son células muy resistentes al estrés oxidativo (50,103). Los tratamientos con distintas concentraciones de etanol provocaron respuestas celulares diferentes como la expresión génica y proteica de un número de marcadores implicados en estrés oxidativo.

Es de importancia señalar que las concentraciones de etanol utilizadas, pese a ser más altas que en estudios realizados en otros modelos celulares como hepatocitos (104,105), debieron superar los 600 mM para provocar una muerte celular de manera significativa, (**Figura 14**). La exposición a dosis de etanol no letales (200 y 400 mM) parece no afectar aparentemente a la morfología celular, **figura 14.A**. Sin embargo, como se puede observar en la **figura 14.B** existe una disminución en la viabilidad celular significativa a altas dosis de etanol (1200 mM de EtOH). Por otro lado, al igual que en otros modelos celulares, concentraciones subletales de EtOH (600 mM) promueven alteraciones celulares que se encuentran relacionadas con la mitofagia y agregación de proteínas en las células ARPE-19 (106).

Datos obtenidos en estudios con cultivos primarios de astrocitos de rata demuestran que la reducción de la viabilidad se ve reducida únicamente a altas dosis de etanol (a partir de 700 mM). Esto ocurre, al igual que en nuestro caso, debido a que los astrocitos son células muy resistentes al estrés oxidativo, ya que poseen una gran capacidad antioxidante (107).

Diversos estudios han demostrado que existe una diferencia entre la sensibilidad de las células de los cultivos primarios de hRPE y las células ARPE-19 al tratamiento con etanol (90). De acuerdo con Brossas y colaboradores, ambos tipos celulares muestran un efecto deletéreo a 1200 mM EtOH, sin embargo, en las células hRPE se observa una importante reducción de la viabilidad a 400 mM EtOH (50).

Nuestros resultados demuestran que la línea celular ARPE-19 pese a ser un modelo ampliamente utilizado para estudios de EPR tiene sus limitaciones. Estas células son particularmente resistente a los efectos tóxicos producidos por EtOH, lo que concuerda con lo indicado por otros autores (43,50). Este hecho podría explicarse debido a las características, tanto funcionales como estructurales que posee el RPE y a su expresión constitutiva del CYP2E1, que podría explicar su resistencia a los xenobióticos y los agentes tóxicos, en el caso del tratamiento con etanol (50).

Otro de los resultados que se suma a lo dicho anteriormente, es el obtenido tras la medición del ROS intracelular, **figura 14.C**. En el estudio realizado, se muestran como el insulto con etanol es capaz de aumentar la generación de ROS en las células del RPE. Existen estudios que avalan que el metabolismo de etanol, mediado por la actividad del citocromo CYP2E1, aumenta los niveles de ROS en hígado (108,109), ya que, la ingesta aguda o crónica de alcohol puede aumentar la actividad de esta enzima incluso 10 veces (110).

Este aumento en la producción de ROS tras un insulto con EtOH también ha sido determinado en otros tipos celulares del sistema nervioso central (111,112,113).

Además, ha sido publicado recientemente que la exposición a EtOH es capaz de activar el metabolismo de CYP2E1 de en células ARPE-19, así como en cultivos humanos primarios y, que la producción de ROS se ve disminuida al emplear un inhibidor específico de este (50). Por otro lado, algunos autores afirman que las enzimas CYP1B1, CYP4B1 y CYP4V2 también presentan una función relevante en ojo (110).

Como se ha podido ver anteriormente, existe una gran variedad de trabajos que estudian las consecuencias del aumento de ROS sobre las diferentes vías de señalización celular, concretamente sobre las modificaciones en marcadores de hipoxia e inflamación (52,53,54,55,56). Además ambos procesos están íntimamente ligados con la neovascularización y/o angiogénesis, uno de los principales problemas de las enfermedades que afectan a la retina como la DMAE y la RD (57,58,59).

Los resultados que se muestran en la **figura 15** podemos observar que existen modificaciones en marcadores angiogénicos debidos al tratamiento con EtOH. Además, 200 mM parece ser una concentración crítica, ya que la gran mayoría de los marcadores aumentan o disminuyen su expresión a partir de esta concentración, (**Figura 15.C**). No sólo estos marcadores se ven afectados por el tratamiento con alcohol, también otras proteínas implicadas en el mantenimiento de la BH se han visto afectadas como son las MMPs (**Figura 17**) y ZO-1. (**Figura 18**).

Según nuestros datos la expresión de VEGF-A se ve disminuida tras el tratamiento con EtOH, **figura 15.B** y **figura 15.A**. Como se puede observar en ambas figuras, 600 mM da lugar a una disminución significativa de la expresión de RNAm y de la proteína. Estudios previos han considerado a VEGF como un potente factor proangiogénicos (114,115,116), ya que induce activación, migración y proliferación de células endoteliales hasta, finalmente lograr la formación capilar. Para ello es requerida la acción de diferentes enzimas entre las que destacan el sistema plasmina y las MMPs. La enzima clave para que tenga lugar la unión célula-plasmina parece ser uPA (117). La proteína uPA ejerce su efecto uniéndose uPAR. Además uPA y su homólogo, tPA, son capaces de convertir el plasminógeno a plasmina, una serinproteínasa capaz de degradar constituyentes de la MEC (74). Parece ser que uPAR se encuentra implicado en la angiogénesis patológica y, se ha demostrado que anticuerpos anti-uPAR son capaces de bloquearla angiogénesis en la córnea. Además, La unión uPA-uPAR activa MMPs, rompiendo componentes de la MEC (74).

Como se puede ver en la **figura 15.B**, nuestros resultados muestran como uPA presenta un aumento de su expresión. Este dato, en principio podría resultar contradictorio con la disminución de VEGF, sin embargo, el VEGF que se ha medido en este trabajo hace referencia a la isoforma A, la más estudiada. Es posible que uPA, se encuentre relacionada con alguna de las isoformas alternativas de VEGF, como pueden ser VEGF-B, VEGF-C o VEGF-D, por lo que los resultados no resultan concluyentes.

En cuanto a TGF-  $\beta$ 1 (LAP), (**Figura 15.B**), observamos una disminución tras el tratamiento de EtOH. Su función reguladora en la formación de nuevos vasos resulta complicada y controvertida, ya que se ha visto implicado en diferentes vías de señalización

(118,119). Esta proteína ha sido estudiada en diversos tipos de cáncer de células epiteliales (120) y, mientras unos estudios avalan su función como un supresor tumorigénico, otros afirman que actúa promoviendo la formación del tumor (121).

Estudios previos en córnea muestran que este factor responde a los estímulos de manera dosis dependiente y, aumenta la respuesta angiogénica activando VEGF. Además, su activación también se encuentra implicada en una respuesta inflamatoria (119).

Por otro lado, se ha demostrado que las proteasas, como la plasmina, MMP-2 y MMP-9 son capaces de activar TGF- $\beta$ 1, promoviendo la degradación de la MEC (122). Además, esta proteína también puede ser activada por ROS, lo que le permitiría activar uPA, así como NF $\kappa$ B (123,124). Upa, a su vez, también presenta la capacidad de activar TGF- $\beta$ 1 (74).

Tras todo lo mencionado, en nuestro estudio esta proteína presentaría su potencial angiogénico disminuido. Este dato se encontraría en concordancia con lo sucedido en VEGF-A. Sin embargo, la proteína uPA presenta aumentada su expresión, lo que nos lleva a plantearnos de nuevo que quizá nos encontremos ante la activación de uPA por una variante de VEGF diferente.

Los resultados de la **figura 15.B**, indican también que, TIMP-1 se encuentra aumentado. Como hemos indicado VEGF requiere para su acción angiogénica algunas enzimas como las MMPs. TIMP-1 es un inhibidor natural de las MMP. Un correcto balance entre este y las MMP es necesario para el mantenimiento de la integridad de los componentes de la MEC. Diversos autores afirman que la modificación de los componentes de la MEC da lugar a reacciones inflamatorias y participa en la secreción de MMPs (125). El hecho de que observemos un aumento de TIMP-1 podría estar indicándonos que se ha producido un daño en la MEC.

Otros dos marcadores que muestran una clara modificación mediada por el EtOH son el HGF y el FGF-7, ambos se encuentran disminuidos a 600 mM, (**Figura 15.B**). El HGF es secretado por las células durante la inflamación. Algunos estudios demuestran que es capaz de promover la proliferación, activación y diferenciación de células endoteliales y epiteliales durante la angiogénesis en enfermedades del intestino (126,127,128). Nuestros resultados muestran una clara disminución del nivel de expresión de HGF, tanto a 400 mM como a 600 mM de EtOH, por lo que contribuiría a la disminución de la angiogénesis. Este dato va en concordancia con la disminución de VEGF.

Por otro lado, la disminución FGF-7, factor implicado en fenómenos de reparación bajo condiciones de hipoxia (68), nos podría estar dando una pista de que nuestro modelo de respuesta al EtOH se ve modificado hacia fenómenos de inflamación, descartando los marcadores de hipoxia como principales actores en la angiogénesis. Estudios previos demuestran que existen diferencias significativas en la expresión de citoquinas inflamatorias en diferentes tipos de neoplasias, encontrándose entre estas una disminución de FGF-7 (129). Por tanto, nuestros resultados sugerirían que la disminución de esta proteína se debe encontrar relacionada de manera directa con un aumento de la inflamación.

Durante toda la discusión se pone de manifiesto la hipótesis de que existe un desequilibrio a favor de los marcadores inflamatorios a determinadas concentraciones de EtOH. Esta hipótesis se ve reforzada puesto que en nuestros resultados observamos una serie de marcadores angiogénicos que sufren un aumento o disminución acusada de su expresión a partir de una concentración de 200 mM, **figura 15.C**.

Esta concentración, la más baja empleada, apenas genera ROS y tampoco provoca una disminución en la viabilidad celular de manera significativa, (**Figura 14**). Sin embargo, según Atienzar-Aroca y colaboradores (94), bajas concentraciones de EtOH, concretamente 80 mM dan lugar a un aumento de marcadores angiogénicos en el cargo de exosomas aislados de ARPE-19 (94). Esto se traduce en un proceso angiogénico en células endoteliales.

Como se mencionaba con anterioridad, encontramos una clara disminución de IL- $\beta$  a 200 mM de EtOH, **figura 15.C**, seguida de un claro aumento de su expresión a partir de la misma, respecto al grupo control. Estudios previos afirman que VEGF interactúa con IL- $\beta$ 1 en la respuesta angiogénica e inflamatoria (129,130) y que es capaz de activar la expresión de algunas MMPs (131), como MMP3 (132). Además otros autores afirman que es capaz de inducir la progresión de tumores ya que contribuye al aumento de la vascularización (133).

Nuestros resultados, por tanto, sugieren, que a partir de 200 mM de EtOH se encuentra activada la cascada inflamatoria. En relación a la vascularización este dato concuerda junto a los datos anteriores, con una disminución de la angiogénesis.

Otro de los marcadores que se ve afectado por nuestro tratamiento es la vasoinhibina. Está considerada un inhibidor endógeno de la angiogénesis (134), ya que es capaz de inhibir VEGF, así como la proliferación de células endoteliales. Además activa la apoptosis de células endoteliales, causando la regresión de los vasos sanguíneos (135). En ojo también ha sido demostrado su carácter antiangiogénico y, alteraciones de sus niveles pueden estar vinculadas a enfermedades neovasculares, tales como la retinopatía prematura (136). Nuestros resultados muestran un claro pico de expresión a 400 mM, **figura 15.C**, lo que sugiere que a esta concentración la vasoinhibina activaría el mecanismo inhibitorio de la angiogénesis.

Un marcador retiniano antiangiogénico por excelencia es el PEDF, secretado por el propio EPR. Es considerado como un potente neurotrópico y una proteína antiinflamatoria que protege las neuronas de la retina y los fotorreceptores frente a la muerte celular (26,137,138). Además, es un potente antiangiogénico capaz de inhibir a VEGF (26,27,139,140,141,142). Esta inhibición se realizaría mediante su unión al VEGFR2 o promoviendo la proteólisis de VEGFR2 mediante la activación de la  $\alpha$ -secretasa (29,143). Nuestros datos muestran un aumento en 200 mM, seguido de una disminución, **Fig. 16C**. Esto, en principio, sería contradictorio con datos obtenidos, ya que muestra una disminución de un factor inhibitorio de la angiogénesis, pero su explicación podría justificarse debido a que las células del EPR secretan PEDF por su parte apical, mientras que VEGF es secretado por la parte basolateral y, en nuestro estudio las células no fueron polarizadas (13). Este hecho podría interferir en nuestros resultados con respecto a PEDF, ya que, tras todo lo comentado anteriormente se esperaría un aumento de este factor.

Uno de los marcadores que no entra en concordancia con los datos anteriores mostrados, es TSP-1. Podemos observar una gráfica similar a las anteriores, **figura 15.C**. Un aumento, hasta 200 mM de EtOH de su expresión y un descenso, incluso por debajo de los niveles control a 600 mM.

TSP-1 ha sido definida como un inhibidor endógeno de la angiogénesis (144,145,146,147,120). La inhibición de la angiogénesis por esta glicoproteína produce efectos directos sobre la migración y supervivencia de las células endoteliales, e indirectos como es la disminución de VEGF. Es secretado en respuesta a inflamación y facilita la fagocitosis de las células dañadas (147,148).

Este resultado contrapuesto a lo esperado, nos muestra como la angiogénesis es una ruta en la que confluyen diferentes vías de señalización celular que se ven afectadas por el aumento de ROS. Quizás existe un mecanismo alternativo que pudiera dar una respuesta favorecedora a los resultados previos, pero hasta ahora no la hemos podido determinar.

Como mencionábamos al comienzo de esta discusión, no sólo han sido afectados los marcadores angiogénicos por el tratamiento con EtOH. Los resultados obtenidos mediante la realización del ELISA, **figura 17**, muestran un aumento de la expresión de MMP-3 y MMP-8 de manera dependiente a la concentración empleada. La MMP-9 solo muestra un incremento significativo a la concentración más alta de EtOH. En cuanto a MMP-2 observamos una mayor expresión de esta que del resto, aunque tras el tratamiento no observamos cambios significativos en su expresión.

Las MMPs parecen ser proteínas características de enfermedades inflamatorias crónicas (149). Además, existen estudios que afirman que tanto las citoquinas producidas durante procesos inflamatorios, como el estrés oxidativo puede resultar en la activación de MMPs (150). Estudios realizados en células de EPR maduras han revelado que en condiciones normales estas células expresan MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en bajas concentraciones (151). Por otro lado, se ha demostrado que la producción de MMPs puede ser activada por ROS (151,152,153).

Con respecto a MMP-2 podemos decir que su implicación en los procesos inflamatorios, así como su efecto sobre la degradación de MEC ha resultado ser bastante controvertido, de acuerdo con estudios previos. Unos estudios afirman que se encuentra implicada en procesos inflamatorios crónicos, contribuyendo a la inhibición de la degradación de la MEC, bloqueando el efecto de MMP-9. Otros sin embargo, no la encuentran aumentada en enfermedades inflamatorias, ya que esta presentaría una expresión constitutiva, frente a la expresión de otras MMPs, como la MMP-9, que resultan ser más sensibles a ROS y a citoquinas inflamatorias (150)(154). Nuestros resultados, **figura 17.B**, parecen reforzar la afirmación de que MMP-2 se encuentra expresada de manera constitutiva, ya que a pesar de presentar una expresión más elevada que el resto de MMPs esta expresión no presenta variaciones significativas tras la exposición a nuestro tratamiento.

En cuanto a MMP-3, su elevada expresión observada tras nuestro tratamiento (**Figura 17.B**) se relacionaría, por tanto, con la producción de ROS debido al tratamiento con EtOH y, además la matriz extracelular podría encontrarse degradada.

Estudios previos en cáncer revelan la existencia de un promotor llamado Snail, el cual poseería un sitio de unión para NF-KB, y este, sería necesario para la activación de MMP-3 inducida por ROS (153). Por otro lado, niveles elevados de esta proteína se han visto implicados en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y osteoartritis (155,156,157,158).

La MMP-3, así como la MMP-9 también ha sido identificada en la enfermedad de Crohn que cursa con inflamación (159,160). En ojo, la producción de MMP-3 se encuentra inducida por ROS (161) y presenta capacidad para degradar varios tipos colágeno, así como proteínas de matriz no colágenas, la mayor parte de los cuales se encuentran en la MEC que rodea al EPR y la membrana de Bruch (158).

Otra proteína que vemos elevada es la MMP-8, (**Figura 17.B**). Esta se encuentra asociada a la producción de inflamación en diferentes enfermedades de pulmón, cáncer, enfermedades de hígado, enfermedades oculares, etc. (162,163).

Sin embargo, en enfermedades pulmonares MMP-8 parece disminuir la inflamación, pero promueve que el tejido se vuelva fibrótico (164). Nuestros datos muestran un aumento de la expresión de esta MMP, y de acuerdo con la producción de proteínas inflamatorias producidas tras el tratamiento con EtOH en nuestro estudio esta proteína jugaría un importante papel en la inflamación.

El aumento en la expresión de la MMP-9 con el tratamiento de EtOH, **figura 17.B** podría ser debido al aumento de los marcadores inflamatorios en nuestro modelo celular. Esto podemos suponerlo ya que la MMP-9 se ha visto implicada en enfermedades oculares como DMAE, así como en daños producidos por ROS (165) e hipoxia (166). Además, como hemos indicado anteriormente esta metaloproteinasas se encuentra implicada en procesos inflamatorios (150,154,159,160).

La expresión de MMP-9 es baja en tejidos sanos y su expresión se ve elevada durante lesiones inflamatorias, autoinmunes, degenerativas, neoplásicas y angiogénicas (167). Existen estudios que afirman que la producción de ROS promueve la expresión de TGF- $\beta$ 1 que induce la activación de NFkB, y este activaría uPA y la MMP-9 (123).

Tras el tratamiento con EtOH, podemos observar una mayor producción de ROS, (**Figura 14.C**), así como de MMP-9 (**Figura 17.B**) y uPA (**Figura 15.B**), sin embargo, observamos una disminución de la expresión de TGF- $\beta$ 1 (**Figura 15.B**). Esto nos lleva a plantearnos que quizá tras nuestro tratamiento se active NF-kB mediante una vía diferente. Por otro lado, existen estudios que afirman la existencia de un “feedback” positivo en la regulación de MMP-1, MMP-2 y VEGF (168). Nuestros datos no indican la existencia de este “feedback” negativo con respecto a VEGF-A, pero no podemos afirmar que esta no exista con otro tipo de VEGF, ya que no han sido medidos.

En enfermedades oculares, la degradación de la MEC se encuentra asociada a MMP-1, ,MMP-2, MMP3, MMP-8 y MMP-9 y, su inhibidor TIMP-1, también encuentra elevada su expresión intentando mantener la homeostasis fisiológica (168).

Además, algunos estudios revelan la implicación de la ruta PI3K/Akt en la activación de MMPs lo que produciría una cascada de señalización que implicaría diferentes proteínas como mTOR, NFκB, GSK-3β y p53 (169). Además estas pueden ser reguladas por varias citoquinas entre las que encontramos factores de crecimiento como TGF-α, TNFα y la IL-β (125,170).

Los datos obtenidos y la relación entre todos ellos, nos llevan a plantearnos que alguna de estas proteínas pueda estar implicada en la respuesta celular producida tras el tratamiento con etanol, orquestando así, toda la respuesta celular.

Además debemos ser conscientes que el aumento de estrés oxidativo mediado por etanol afecta a la permeabilidad de la membrana (171,172,173,174). Podemos corroborar esto, ya que el tratamiento con etanol, provocó una disminución en la expresión de ZO-1, **figura 18**. Este hecho es avalado por estudios previos que afirman la relación existente entre un aumento MMP-9 y la degradación de las tight junction, afectando principalmente a la expresión de ZO-1 (175,176,177).

Como ya hemos comentado, la angiogénesis juega un papel importante en las diferentes retinopatías. El desarrollo de nueva vasculatura durante la inflamación daría lugar a la arquitectura de vasos disfuncionales y un incremento de células inflamatorias. Además, la inhibición angiogénica durante enfermedades que cursan con inflamación crónica atenúa la formación de inflamación y la patología de la enfermedad (126).

Debemos aclarar que la formación de nuevos vasos incluye angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de capilares preexistentes), vasculogénesis (formación de capilares de novo a partir de células madre endoteliales derivadas de la médula ósea), extravasación a partir de vasos preexistentes (vessel cooption) (144,178).

Cuando el balance favorece los factores proangiogénicos la angiogénesis se activa, produciendo la activación de células endoteliales, proliferación, migración degradación de la MEC y la formación de capilares. Además, los capilares recién formados tienen una estructura tortuosa y desorganizada y, una funcionalidad diferente de los vasos sanguíneos normales (144). Esto nos lleva a reflexionar sobre todos los resultados extraídos del array de angiogénesis ya que el aumento de la expresión de uPA resulta contradictorio al resto de datos obtenidos. Esto podría sugerir que el tratamiento con EtOH estaría provocando una disfunción en la formación de nuevos vasos, ya que como hemos indicado la formación de nuevos vasos sanguíneos no se produce únicamente debido a un proceso angiogénico.

En relación con la hipótesis, 200 mM podría ser el punto en la que se perdiera el balance angiogénico, cabe volver a señalar el resultado de la **figura 16.A**. Este resultado apoyaría junto con los anteriores (**Figura 15.C**) que existe un desequilibrio de la angiogénesis a una concentración de etanol determinada. Donde a diferencia de la expresión proteica (**Figura 15.A**), la expresión de RNAm sí se vio aumentado a 200 mM de EtOH.

Nuestros resultados de la **figura 16.B**, muestran una disminución muy acusada de VEGFR1. También observamos una disminución de la expresión de VEGFR2, aunque en este caso resultar ser menos significativa que la disminución observada en VEGFR1.

Por tanto, de acuerdo con los resultados previos, la disminución de la expresión de VEGF-A, **figura 15.B y 16.A**, así como la de sus receptores estaría confirmando que el tratamiento a altas concentraciones de EtOH produce una disminución de la angiogénesis.

Existen estudios que demuestran que en condiciones de hipoxia e isquemia se produce una sobre expresión de VEGFA (178,179,180). Además, cambios asociados con la angiogénesis contribuyen de forma importante en el proceso de lesión y remodelación de los tejidos y, inevitablemente, esto se encuentra acompañado de inflamación crónica (181). Diversos autores afirman que la sobreexpresión de VEGFA induce la expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en diferentes enfermedades como aterosclerosis, artritis, diabetes, sepsis, psoriasis e inflamación vascular (180,181,182,183).

Teniendo en cuenta que VEGF-A se produce en situación de hipoxia o isquemia y de acuerdo con la gran mayoría de los autores, quizá en nuestro estudio no nos encontremos ante una situación de hipoxia.

Esta suposición se encontraría respaldada por el hecho de que la proteína uPA encuentra aumentada su expresión tras el tratamiento con EtOH, resultado que parece ser contradictorio con el resto de datos obtenidos y, que nos lleva a plantearnos que otros tipos de VEGF pueden encontrarse implicados en la reacción producida tras nuestro tratamiento con EtOH. Además, la regulación de la angiogénesis, según el contexto fisiológico, condiciones de hipoxia o inflamación, en el que se encuentre el tejido ya ha sido descrita en estudios con HDL (184).

---

## VI. CONCLUSIONES

---

## VI. CONCLUSIONES

---

1. El tratamiento crónico de EtOH a altas concentraciones disminuye la viabilidad en las células ARPE-19.
2. El tratamiento con EtOH de manera crónica da lugar al aumento de ROS en las células ARPE-19.
3. La expresión de marcadores antigénicos, en células ARPE-19, se ve modificada tras un tratamiento crónico con EtOH. 200 mM de EtOH resultó ser la concentración crítica para la modificación en la expresión de marcadores antiangiogénicos.
4. Existe una disminución de la expresión proteica en los receptores 1 y 2 de VEGF en ARPE-19, tras un tratamiento crónico con EtOH.
5. La expresión del factor de crecimiento VEGF liberado por las células ARPE-19, se vio aumentado tras la exposición de manera crónica a 200 mM de EtOH, este aumento se vio revertido a 600 mM de EtOH.
6. El tratamiento crónico con EtOH provoca modificación en la expresión de MMPs. Altas concentraciones de EtOH aumentan la expresión de MMP-3, MMP-8, MMP-9 en las células ARPE-19.
7. Existe una pérdida de la integridad de las uniones intercelulares en las células ARPE-19, tras el tratamiento crónico con EtOH.

---

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Ceguera y discapacidad visual: nota descriptiva n° 282. 2014.
2. National Eye Institute [Internet]. 2016. [https://nei.nih.gov/eyedata/vision\\_impaired](https://nei.nih.gov/eyedata/vision_impaired)
3. Rajendra AU, Kannathal N, Ng EYK, Min LC, Suri JS. Computer-based classification of eye diseases. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol - Proc.* 2006;6221–4.
4. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Vision Health Initiative (VHI). 2016. [http://www.cdc.gov/visionhealth/basic\\_information/vision\\_loss\\_burden.htm](http://www.cdc.gov/visionhealth/basic_information/vision_loss_burden.htm)
5. Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3073–83.
6. Benhar I, London A, Schwartz M. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Front Immunol.* 2012;3:296.
7. Perez VL, Saeed AM, Tan Y, Urbietta M, Cruz-Guilloty F. The eye: A window to the soul of the immune system. *J Autoimmun.* 2013;45:7–14.
8. Graue Wiechers E. El ojo: estructura y función. *Oftalmol en la Pract la Med Gen.* 2009;1–13.
9. Puell M. Óptica Fisiológica: el sistema óptico del ojo y la visión binocular. 2006; p.307.
10. Mitchell ENM & Susan J. Marieb, E.N. & S. Mitchell, 2011. *Human Anatomy and Physiology Laboratory Manual.* 11th. Pearson Benjamin Cummings; 2012.
11. Hildebrand GD, Fielder AR. *Pediatric Retina.* 2011.
12. Flores-Bellver M. *Retinal Pigment Epithelium: A major role in retinal oxidative stress.* 2014. Universidad Católica de Valencia. Tesis doctoral.
13. Universitaria RD. El epitelio pigmentario retiniano como componente de la barrera hemato-retiniana : implicación en la retinopatía diabética. 2011;1–13.
14. Choroid THEM. *NIH Public Access.* 2011;29(2):144–68.
15. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M. Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *Am J Ophthalmol.* Elsevier Inc.; 1996;121(2):181–9.
16. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev.* 2005;845–81.
17. The Angiogenesis Foundation [Internet]. 2016. <http://www.angio.org/>.
18. Cunha-Vaz J, Rui Bernardes CL. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol.* 2011;21(6):3–9.
19. Hamann S. Molecular Mechanisms of Water Transport in the Eye. *Int Rev Cytol.* 2002;215:395-431.

20. Liu Y, Zhang D, Wu Y, Ji B. Docosahexaenoic acid aggravates photooxidative damage in retinal pigment epithelial cells via lipid peroxidation. *J Photochem Photobiol B Biol.*; 2014;140:85–93.
21. Nandakumar N, Buzney S, Weiter JJ. Lipofuscin and the principles of fundus autofluorescence: a review. *Semin Ophthalmol.* 2012;27(5-6):197–201.
22. Nakazawa T, Kitaoka Y, Harada T. Neuroprotection and neuroregeneration for retinal diseases. *Neuroprotection Neuroregeneration Retin Dis.* 2014;1–356.
23. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet.*; 2010;11(4):273–84.
24. MP V-P. Exposición a la luz, lipofuscina y degeneración macular asociada a la edad. *Arch la Soc Española Oftalmol.* 2005;80 (10)(0365-6691):565–7.
25. Perusek L, Maeda T. Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases. 2013;2646–66.
26. He X, Cheng R, Benyajati S, Ma J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin Sci.* 2015;128(11):805–23.
27. Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.*; 2013;13(4):258–71.
28. Subramanian P, Locatelli-Hoops S, Kenealey J, DesJardin J, Notari L, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents retinal cell death via PEDF receptor (PEDF-R): Identification of a functional ligand binding site. *J Biol Chem.* 2013;288(33):23928–42.
29. Ablonczy Z, Prakasam A, Fant J, Fauq A, Crosson C, Sambamurti K. Pigment epithelium-derived factor maintains retinal pigment epithelium function by inhibiting vascular endothelial growth factor-R2 signaling through  $\gamma$ -secretase. *J Biol Chem.* 2009;284(44):30177–86.
30. Yl-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular Endothelial Growth Factors. *Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine.* *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(10):1015–26.
31. Sa-nguanraksa D, O-charoenrat P. The role of vascular endothelial growth factor A polymorphisms in breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14845–64.
32. Choi H, Jung J, Name S, Lee J, Byon I, Seo J. The effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on human orbital preadipocyte. *Orbit.* 2015;6830(November):1–5.
33. American Type Culture Collection. Angiogenesis [Internet]. 2016. [http://www.lgcstandardsatcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/](http://www.lgcstandardsatcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/).
34. Wang H, Geisen P, Wittchen ES, King B, BurrIDGE K, D'Amore PA, et al. The role of RPE cell-associated VEGF189 in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):570–8.
35. Sharma K, Sharma NK, Singh R, Anand A. Exploring the role of VEGF in Indian age related macular degeneration. *Ann Neurosci.* 2015;22(4):232–7.
36. Courtenay MD, Cade WH, Schwartz SG, Kovach JL, Agarwal A, Wang G, et al. Set-based joint test of interaction between SNPs in the VEGF pathway and exogenous estrogen

- finds association with age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(8):4873–9.
37. Hagstrom SA, Ying G, Pauer GJT, Sturgill-Short GM, Huang J, Maguire MG, et al. VEGFA and VEGFR2 gene polymorphisms and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy: comparison of age-related macular degeneration treatments trials (CATT). *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(5):521–7.
  38. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A Common Polymorphism in the 5' Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2002;51:1635–9.
  39. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF Gene with Proliferative Diabetic Retinopathy but Not Proteinuria in Diabetes. *Diabetes.* 2004;53(3):861–4.
  40. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J.* 2013;7:4–10.
  41. Article R, Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. 2015;24(4):325–40.
  42. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991;91(3C):31S – 38S.
  43. Flores-Bellver M, Bonet-Ponce L, Barcia JM, Garcia-Verdugo JM, Martinez-Gil N, Saez-Atienzar S, et al. Autophagy and mitochondrial alterations in human retinal pigment epithelial cells induced by ethanol: implications of 4-hydroxy-nonenal. *Cell Death Dis.;* 2014;5(7):e1328.
  44. Elsa C. Chan G-SL and GJD. Redox mechanisms in pathological angiogenesis in the retina: roles for NADPH oxidase. *Curr Pharm Des.* 2015;21(41):5988–98.
  45. Kruk J, Kubasik-Kladna KY, Aboul-Enein H. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16 (3):241–57.
  46. Gefen A, Aviv R. Mechanical and Chemical Signaling in Angiogenesis, Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. C. A. Rein. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.
  47. Wang L, Kondo N, Cano M, Ebrahimi K, Yoshida T, Barnett BP, et al. Nrf2 signaling modulates cigarette smoke-induced complement activation in retinal pigmented epithelial cells. *Free Radic Biol Med.;* 2014;70:155–66.
  48. M. Shida, Y. Kitajima, J. Nakamura, K. Yanagihara, K. Baba, K. Wakiyama HN. Impaired mitophagy activates mtROS/HIF-1 $\alpha$  interplay and increases cancer aggressiveness in gastric cancer cells under hypoxia. *Int J Oncol.* 2016.
  49. Ashlyn C. Harmon, Denise C. Cornelius, Lorena M. Amaral, Jessica L. Faulkner, Mark W. Cunningham Jr, Kedra Wallace BL. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci.* 2016;130 (6):409–19.
  50. Martinez-Gil N, Flores-Bellver M, Atienzar-Aroca S, Lopez-Malo D, Urdaneta AC, Sancho-Pelluz J, et al. CYP2E1 in the human retinal pigment epithelium: Expression, activity, and induction by ethanol. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(11):6855–63.
  51. Barth BM, Stewart-Smeets S, Kuhn TB. Proinflammatory cytokines provoke oxidative

damage to actin in neuronal cells mediated by Rac1 and NADPH oxidase. *Mol Cell Neurosci.*; 2009;41(2):274–85.

52. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428–35.
53. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2012;43(1):120913143848009.
54. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(7):1126–67.
55. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990;75(1):40–7.
56. Armstrong AW, Voyles S V., Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. Angiogenesis and oxidative stress: Common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci. Japanese Society for Investigative Dermatology;* 2011;63(1):1–9.
57. Mateos M V, Tenconi PE, Giusto NM, Salvador GA. Ophthalmology and Clinical Research Inflammation and Oxidative Stress in Retinal Diseases: The Role of Intracellular Signaling in the Retinal Pigment Epithelium. *Int J Ophthalmol Clin Res* 2015, 2:3.
58. Blasiak J, Petrovski G, Verb Z, Facsk A, Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
59. Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(10):597–615.
60. Angosto MC, Álvarez-Gómez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An la Real Acad Nac Farm.* 2010;76(1):59–84.
61. Manzanaro PG. Filtros contra el efecto fototóxico del espectro visible en la retina. *Experimentación animal.* 2010.
62. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261–74.
63. Plafker SM. Retinal Degenerative Diseases. *Medicine (Baltimore).* 2010;664:447–56.
64. Blasiak J, Petrovski G, Ver Z, Facsk A, Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
65. Guanter VR. Estudio del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG) y del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGA) en la patología benigna y maligna de la próstata. *Universitat de Valencia.* 2005. Tesis doctoral.
66. Martínez-Ezquerro JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 2006;1:83–96.
67. Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol*

68. Taylor KK, Rudisill JA, Gallo RL. Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5300–6.
69. Zhang J, Middleton KK, Fu FH, Im HJ, Wang JHC. HGF Mediates the Anti-inflammatory Effects of PRP on Injured Tendons. *PLoS One.* 2013;8(6) e67303.
70. Waluga M, Kukla M, Żorniak M, Kochel-jankowska A. Visfatin and TGF- $\beta$ 1 in primary biliary cirrhosis and two other common liver diseases. 2015, 55(4):59-70.
71. Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T, Nagatsuma K, Dohmae N, et al. LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- $\beta$  activation in patients with hepatic fibrosis. *Springerplus.* 2014;3:221.
72. Jiménez Cuenca B. Mecanismo de inhibición de la angiogénesis tumoral por trombospondina-1. *Nefrología.* 2003;23(SUPPL.3):49–53.
73. Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, Pins MR, Campbell SC, Bouck NP. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate.* 2001;49(4):293–305.
74. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(12):932–43.
75. Martínez-Hezquerro JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 2006;1:83–96.
76. Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(2):324–9.
77. Omri S, Omri B, Savoldelli M, Jonet L, Thillaye-Goldenberg B, Thuret G, Gain P, Jeanny PC and FB-C. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:183–95.
78. Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmari E, et al. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):129–39.
79. Room R, Babor T, Rehm J. Review Alcohol and public health. *Lancet.* 2005;365:519–30.
80. Guo R, Jun R. Alcohol and acetaldehyde in public health: From marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(4):1285–301.
81. Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, et al. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009;32(11):2123–32.
82. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 2009;83(6):519–48.
83. Chen Y, Cui L, Liao J, Huang L. Effects of alcohol on bone metabolism and biomechanical property of mice. *J Biomed Eng.* 2009;26:780–2.

84. George A. & Figueredo VM. Alcohol and arrhythmias: a comprehensive review. *J Cardiovasc Med.* 2010;11:221–8.
85. Marinho, V., Laks, J., Engelhardt, E. & Conn D. Alcohol abuse in an elderly woman taking donepezil for Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol* 26. 2006;26:683–5.
86. Morrix JM. Alcohol breath testing. *BMJ.* 1990;45:717–21.
87. Ohkubo T, Metoki H, Imai Y. Alcohol intake, circadian blood pressure variation, and stroke. *Hypertension.* 2009;53(1):4–5.
88. Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):38–41, 44–7.
89. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis.*; 2012;16(4):667–85.
90. Barcia JM, Flores-Bellver M, Muriach M, Sancho-Pelluz J, Lopez-Malo D, Urdaneta AC, et al. Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
91. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev.* 2013;71(7):483–99.
92. Lechanteur YTE, van de Camp PL, Smailhodzic D, van de Ven JPH, Buitendijk GHS, Klaver CCW, et al. Association of Smoking and CFH and ARMS2 Risk Variants With Younger Age at Onset of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(5):533–41.
93. Patel AK, Newcomb CW, Liesegang TL, Pujari SS, Suhler EB, Thorne JE, et al. Risk of Retinal Neovascularization in Cases of Uveitis. *Ophthalmology*; 2015;1–9.
94. Atienzar-Aroca S, Flores-Bellver M, Serrano-Heras G, Martinez-Gil N, Barcia JM, Aparicio S, Perez-Cremades D, G-Verdugo JM, Diaz-Llopis M, Romero FJ, Sancho-Pelluz FJ. Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2016.*In press.*
95. Kuznetsova A V., Kurinov AM, Aleksandrova MA. Cell Models to Study Regulation of Cell Transformation in Pathologies of Retinal Pigment Epithelium. *J Ophthalmol.* 2014.
96. Ciano P Di, Grandy D, Foll B Le, Addiction T, Health M, Health O, et al. *HHS Public Access.* 2015;1–18.
97. Udono-Fujimori R, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Kikuchi K, Tamai M, et al., Suppression of cytokine-induced expression of endothelin-1 by dexamethasone in human retinal pigment epithelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S471-3.
98. Affymetrix. Human Angiogenesis Antibody Array [Internet]. Available from: [http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod710002/USB/Human+Angiogenesis+Antibody+Array#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod710002/USB/Human+Angiogenesis+Antibody+Array#1_1)
99. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2014;6(3):160.
100. Leinco Technologies I. Indirect ELISA Protocol. [http://www.leinco.com/sandwich\\_elisa](http://www.leinco.com/sandwich_elisa)
101. SABiosciences AQC. Introduction To Real-Time Quantitative PCR (qPCR) [Internet]. 2016. Available from: [www.sabiosciences.com](http://www.sabiosciences.com)
102. Lopez GH, Dean MM, Yasui K, Schuller RM, Hirayama F, Fung Y. A standardized

- immunofluorescence test method with human neutrophil antigen-expressing cell lines to enhance antibody detection. *Vox Sanguinis*. 2011;1022:171-174. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01532.x
103. Kurz T, Karlsson M, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson C. ARPE-19 retinal pigment epithelial cells are highly resistant to oxidative stress and exercise strict control over their lysosomal redox-active iron. *Autophagy*. 2009;5(4):494–501.
  104. Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nessler AK, et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicol Vitro*. Elsevier Ltd; 2010;24(2):516–22.
  105. Liu LQ, Fan ZQ, Tang YF, Ke ZJ. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis via inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(3):683–93.
  106. Brossas J-Y, Tanguy R, Brignole-Baudouin F, Courtois Y, Torriglia A, Tréton J. L-DNase II associated with active process during ethanol induced cell death in ARPE-19. *Mol Vis*. 2004;10:65–73.
  107. Sarc L, Lipnik-Stangelj M. Comparison of ethanol and acetaldehyde toxicity in rat astrocytes in primary culture. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009;60(3):297–305.
  108. Rao PSS, Kumar S. Chronic Effects of Ethanol and/or Darunavir/Ritonavir on U937 Monocytic Cells: Regulation of Cytochrome P450 and Antioxidant Enzymes, Oxidative Stress, and Cytotoxicity. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(1):73–82.
  109. Chirdchupunseree H, Pramyothin P. Protective activity of phyllanthin in ethanol-treated primary culture of rat hepatocytes. *J Ethnopharmacol*. 2010;128(1):172–6.
  110. Galli E, Feijoo L. Citocromo P-450 Y Su Importancia Clínica Revisión Actualizada. *Rev Neuropsiquiatr*. 2002;65:187–201.
  111. Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MO. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC Neurosci*. 2012;13(1):11.
  112. Gonzalez A, Pariente JA, Salido GM. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca<sup>2+</sup> mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Brain Res*. 2007;1178(1):28–37.
  113. Heaton MB, Paiva M, Mayer J, Miller R. Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum. *Neurosci Lett*. 2002;334(2):83–6.
  114. Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8219–24.
  115. Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med*. 2013;5(9):1415–30.
  116. Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U. VEGF pathway targeting agents , vessel normalization and tumor drug uptake : from bench to bedside. *Oncotarget* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.6918
  117. Brooks RC, Hasley PB, Jasti H, Macpherson D. Update in general internal medicine: Evidence published in 2011. *Ann Intern Med*. 2012;156(9):649–54.

118. Benito-Almazán MJ. Papel del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y eficacia de moléculas inhibitoras en la respuesta inflamatoria de la superficie ocular. Universidad de Valladolid. 2012. Tesis doctoral.
119. Fang S, Pentimikko N, Ilmonen M, Salven P. Dual action of TGF- $\beta$  induces vascular growth in vivo through recruitment of angiogenic VEGF-producing hematopoietic effector cells. *Angiogenesis*. 2012;15(3):511–9.
120. Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):182–94.
121. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, et al. TGF- $\beta$ : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(2):1–16.
122. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF) signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.*; 2011;51(4):600–6.
123. Tobar N, Villar V, Santibanez JF. ROS-NF $\kappa$ B mediates TGF-1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem*. 2010;340(1-2):195–202.
124. Presser LD, McRae S, Waris G. Activation of TGF-1 Promoter by Hepatitis C Virus-Induced AP-1 and Sp1: Role of TGF in Hepatic Stellate Cell Activation and Invasion. *PLoS One*. 2013;8(2).
125. Eichler W, Friedrichs U, Thies A, Tratz C, Wiedemann P. Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2767–73.
126. Chidlow Jr. JH, Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G5–18.
127. Itoh H, Kataoka H. Roles of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and its inhibitor HAI-1 in the regeneration of injured gastrointestinal mucosa. *J Gastroenterol*. 2002;37 Suppl 1:15–21.
128. Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, et al. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(1):146–51.
129. Andaluz A, Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Rigau T, García F, Rivera del Álamo MM. Pro-inflammatory cytokines: useful markers for the diagnosis of canine mammary tumours? *Vet J*. 2016 Jan 28. pii: S1090-0233(16)00017-4.
130. Szubert M, Suzin J, Duechler M, Szuawska A, Czyz M, Kowalczyk-Amico K. Evaluation of selected angiogenic and inflammatory markers in endometriosis before and after danazol treatment. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26(3):414–20.
131. Petrella BL, Armstrong DA, Vincenti MP. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 3 cooperate to activate matrix metalloproteinase expression and invasiveness in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;325(2):220–6.
132. Tian J, Chen JW, Gao JS, Li L, Xie X. Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$ , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of

- PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol Int.* 2013;33(7):1829–35.
133. Badawi MA, Abouelfadl DM, El-Sharkawy SL, Abd El-Aal WE, Abbas NF. Tumor-Associated Macrophage (TAM) and Angiogenesis in Human Colon Carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015;3(2):209.
  134. Vázquez Rodríguez G, Producción de las proteínas recombinantes con capacidad antiangiogénica: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *E. coli*. DBM-IPICyT. 2009.
  135. Clapp C, Gonzalez C, Macotella Y, Aranda J, Rivera JC, Garcia C, et al. Vasoinhibins: A family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res.* 2006;35:64–73.
  136. Clapp C, Thebault S, Arnold E, García C, Rivera JC, de la Escalera GM. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(4):E772–8.
  137. Geiger M, Wahlmuller F, Furtmuller M. The Serpin Family. Springer. 2015;197–212.
  138. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J.* 2006;20(2):323–5.
  139. Franco-Chuaire ML, Ramirez-Clavijo S, Chuaire-Noack L. Pigment epithelium-derived factor: Clinical significance in estrogen-dependent tissues and its potential in cancer therapy. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(9):837–55.
  140. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol.* 2006;37(1):1–12.
  141. Ablonczy Z, Dahrouj M, Tang PH, Liu Y, Sambamurti K, Marmorstein AD, et al. Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8614–20.
  142. Belkacemi L, Zhang SX. Anti-tumor effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF): implication for cancer therapy. A mini-review. *J Exp Clin Cancer Res.*; 2016;35(1):4.
  143. Johnston EK, Francis MK, Knepper JE. Recombinant pigment epithelium-derived factor PEDF binds vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2015;51(7):730–8.
  144. Press D. Targeting tumor vasculature through oncolytic virotherapy : recent advances. *J. Oncol. Virotherapy.* 2015;169–81.
  145. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002;6(1):1–12.
  146. Bige N, Shweke N, Benhassine S, Jouanneau C, Vandermeersch S, Dussaule J-C, et al. Thrombospondin-1 plays a profibrotic and pro-inflammatory role during ureteric obstruction. *Kidney Int.* 2012;81(12):1226–38.
  147. Gutierrez LS, Lopez-Dee Z, Pidcock K. Thrombospondin-1: Multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm.* 2011;2011.
  148. Doyen V, Rubio M, Braun D, Nakajima T, Abe J, Saito H, et al. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med.* 2003;198(8):1277–83.
  149. Dufour A, Overall CM. Missing the target: Matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci.*; 2013;34(4):233–42.

150. Chau KY, Sivaprasad S, Patel N, Donaldson T a, Luthert PJ, Chong N V. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*. 2007;21(12):1511–5.
151. Juuti-Uusitalo K, Nieminen M, Treumer F, Ampuja M, Kallioniemi A, Klettner A, et al. Effects of Cytokine Activation and Oxidative Stress on the Function of the Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6265–74.
152. Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts exploit reactive oxygen species through a proinflammatory signature leading to epithelial mesenchymal transition and stemness. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(12):2361–71.
153. Cichon M a, Radisky DC. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- $\kappa$ B-dependent activation of Snail. *Oncotarget*. 2014;5(9):2827–38.
154. Nascimento GC, Rizzi E, Gerlach RF. Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular joint inflammation. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(11):956-967.
155. Sun S, Bay-Jensen A-C, Karsdal M a, Siebuhr AS, Zheng Q, Maksymowych WP, et al. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:93.
156. Abramson SB. Inflammation in Osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2004;31(SUPPL. 70):70–6.
157. Peters MA, Wendholt D, Strietholt S, Frank S, Pundt N, Korb-Pap A, et al. The loss of 2 1 integrin suppresses joint inflammation and cartilage destruction in mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(5):1359–68.
158. Kernt M, Hirneiss C, Wolf A, Liegl R, Rueping J, Neubauer A, et al. Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(6):571–9.
159. Kofla-Dlubacz A, Matusiewicz M, Krzystek-Korpacka M, Iwanczak B. Correlation of MMP-3 and MMP-9 with crohn’s disease activity in children. *Dig Dis Sci*. 2012;57(3):706–12.
160. Yoo J, Perez CER, Nie W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Protein kinase D1 mediates synergistic MMP-3 expression induced by TNF- $\alpha$  and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 2011;413(1):30–5.
161. Kernt M, Walch A, Neubauer AS, Hirneiss C, Haritoglou Md C, Ulbig MW, et al. Filtering blue light reduces light-induced oxidative stress, senescence and accumulation of extracellular matrix proteins in human retinal pigment epithelium cells. *Clin Exp Ophthalmol*. 2012;40(1).
162. Demeestere D, Dejonckheere E, Steeland S, Hulpiau P, Haustraete J, Devoogdt N, et al. Development and validation of a small single domain antibody that effectively inhibits matrix metalloproteinase 8. *Mol Ther*. 2016. doi: 10.1038/mt.2016.2.
163. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinase 8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev*.; 2011;22(2):73–81.
164. Craig VJ, Quintero P a., Fyfe SE, Patel a. S, Knolle MD, Kobzik L, et al. Profibrotic Activities for Matrix Metalloproteinase-8 during Bleomycin-Mediated Lung Injury. *J*

- Immunol. 2013;190(8):4283–96.
165. Bandyopadhyay M, Rohrer B. Matrix metalloproteinase activity creates pro-angiogenic environment in primary human retinal pigment epithelial cells exposed to complement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):1953–61.
  166. Bauer AT, Bürgers HF, Rabie T, Marti HH. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(4):837–48.
  167. Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, Siddiquei MM, Van Den Eynde K, Mousa A, et al. Relationship between vitreous levels of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2013;8(12):1-11.
  168. Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, et al. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-?? agonist. *J Mol Med.* 2015;93(7):749–58.
  169. Chen J, Crawford R, Xiao Y. Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2013;114(2):245–9.
  170. Zeng A, Zeng S, Chen Yang XQ. Modulation of Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 Expression by TGF-B1 Cultured Human RPE Cells. *J Huazhong Univ Sci Technol.* 2006;26(3):363–5.
  171. Laing JG, Chou BC, Steinberg TH. ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 10):2167–76.
  172. Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(2):G222–31.
  173. Fukui A, Naito Y, Handa O, Kugai M, Tsuji T, Yoriki H, et al. Acetyl salicylic acid induces damage to intestinal epithelial cells by oxidation-related modifications of ZO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(8):G927–36.
  174. Laing JG, Koval M, Steinberg TH. Association with ZO-1 correlates with plasma membrane partitioning in truncated connexin45 mutants. *J Membr Biol.* 2005;207(1):45–53.
  175. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One.* 2011;6(8):e20599.
  176. Cao L, Wang H, Wang F. Amyloid-induced matrix metalloproteinase-9 secretion is associated with retinal pigment epithelial barrier disruption. *Int J Mol Med.* 2013;31(5):1105–12.
  177. Kim JY, Ko A-R, Hyun H-W, Kang T-C. ETB receptor-mediated MMP-9 activation induces vasogenic edema via ZO-1 protein degradation following status epilepticus. *Neuroscience.* 2015;304(July):355–67.
  178. Saaristo A, Suominen E, Yla-Herttuala S. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth in plastic surgery. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plast Chir.* 2005;37(6):375–82.
  179. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005;438(7070):967–74.

180. Viita H, Markkanen J, Eriksson E, Nurminen M, Kinnunen K, Babu M, et al. 15-Lipoxygenase-1 prevents vascular endothelial growth factor A- and placental growth factor-induced angiogenic effects in rabbit skeletal muscles via reduction in growth factor mRNA levels, NO bioactivity, and downregulation of VEGF receptor 2 expression. *Circ Res.* 2008;102(2):177–84.
181. Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A Links Angiogenesis and Inflammation in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Gastroenterology.* 2009 Feb;136(2):585-95.e5.
182. Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong Y, Schacht V, Velasco P, Lin C, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transge. 2011;104(4):1048–57.
183. Leppnen P, Koota S, Kholov I, Koponen J, Fieber C, Eriksson U, et al. Gene transfers of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor-B, vascular endothelial growth factor-C, and vascular endothelial growth factor-D have no effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic low-density lipoprotein. *Circulation.* 2005;112(9):1347–52.
184. Prosser HCG, Tan JTM, Dunn LL, Patel S, Vanags LZ, Bao S, et al. Multifunctional regulation of angiogenesis by high-density lipoproteins. *Cardiovasc Res.* 2014;101(1):145–54.





---

*ANEXO I:*

*Materiales y Métodos*

---

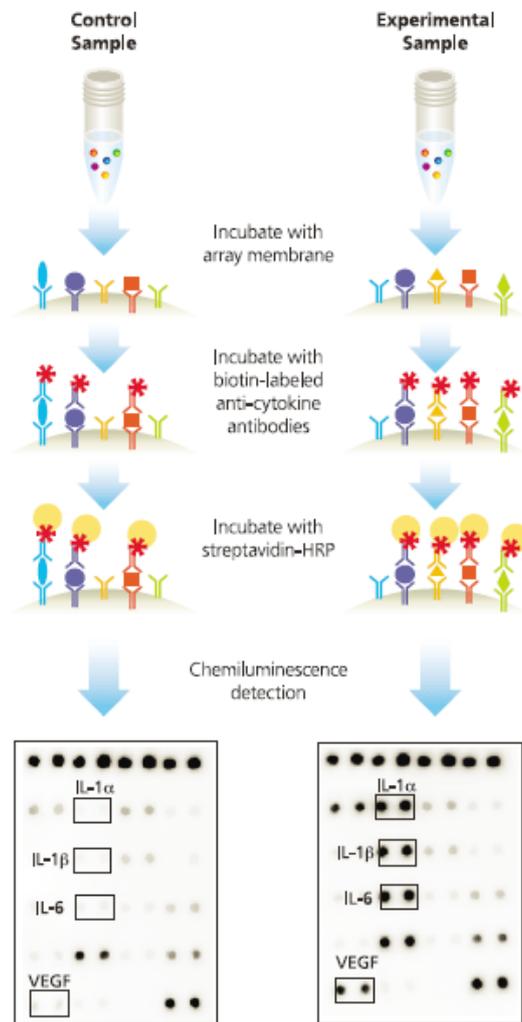


Figura 1: Esquema explicativo array de angiogénesis [ Tomada de Affymetrix. Human Angiogenesis Antibody Array]

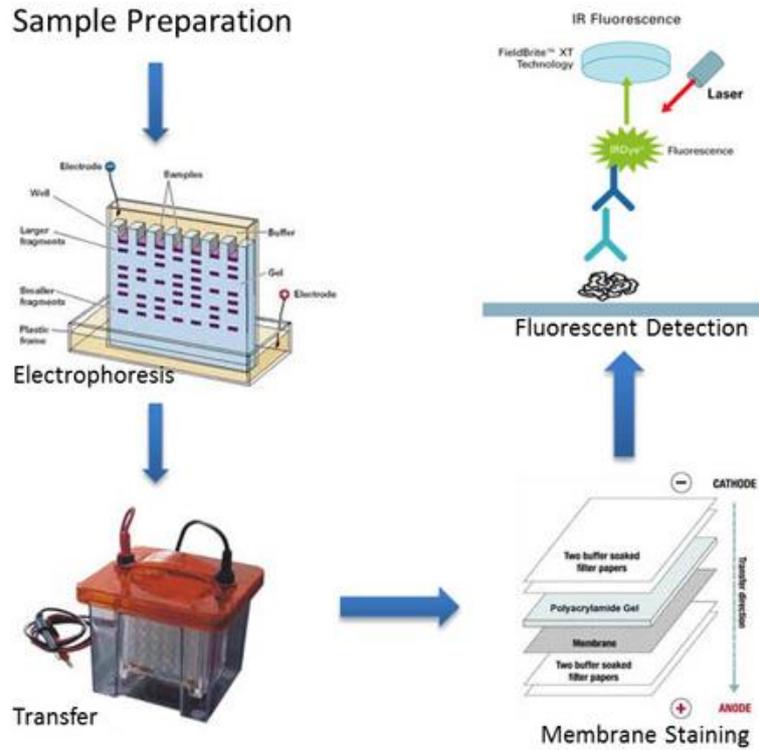


Figura 2: Resumen esquemático Western Blot SDS-PAGE [ Tomada de Case Western Reserve University. Western Blot]

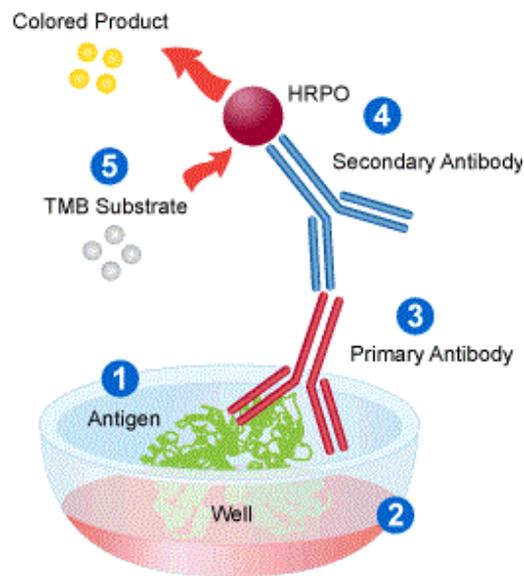


Figura 3: Método de ELISA indirecto. [Tomada de Leinco Technologies I. Indirect ELISA Protocol]

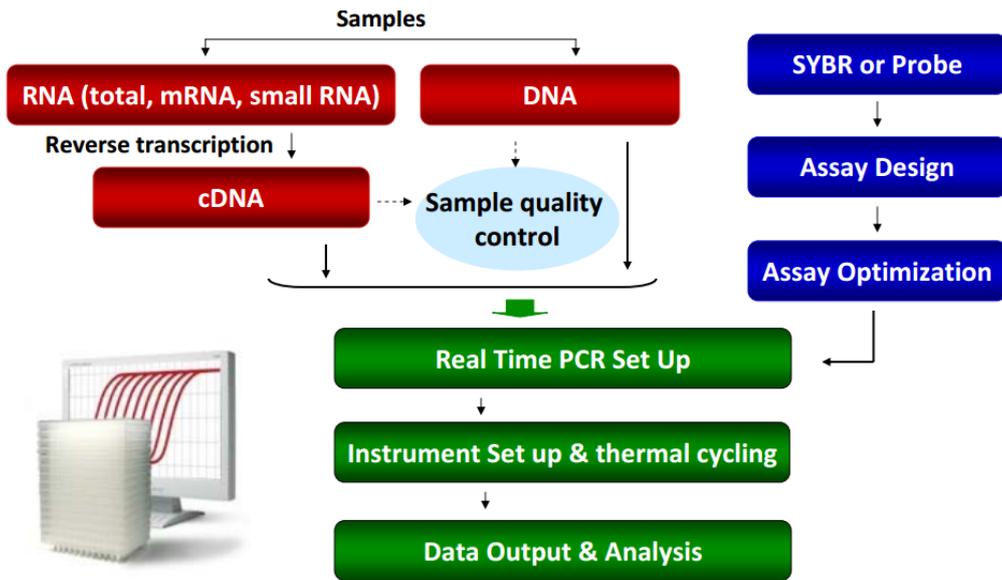


Figura 4: Resumen esquemático del proceso realizado en la Q-PCR. [Tomado de SABiosciences AQC. Introduction To Real-Time Quantitative PCR (qPCR) 2016]

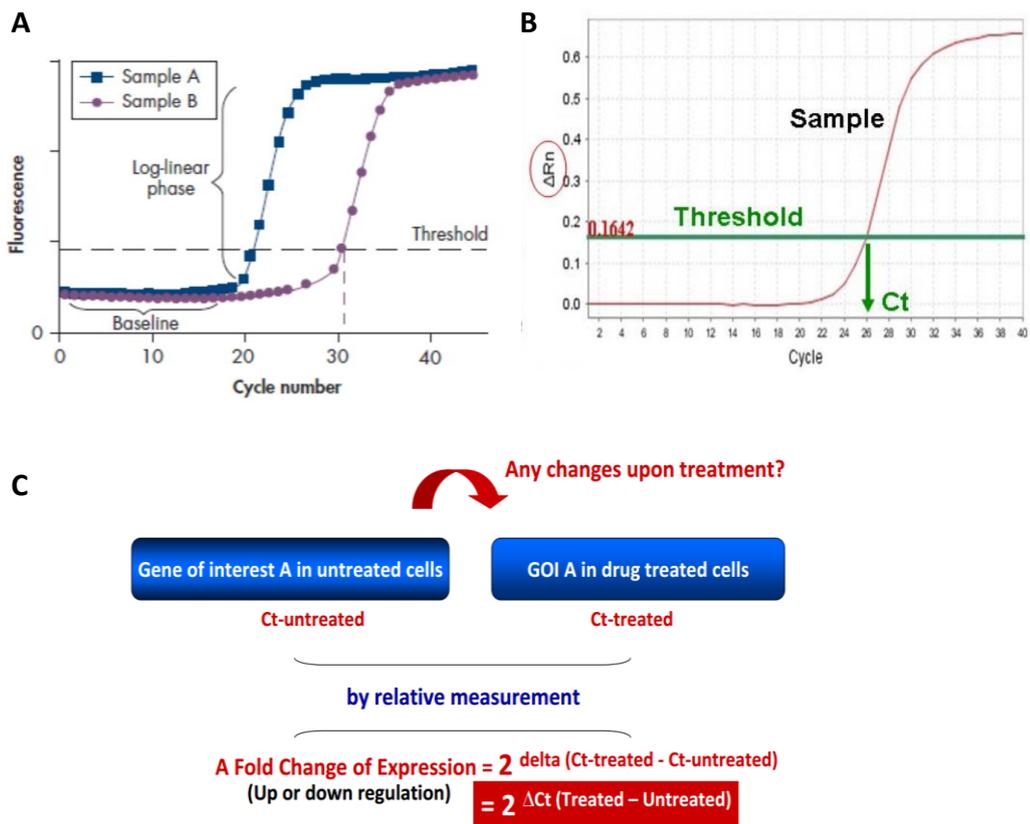
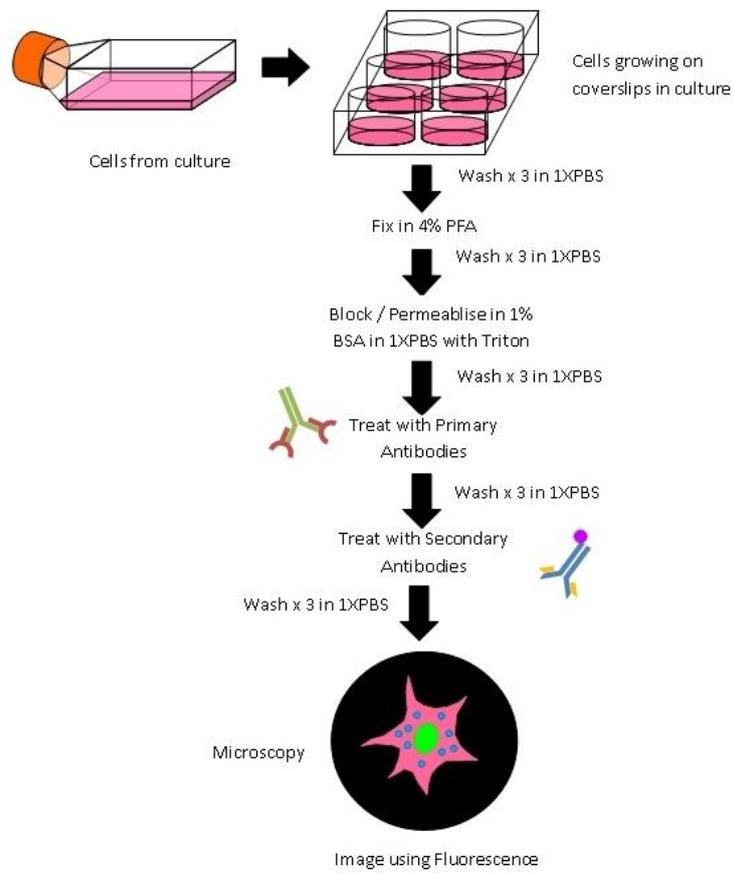


Figura 5: Resumen esquemático del proceso de análisis de la Q-PCR. A) Imagen típica de la curva de amplificación de dos genes. B) Definición gráfica del Ct. C) Fórmulas empleadas para el análisis de la expresión génica. \* Threshold hace referencia a la línea a partir de la cual comenzamos a observar un aumento de la expresión génica [Modificado de SABiosciences AQC. Introduction To Real-Time Quantitative PCR (qPCR). 2016]



**Figura 6: Resumen Inmunofluorescencia** [Tomada y Modificada de The University Of Queensland, Immunofluorescence].

