

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del efecto protector de la melatonina en el cristalino,
análisis de su acción hipotensora y modulación de su secreción
usando un filtro amarillo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Victoria Eugenia Lledó Mayans

Directores

Ana Isabel Guzmán Aránguez
Hanan Awad Alkozi

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA EN EL CRISTALINO,
ANÁLISIS DE SU ACCIÓN HIPOTENSORA Y MODULACIÓN DE SU SECRECIÓN
USANDO UN FILTRO AMARILLO.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

VICTORIA EUGENIA LLEDÓ MAYANS

DIRECTORES

Dra. Ana Isabel Guzmán Aránguez

Dra. Hanan Awad Alkozi

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA EN EL CRISTALINO,
ANÁLISIS DE SU ACCIÓN HIPOTENSORA Y
MODULACIÓN DE SU SECRECIÓN USANDO UN FILTRO AMARILLO.**

VICTORIA EUGENIA LLEDÓ MAYANS

Directores

Ana Isabel Guzmán Aránguez

Hanan Awad Alkozi

In memoriam

Jesús Pintor Just


TESIS DOCTORAL

Madrid, 2021









“Nada en la vida es para ser temido,
es sólo para ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más,
de modo que podamos temer menos”

Marie Curie







AGRADECIMIENTOS

Antes de empezar, querría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han pasado por mi vida durante estos años hasta llegar a este momento. Y en primer lugar, quiero dedicarle unas palabras escritas en mi lengua materna a mis familiares más allegados.


Pradina, no has pogut veure fins on he arribat, almenys en persona, però sé que estaries orgullosa de jo i d'es meus éxits acadèmics. Des de ben petita sempre ens deies que havíem d'estudiar, que havíem d'estudiar molt a més, per aconseguir ser allò que ens agradés. I això he fet, no he aturat d'estudiar, i he après que a sa vida mai s'atura d'aprendre. Moltes gràcies per ser com ets i estar sempre a n'es meu pensament. I a tu tia Marga, sempre preocupada pes nostre futur com a una mare més, demanant sempre com ens anaven es estudis, sé que t'encantaria veure'm convertida en doctora i sé que així ho faràs des de es meu cor. Vos estim.

Mamá, gràcies a tu i a s'educació que m'has donat sóc qui sóc a dia d'avui. Perquè per damunt de qualsevol títol crec que sóc és reflex de sa teva millor virtut, ser bona persona. A tu també Maite, que a pesar de no haver-nos duit bé durant molts d'anys, ja fa temps que ens entenem molt millor i que m'agrada saber que puc comptar amb tu per tot allò que necessiti.

Padre, gracias a ti también, mi otro pilar educacional. Que me has acompañado, viniendo a Madrid cada vez que ha hecho falta. Y que aunque somos de expresar poco, siempre se ha notado lo orgulloso que estás de mí por todos mis logros, y yo de que seas mi padre.

I a la resta de familiars que se preocupen per mi i per es meu futur, moltes gràcies per estar sempre units, per molt que no ens haguem vist massa aquests darrers anys, esper recuperar es temps perdut ara que ja he tornat per Mallorca.

I com que sa família no només és sa que se comparteixen es vincles de sang, evidentment voltros no podíeu faltar, Esther i Sergio, gràcies per tot i, per tant.



Gràcies per ser es meu punt de desconnexió de Madrid, per estar disponibles sempre que he vingut a Mallorca per aprofitar d'es caps de setmana d'evasió, com si d'unes vacances es tractés; per estar a n'es meus baixons i donar-me sa confiança de saber que si ho deixava a mitges no passava res. Perquè sou sa familia que he triat i tornaria a triar una i una altra vegada. Vos estim.

Y a mi familia madrileña, sin la que todos mis años de estudio no habrían sido lo mismo. Cada año se ha ido añadiendo alguien más a mi lista de imprescindibles y sé que no desapareceréis nunca de mi vida por que os llevo a cada uno en mi corazón. Así que muchísimas gracias a todos por estar siempre ahí. Pablo, estamos juntos desde el primer año de carrera y sin ti posiblemente no habría ni hecho el máster que nos llevó a comenzar ésta increíble aventura. Ana, que a pesar de no continuar el mismo camino, lo que unió el primer año de carrera no lo separará nunca nadie. Ángela, de quien he aprendido que hay que tener carácter en la vida para afrontar todas las piedras del camino. Sandra, cuánto amor eres capaz de transmitir y no sabes cuanto se agradece! Celia, probablemente si no te hubiera conocido no habría empezado todo este viaje, fuiste una razón más por la que continuar en Madrid y aunque nuestros caminos se hayan separado siempre serás bienvenida a Mallorca. Cris, nadie me entiende como tú, y es que hace falta sufrirlo para comprender lo que cuesta todo esto, gracias por ser mi punto de apoyo (mutuo). Marina, en quien puedo confiar para lo que necesite, y sé que estarás ahí (aunque estés algo más ausente en el día a día). A mi última gran compañera de piso, Raquel, estos tres últimos años por fin me he sentido como en casa, gracias por todo (y al Ret, porque si él lo ha conseguido, yo también puedo). Juan, porque desde que fui a ver el piso los tres supimos que teníamos que vivir juntos ¡y fue increíble! ¡Tritri! Que aunque agotes mi paciencia, es reconfortante tener siempre a alguien con tanta vitalidad y felicidad que compartir. Y por último, gracias Hanan, porque pasaste de ser mi maestra y enseñarme tu pasión por la ciencia a convertirte en una de mis mejores amigas, no he podido tener mejor codirectora, gracias a ti he aprendido todo lo necesario para superarme y conseguir lo que quiero. Te quiero.

Agradecerles también a todos los compañeros que me han acompañado en el laboratorio durante estos años de doctorado, ya sea para aprender de ellos, para ofrecerme su ayuda y apoyo, por facilitarme las labores de los experimentos o simplemente por hacer el día a día más divertido y ameno. Gracias a María J. Pérez de Lara, Adriana, María Serramito, Carlos, Candela, Alex, Bego, Alba, Fer, Almudena, Basilio, Javier, Gonzalo, Sunti, Crisfrita, Marisa, Bea, Teresa, Ana, Júlia, María Lafora, Azza, Wael, Miguel Ángel y al doctor Juan Sánchez Naves en especial por facilitarnos las muestras de humor acuoso humano, pudiendo ampliar así nuestras muestras en este trabajo de investigación.

Agradecer también a la Universidad Complutense de Madrid, por concederme una beca/contrato predoctoral como personal investigador en formación haciendo posible mi dedicación a tiempo completo.

Muchísimas gracias Ana, por coger las riendas de mi tesis y saber redirigírmela y llevarla a buen puerto, por tu profunda implicación e inagotable ayuda, para terminar de realizar todo lo necesario para cerrar por fin este capítulo, y estar siempre atenta y disponible ante cualquier duda que me surgiera. No lo habría logrado sin ti.

Y finalmente, quería realizar una gran mención al gran doctor Jesús Pintor. No solo por permitirme ser tu última doctoranda y enseñarme tantas cosas en el laboratorio, siempre con paciencia y cariño, sino también por hacerme descubrir en mí ese lado científico, por despertarme el gusanillo de la investigación y hacer que disfrutara con cada experimento. Fuiste un gran profesor y mentor, permitiendo que sacara mi vena más exigente, aumentando mi capacidad de raciocinio. Al final te convertiste no solo en el mejor jefe que he tenido y tendré, si no en un amigo. Gracias infinitas Suso, siempre te llevaré en mi memoria.



ABREVIATURAS

4-P-PDOT	4-fenil-2-propionamidotetralina (<i>4-phenyl-2-propionamidotetralin</i>)
AANAT	Aralquilamina N-acetiltransferasa (<i>Aralkylamine N-acetyltransferase</i>)
APS	Persulfato de amonio (<i>Ammonium Persulfate</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine TriPhosphate</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ECL	Reactivo Quimioluminescente (<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>)
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle (<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>)
FBS	Suero Bovino Fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno (<i>Hydrogen Peroxide</i>)
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa (<i>Hydroxyindole-O-methyltransferase</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (<i>High-Pressure Liquid Chromatography</i>)
IOP	Presión Intraocular (<i>Intraocular Pressure</i>)
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)

LED	Diodo emisor de luz (<i>Ligh Emitting Diode</i>)
MT₁	Receptor de melatonina 1 (<i>Melatonin receptor 1</i>)
MT₂	Receptor de melatonina 2 (<i>Melatonin receptor 2</i>)
MT₃	Receptor de melatonina 3 (<i>Melatonin receptor 3</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
NAS	N-acetilserotonina (<i>N-acetylserotonine</i>)
NLRP-3	Familia de receptores de tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, que conserva el dominio de pirina 3 (<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-cointaining 3</i>)
NRF-2	Factor nuclear derivado de eritroide 2 (<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related factor</i>)
OH*	Radical Hidroxilo (<i>Hydroxile radical</i>)
pAANAT	Fosfo Aralquilamina N-acetiltransferasa (<i>Phospho Aralkylamine N-acetiltransferase</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCO	Opacificación Capsular Posterior (<i>Posterior Capsule Opacification</i>)
PFA	Paraformaldehído (<i>p-formaldehyde</i>)
POAG	Glaucoma primario de ángulo abierto (<i>Primary Open-Angle Glaucoma</i>)
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación (<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno (<i>Reactives Oxigen Species</i>)
RPE	Epitelio Pigmentado de la Retina (<i>Retinal Pigment Epithelium</i>)
SD	Desviación Estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SEM	Error Estándar de la Media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)

SOD	Superóxido Dismutasa (<i>SuperOxide Dismutase</i>)
TBS	Tampón fosfato de Tris (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
TEMED	Tetrametiletilendiamina (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
UV	Ultravioleta (<i>UltraViolet</i>)




ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	XI
ABREVIATURAS	XV
ÍNDICE	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIII
ÍNDICE DE TABLAS	XXVII
RESUMEN	1
1. Resumen	3
2. Abstract	7
INTRODUCCIÓN	1
1. Sistema Visual	3
1.1. Estructura General del Globo Ocular	3
1.2. El Cristalino	8
1.3. Humor Acuoso	11
2. Catarata	14
2.1. Tipos de Cataratas	15
2.2. Mecanismos Moleculares Implicados en el Desarrollo de Cataratas	19
2.3. Modelos Experimentales de Catarata en Animales	25
3. Glaucoma	29
3.1. Glaucoma de Ángulo Abierto	30
3.2. Glaucoma de Ángulo Cerrado	31
4. Melatonina	32
4.1. Generalidades	32
4.2. Metabolismo de Melatonina: Síntesis y Degradación	33
4.3. Receptores de Melatonina	36
4.4. Funciones de la Melatonina en el Ojo	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
1. Hipótesis	43
2. Objetivos	45
2.1. Objetivos Generales	45
2.2. Objetivos Específicos	45
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. Material	49
1.1. Productos Químicos	49

1.2.	Instrumentos y Equipos	52
2.	Métodos	55
2.1.	Modelos de Experimentación y Muestras Biológicas Utilizadas	55
2.2.	Determinación de la Viabilidad Celular	62
2.3.	Detección de ROS	64
2.4.	Evaluación de los Niveles de Melatonina	65
2.5.	Valoración de la Concentración de 6-hidroximelatonina	68
2.6.	Lisado de Células y Tejido Oculares	69
2.7.	Determinación de la Concentración de Proteínas en los Lisados	71
2.8.	Western blot	72
2.9.	Evaluación de la Actividad de la SuperÓxido Dismutasa	78
2.10.	Medida de Interleuquina 1β	80
2.11.	Medidas en el Modelo Animal	80
2.12.	Análisis Estadístico	87
	RESULTADOS	89
1.	Efecto de la Aplicación de Melatonina en la Viabilidad Celular	91
2.	Estudios de Citotoxicidad Inducida por Peróxido de Hidrógeno	92
3.	Efecto Protector de la Melatonina tras la Exposición a Peróxido de Hidrógeno	94
4.	Inducción de Estrés Oxidativo por Exposición a Luz LED en las Células HLE-B3	97
5.	Efecto de la Melatonina en la Producción de ROS en Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	98
6.	Efecto Protector de la Melatonina en la Viabilidad de las Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	100
7.	Efecto Protector de la Melatonina en la Viabilidad de las CÉLULAS hle-b3 Expuestas conjuntamente a Peróxido de Hidrógeno y Luz LED BLANCA	102
8.	Evaluación de la Expresión del Modulador de Estrés Oxidativo NRF2 y de la Enzima SOD en Células HLE-B3 Expuestas a Estrés Oxidativo	103
8.1.	Modulación de los Niveles de la Proteína NRF2 mediante la Melatonina en las Células HEL-B3 Tratadas con H₂O₂	103
8.2.	Efecto de la Melatonina en la Actividad de la Enzima SOD de las Células HEL-B3 Expuestas a H₂O₂	105
8.3.	Modulación de los Niveles de la Proteína NRF2 por Melatonina en las Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	106
8.4.	Efecto de la Melatonina en la Actividad de la SOD de las Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	108
9.	Efecto de la Melatonina en la Activación del Inflamasoma NLRP3	109
9.1.	Regulación por Melatonina de la Activación del Inflamasoma NLRP3 en las Células HLE-B3 Tratadas con H₂O₂	109

9.2. REGULACIÓN POR MELATONINA DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LAS CÉLULAS HLE-B3 TRATADAS CON LUZ LED BLANCA	112
10. Modulación de la Transición Epitelio-Mesénquima por la Acción de la Melatonina en las Células HLE-B3 Tratadas con H ₂ O ₂	116
11. Análisis de la Concentración de Melatonina y 6-Hidroximelatonina en el Humor Acuoso de Pacientes con Cataratas	119
12. Estudios sobre el Efecto del Filtro Amarillo en las Células del Epitelio del Cristalino Humano	122
12.1. Análisis de la Concentración de Melatonina y 6-Hidroximelatonina en las Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca con un Filtro Amarillo	122
12.2. Modulación de las Enzimas Biosintéticas de la Melatonina Mediante un Filtro Amarillo en las Células HEL-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	124
12.3. Efecto del Filtro Amarillo en la Producción de ROS en Células HEL-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	126
12.4. Efecto Protector del Filtro Amarillo en la Viabilidad Celular de las Células HEL-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	127
12.5. Modulación de los Niveles de Proteína NRF2 Mediante el Uso del Filtro Amarillo en las Células HEL-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	128
12.6. Efecto del Filtro Amarillo en la Actividad de la SOD de las Células HLE-B3 Expuestas a Luz LED Blanca	129
13. Efecto del Filtro Amarillo en un Modelo Animal De Catarata Diabética	131
13.1. Desarrollo del Modelo Animal de Catarata Diabética	131
13.2. Niveles de Melatonina en un Modelo Animal de Catarata Diabética	135
13.3. Modulación de las Enzimas Biosintéticas de la Melatonina Mediante el Filtro Amarillo en los Cristalinos del Modelo Animal con Catarata Diabética	136
13.4. Regulación de los Niveles de las Proteínas NRF2 y SOD Mediante el Filtro Amarillo en los Cristalinos del Modelo Animal de Catarata Diabética	137
13.5. Efecto del Filtro Amarillo en la Actividad de la SOD de los Cristalinos del Modelo Animal con Catarata Diabética	140
14. Efecto del Filtro Amarillo en la Presión Intraocular	141
14.1. Efecto del Filtro Amarillo en la Presión Intraocular en un Modelo Animal	141
14.2. Efecto del Filtro Amarillo en los Niveles de Melatonina en un Modelo Animal Normotenso	143
DISCUSIÓN	145
1. EFECTO DE LA MELATONINA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CRISTALINO	147
2. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN EL CRISTALINO MEDIANTE LA MODULACIÓN DE MELATONINA ENDÓGENA Y ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MELATONINA OCULAR EN CATARATAS	154
3. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA PRESIÓN INTRAOCULAR	161



CONCLUSIONES	165
REFERENCIAS	169
ANEXOS	195
1. Currirulum Vitae	197
2. Artículos	211
2.1. Presence of Melatonin in Human Tears	211
2.2. Yellow Filter Effect on Melatonin Secretion in the Eye: Role in IOP Regulation	213
2.3. Modulation of Aqueous Humor Melatonin Levels by Yellow-Filter and its Protective Effect on Lens	219
2.4. Protein Microarrays for Ocular Diseases	231
2.5. Melatonin Counteracts Oxidative Damage in Lens by Regulation of Nrf2 and NLRP3 Inflammasome Activity	259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del globo ocular.	7
Figura 2. Estructura del cristalino.	9
Figura 3. Esquema de entrada y salida del humor acuoso y sus estructuras adyacentes.	12
Figura 4. Tipos de cataratas.	17
Figura 5. Vía de los polioles. Modificada de (Tang et al., 2012).	23
Figura 6. Mecanismo de acción del aloxano.	28
Figura 7. Esquema de la regulación de la síntesis de melatonina a través de la vía de la melanopsina presente en las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (Alkozi, 2019).	33
Figura 8. Esquema de la síntesis de melatonina (Shillcutt et al., 2014).	34
Figura 9. Producto degradativo de la melatonina. Modificada de (Maharaj et al., 2002).	35
Figura 10. Localización de los diferentes receptores de melatonina en el ojo.	37
<i>Figura 11. Relación entre la PIO y la melatonina a lo largo del día.</i>	<i>40</i>
Figura 12. Conejos cubiertos con la caja fabricada con el filtro amarillo.	60
Figura 13. Placa de 96 pocillos tras realizar la lectura en el espectrofotómetro.	63
Figura 14. Imagen del sistema electroforético y fuente de alimentación para el desarrollo de la electroforesis.	74
Figura 15. Test colorimétrico de glucosa en la orina de conejos.	81
Figura 16. Retinoscopía mediante reglas de esquiiscopía en conejos.	83
Figura 17. Extracción de humor acuoso en conejos.	84
Figura 18. Globo ocular de conejo recién enucleado.	85
Figura 19. Medición de la PIO mediante el TonoVET®.	86
Figura 20. Ensayo de dosis respuesta de la melatonina sobre la viabilidad de las células HLE-B3.	91
Figura 21. Análisis de la viabilidad celular tras el tratamiento con H ₂ O ₂	92
Figura 22. Acción de la melatonina en la viabilidad de células HLE-B3 tratadas con H ₂ O ₂	95

Figura 23. Efecto en la viabilidad celular modificando el momento de aplicación de la melatonina.....	96
Figura 24. Especies reactivas de oxígeno detectadas tras la exposición a luz LED de diferentes tipos.....	97
Figura 25. Efecto de la melatonina en la producción de ROS en células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca.....	98
Figura 26. Efecto de la melatonina en la viabilidad celular de las células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca.....	100
Figura 27. Efecto de la melatonina en la viabilidad celular de las células HLE-B3 expuestas a H ₂ O ₂ y luz LED blanca.....	102
Figura 28. Niveles de Nrf2 en células tratadas con H ₂ O ₂ en ausencia o presencia de melatonina.....	104
Figura 29. Actividad de la enzima SOD en lisados de células HLE-B3 expuestas a H ₂ O ₂ en ausencia o presencia de melatonina.....	106
Figura 30. Niveles de Nrf2 en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz en ausencia o presencia de melatonina.....	107
Figura 31. Actividad de la SOD en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz sin y con melatonina.....	108
Figura 32. Niveles proteicos de NLRP3 y caspasa-1 en células HLE-B3 estresadas con H ₂ O ₂ en ausencia o en presencia de melatonina.....	111
Figura 33. Concentración de la proteína IL-1β en células HLE-B3 expuestas a H ₂ O ₂ en ausencia o presencia de melatonina.....	112
Figura 34. Niveles de NLRP3 y caspasa-1 en células HLE-B3 estresadas con luz en ausencia o presencia de melatonina.....	114
Figura 35. Concentración de la proteína IL-1β en células HLE-B3 expuestas a luz en ausencia o presencia de melatonina.....	115
Figura 36. Análisis de la expresión proteica de marcadores epiteliales y mesenquimales y cascada de señalización JNK en las células del epitelio de cristalino humano expuestas a H ₂ O ₂ sin y con melatonina.....	118
Figura 37. Concentración de melatonina en el humor acuoso de sujetos control y pacientes con cataratas.....	120

Figura 38. Concentración de 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de sujetos control y pacientes con cataratas.....	121
Figura 39. Concentración de melatonina en los medios condicionados de las células HLE-B3 expuestas a las diferentes condiciones lumínicas	123
Figura 40. Concentración de 6-hidroximelatonina en los medios condicionados de las células del epitelio del cristalino humano expuestas a las diferentes condiciones lumínicas.....	123
Figura 41. Expresión proteica de AANAT, HIOMT y pAANAT en las células del epitelio humano del cristalino expuestas a las distintas condiciones lumínicas. .	125
Figura 42. Niveles de ROS en las células HLE-B3 bajo diferentes condiciones lumínicas.....	126
Figura 43. Efecto de las diferentes condiciones de luz en la viabilidad celular de las células HLE-B3.....	127
Figura 44. Niveles de la proteína Nrf2 en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz.	128
Figura 45. Actividad de la SOD en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz.	129
Figura 47. Comparación de los niveles de glucosa en sangre entre conejos control y conejos con diabetes inducida experimentalmente por inyección de aloxano....	131
Figura 48. Fotografías del cristalino de los conejos control y diabéticos.....	132
Figura 49. Determinación del peso en los animales de experimentación.	133
Figura 50. Refracción de los animales experimentales.	134
Figura 51. Concentración de melatonina en el humor acuoso del modelo animal de catarata diabética.....	135
Figura 52. Expresión proteica de las enzimas AANAT, HIOMT y pAANAT en los cristalinos de los conejos.....	136
Figura 53. Niveles de la proteína Nrf2 en los cristalinos de los conejos.	138
Figura 54. Niveles de la proteína SOD en los cristalinos del modelo animal de experimentación.....	139
Figura 55. Actividad de la superóxido dismutasa en los cristalinos del modelo animal de experimentación.....	140
Figura 56. Efecto del filtro amarillo en la presión intraocular de los conejos.....	141




Figura 57. Efecto de la instilación de los antagonistas de receptores de melatonina (luzindol + 4-P-PDOT) en conejos cubiertos con un filtro amarillo durante tres semanas comparados con el control.....	142
Figura 58. Efecto del antagonista de la melanopsina AA92593 sobre la presión intraocular de los conejos.	143
Figura 59. Concentración de melatonina en el humor acuoso de conejos control y expuestos a filtro amarillo.....	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de los tipos de glaucoma.....	30
Tabla 2. Reactivos y productos químicos.	50
Tabla 3. Soluciones tampón.	51
Tabla 4. Kits de ensayo.	51
Tabla 5. Equipos e instrumentos.	53
Tabla 6. Software y herramientas informáticas.	54
Tabla 7. Composición de los tampones de lisado celular citosólico y nuclear.....	69
Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados.	76
Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados.	76
Tabla 10. Tampón de reprobing.	78
Tabla 11. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio y valores de concentración obtenidos para melatonina y 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de los mismos.	119



RESUMEN



1. RESUMEN

Título

Estudio del efecto protector de la melatonina en el cristalino, análisis de su acción hipotensora y modulación de su secreción usando un filtro amarillo.

Introducción

El cristalino es una lente biconvexa, avascular y transparente situada en el polo anterior del ojo por detrás del iris. Su función principal es enfocar la luz a la retina. La opacificación o pérdida de transparencia del cristalino genera cataratas, la principal causa de ceguera reversible en el mundo, siendo el estrés oxidativo un mecanismo patológico clave en su desarrollo.

La melatonina es una neurohormona secretada principalmente por la glándula pineal, también es producida a nivel ocular en estructuras como el cuerpo ciliar, la retina y el cristalino. La síntesis y liberación de melatonina sigue un ritmo circadiano, siendo suprimida su liberación mediante la luz por la activación del fotorpigmento melanopsina. Recientes estudios han evidenciado la presencia de este fotorpigmento en el cristalino y como su activación mediante luz azul disminuye la expresión de enzimas biosintéticas de la melatonina así como su producción, sugiriendo que la modificación de la luz, por ejemplo mediante el uso de filtros, podría regular la liberación de melatonina ocular.

La melatonina actúa como agente antioxidante, adquiriendo así un potencial anticataratogénico. Se desconoce si los niveles de melatonina ocular presentan alguna alteración en la patología de cataratas, repercutiendo en la progresión de la enfermedad.

Objetivos

- Estudiar el efecto protector de la melatonina frente al estrés oxidativo inducido por distintos agentes estresores evaluando los mecanismos moleculares inducidos.
- Analizar los cambios en los niveles de melatonina y 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de pacientes con cataratas.
- Determinar los cambios en la expresión de enzimas biosintéticas y melatonina en el cristalino bajo distintas condiciones de luz/oscuridad/filtro.
- Evaluar si la liberación de melatonina endógena mediante el uso de filtros puede desarrollar efectos antioxidantes y protectores a nivel del cristalino, así como regular la presión intraocular.

Métodos

Se realizaron estudios in vitro con células de epitelio de cristalino humano induciéndolas estrés oxidativo empleando como agentes estresores el H₂O₂ y la exposición a luz y se analizó el efecto citoprotector de la melatonina. Se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT, la producción de ROS mediante fluorimetría y se estudiaron las rutas intracelulares por las que la melatonina media su acción. Concretamente, mediante estudios inmunológicos de tipo western blot y ELISA, se determinó la implicación del sistema antioxidante Nrf2, la actividad de la enzima SOD y la activación del inflammasoma NLRP3. Asimismo, se analizó la influencia de la aplicación de melatonina en el proceso de EMT inducido por estrés oxidativo.

Por otra parte, también se analizó mediante ensayos tipo ELISA la concentración de melatonina y 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de pacientes con catarata (diabética y no diabética) y se comparó con los valores presentes en sujetos control.

Se evaluó la capacidad de modular la liberación de melatonina y la expresión de enzimas implicadas en su síntesis mediante el uso de filtros amarillos realizando ensayos de tipo ELISA y western blot, tanto in vitro, con células epiteliales humanas de cristalino, como in vivo, empleando un modelo de conejo diabético. Asimismo, se analizó el efecto del filtro amarillo frente a las alteraciones inducidas por el estrés oxidativo asociado al desarrollo de cataratas y su capacidad de modular la PIO en un modelo animal.


Resultados

El tratamiento con H₂O₂ redujo la viabilidad de las células. La exposición a luz blanca tipo LED aumentó la acumulación de ROS e indujo igualmente un descenso en la viabilidad celular. El pretratamiento con melatonina previno estos efectos sobre la viabilidad celular y la producción de ROS y promovió la expresión del sistema antioxidante Nrf2 y la actividad de la enzima SOD. La activación del inflammasoma NLRP3, inducida por estrés oxidativo, fue atenuada por la melatonina. Además, el pretratamiento con melatonina revirtió la EMT producida por estrés oxidativo.

El análisis de los niveles de melatonina y 6-hidroximelatonina en los humores acuosos reveló una inferior concentración en los pacientes con catarata frente a los sujetos control, siendo menor en pacientes con catarata diabética (60% de reducción respecto al control).

En los estudios con filtro amarillo, la exposición a luz disminuyó los niveles proteicos de las enzimas AANAT, nativa y fosforilada, e HIOMT (22%, 25%, 31% de reducción, respectivamente) así como la secreción de la melatonina y su producto degradativo. El filtro amarillo revirtió el descenso en la expresión de enzimas biosintéticas, la reducción en la liberación de melatonina y protegió a las células del daño inducido por la luz disminuyendo la acumulación ROS.

El efecto del filtro amarillo fue evaluado en un modelo de conejo diabético, mostrando una bajada en los niveles de melatonina en el humor acuoso



semejante al de los pacientes con catarata diabética, así como una menor expresión de enzimas AANAT, HIOMT y pAANAT (67%, 76%, 59% de reducción, respectivamente) respecto al control. El filtro amarillo permitió restablecer unos niveles de estas enzimas similares al control en los animales con catarata diabética, recuperando el contenido de melatonina en el humor acuoso, así como preservar la expresión proteica de Nrf2 y la actividad de la enzima SOD.

El filtro amarillo también redujo la presión intraocular en un modelo animal.

Conclusiones

La aplicación de melatonina contrarrestó el descenso en viabilidad celular inducida por los agentes estresores estimulando la capacidad antioxidante de las células mediante el incremento de los niveles proteicos de Nrf2 y de la actividad de SOD. Además, la melatonina previno la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por la exposición a estrés oxidativo.

Existe una alteración de los niveles de melatonina en el humor acuoso de pacientes con cataratas, siendo más marcada en pacientes con catarata diabética.

La modulación de la secreción ocular de melatonina mediante el uso de filtros permitió inducir su síntesis, restaurando el descenso detectado en el modelo de animal diabético. El filtro amarillo aumentó la defensa antioxidante del cristalino protegiéndolo del daño oxidativo.

El filtro amarillo y la consiguiente regulación de melatonina ocular endógena permitieron modular la PIO en un modelo animal.

2. ABSTRACT

Title

Study of the protective effect of melatonin on the lens, analysis of its hypotensive action and modulation of its secretion using a yellow filter.

Introduction

The lens is an avascular and transparent structure located in the anterior pole of the eyeball behind the iris. Its main function is to focus light on the retina. The opacification or loss of transparency of the lens generates cataracts, which are the main cause of reversible blindness in the world. Oxidative stress is a key pathological mechanism in cataract progress.

Melatonin is a neurohormone mainly secreted by the pineal gland and also produced at eye structures such as the ciliary body, the retina and the lens. The synthesis and release of melatonin follows a circadian rhythm. Melatonin release is suppressed by the activation of the photopigment melanopsin by light. Recent studies have shown the presence of melanopsin in the lens and how its activation by blue light exposure decreases the expression of enzymes involved in melatonin biosynthesis as well as neurohormone production, suggesting that light modulation, for example with filters, could regulate melatonin in the eye.

Among the functions of melatonin in the eye highlights its possible role as an antioxidant agent. Taking into account the relationship of cataracts with oxidative stress, the anticataratogenic potential of melatonin has been suggested. It is unknown whether ocular melatonin levels are altered in cataracts, which could affect the disease progression.

Objectives

- To study the protective effect of melatonin against oxidative stress induced by different stress agents, evaluating the molecular mechanisms induced.
- To analyze the changes in melatonin levels and 6-hydroxymelatonin in the aqueous humor of patients with cataracts.
- To determine the possible changes in the expression of biosynthetic enzymes and in melatonin release in the lens under different light/dark conditions and in the presence of a yellow filter.
- To evaluate whether the melatonin release through the use of yellow filter can induce antioxidant and protective effects at the lens and regulate IOP.

Methods

In vitro studies were carried out with human epithelial lens cells, which were challenged with oxidative stressors agents (H₂O₂ and light exposure), being the cytoprotective effect of melatonin analyzed. Changes in cell viability were evaluated by MTT assay and modifications in ROS production were studied by fluorimetry. The intracellular pathways prompted by melatonin to mediate its actions were also evaluated. Particularly, immunological assays such as western blot and ELISA were used to determine antioxidant system Nrf2 involvement, SOD activity and NLRP3 inflammasome activation. Melatonin influence in the EMT process induced by oxidative stress was also analyzed.

Melatonin and 6-hydroxymelatonin concentrations in aqueous humor of cataract (diabetic and non-diabetic) patients were measured by ELISA and compared with control subjects.

Yellow filter ability to modulate melatonin release from the lens was evaluated. Analysis of melatonin release and expression of enzymes involved in melatonin synthesis was carried out by means of ELISA and western blot assays, respectively. These studies were performed both in *in vitro* experiments with human lens epithelial cells and *in vivo* using a diabetic rabbit model. Likewise, in both experimental models, the protective effect of the yellow filter against the

alterations induced by oxidative stress associated with cataracts was analyzed. Yellow filter ability to modulate IOP was also tested in a rabbit model.


Results

H₂O₂ treatment reduced viability of human lens epithelial cells. Exposure to white LED light increased ROS accumulation and induced cell viability decrease. Melatonin prevented these effects on cell viability and ROS production and promoted the expression of the antioxidant system Nrf2 and superoxide dismutase activity. NLRP3 inflammasome activation induced by oxidative stress was also attenuated with melatonin. Moreover, melatonin reversed the EMT induced by oxidative stress in cells.

The analysis of melatonin and 6-hydroxymelatonin levels in the aqueous humors of patients with cataracts revealed a lower concentration in these patients compared to control, with a more marked decrease in diabetic cataract patients (60% of reduction as compared to control).

Regarding the yellow filter studies, treatment with light decreased the protein levels of native and phosphorylated AANAT and HIOMT (22%, 25% and 31% reduction, respectively) as well as the secretion of this neurohormone and its degradative product. Yellow filter exposure reversed the decline in biosynthetic enzyme expression, the reduction in melatonin release, and protected human lens epithelial cells from light-induced damage by reducing ROS accumulation.

The effect of the yellow filter was evaluated in a diabetic rabbit model, which showed a decrease in melatonin concentration in the aqueous humor similar to that found in diabetic cataract patients. A lower protein expression of AANAT, pAANAT and HIOMT (67%, 59% and 76% reduction respectively) were detected in these animals as compared to control. In diabetic cataract animals, yellow filter exposure reestablished enzyme protein levels as well as aqueous humor melatonin content. Yellow filter exposure in diabetic cataract rabbits preserved the Nrf2 protein expression and SOD activity.



Yellow filter exposure also reduced IOP in a rabbit animal model.

Conclusions

Melatonin counteracted the decrease in cell viability induced by the oxidative stress agents by stimulating the cell antioxidant capacity increasing Nrf2 protein expression and SOD activity. Moreover, melatonin prevented NLRP3 inflammasome activation induced by oxidative stress.

Lower aqueous humor melatonin levels from patients with cataracts were detected as compared to control subjects, being the decrease more marked in patients with diabetic cataract.

Modulation of ocular melatonin secretion using filters allowed inducing ocular melatonin synthesis, restoring the decrease in this neurohormone detected in the diabetic animal model. The use of a yellow filter increased the intracellular antioxidant defense of the lens, protecting it from oxidative damage.

Yellow filter use and the consequent regulation of ocular melatonin levels reduced IOP in an animal model.

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA VISUAL

El sistema visual está formado por todas las estructuras que permiten que se produzca la visión. Todo empieza cuando un rayo de luz procedente del exterior llega hasta el globo ocular, atravesando la película lagrimal, la córnea, la cámara anterior, el cristalino y el cuerpo vítreo para incidir en la retina y sus células especializadas, cuyos conos y bastones procesarán la energía lumínica para transformarlos en potenciales nerviosos de acción mediante la fototransducción. Al instante, son transmitidos a las áreas visuales del cerebro por el nervio óptico, a través del quiasma óptico, los tractos ópticos, el cuerpo geniculado lateral y finalmente, mediante las radiaciones ópticas toda la información llega y termina de procesarse en el córtex visual (Forrester et al., 2016a).

Evidentemente existen numerosas estructuras oculares que participan de manera secundaria en el proceso fisiológico de la visión, cuyo anómalo funcionamiento también pueden alterar el sistema visual. Algunas de ellas serían los párpados, los músculos extraoculares o el sistema lagrimal entre otras (Levin et al., 2011).

1.1. ESTRUCTURA GENERAL DEL GLOBO OCULAR

El globo ocular es la estructura principal que conforma el órgano de la visión. Tiene una forma hueca y redondeada, diferenciando dos segmentos según curvatura y tamaño. El segmento anterior, más pequeño y convexo, da lugar a dos cavidades, la cámara anterior y posterior. El segmento posterior, tiene un radio de curvatura mucho mayor y da forma a la cavidad vítrea (Levin et al., 2011). También es posible dividir el globo ocular en tres capas formadas por diferentes estructuras (Figura 1).

1.1.1. Capa Externa

La capa externa está compuesta por la esclera y la córnea, siendo la capa más resistente, también llamada túnica fibrosa. Aporta rigidez, protección y actúa como soporte estructural.

La esclera es la membrana ocular más sólida y resistente. Está formada por tejido conectivo, que le aporta viscoelasticidad, es opaca y prácticamente avascular. Sus principales funciones son las de protección y mantenimiento estructural. Es necesaria esa elasticidad intrínseca para permitir los movimientos externos del globo ocular provocados por los músculos extraoculares, así como para mantener la forma adecuada al producirse cambios en la presión intraocular (IOP), tanto a lo largo del día como aquellos debidos a alguna enfermedad (Asejczyk-Widlicka & Pierscionek, 2008; Thale & Tillmann, 1993). Además, la esclera junto con la córnea constituye la primera barrera capaz de evitar la difusión de macromoléculas al interior del globo ocular (Kim et al., 2014).

La córnea es la estructura más externa del ojo y se sitúa en la porción anterior. Es transparente, ya que su principal función es la de actuar como lente refractiva, ya que ésta estructura junto con la película lagrimal forman entre dos tercios y tres cuartos del poder óptico del ojo. Además es la primera barrera protectora ante agentes externos gracias a las uniones estrechas que presenta (Sridhar, 2018). Está recubierta por la película lagrimal, cuyo cometido es el de nutrir y mantener la transparencia corneal, al igual que el humor acuoso en su interior, puesto que la córnea es avascular. La córnea está formada por 5 capas, ordenadas de fuera a dentro son: el epitelio corneal, la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio (Del Buey Sayas & Peris Martinez, 2014; Kim et al., 2014; Meek & Knupp, 2015). Estas capas están precisamente organizadas para garantizar la transparencia de la córnea (Sridhar, 2018).

Entre las capas anteriormente explicadas existe una zona de transición denominada limbo esclerocorneal, cuyas funciones son las de aportar nutrientes a la córnea periférica, favorecer la cicatrización corneal y ofrecer respuestas de hipersensibilidad ante cualquier alteración de la superficie ocular entre otras. Su

función más importante es aquella en la que participan sus estructuras más internas, como la malla trabecular y el canal de Schlem, que se encargan del drenaje del humor acuoso, estando claramente implicado en el mantenimiento de la presión intraocular (Forrester et al., 2016a; McMenemy & Steptoe, 1991).

1.1.2. Capa Media

La capa media o túnica vascular está formada por la coroides y la úvea, formada a su vez por el iris y el cuerpo ciliar. Estas estructuras, continuas entre sí, dan lugar a la pupila en la parte anterior del ojo y al nervio óptico en la zona posterior (Forrester et al., 2016a).

El iris es la primera estructura opaca que bloquea parte de los rayos de luz que atraviesan las anteriores capas transparentes del ojo. Por tanto, su función principal es la de actuar como diafragma ocular, dejando pasar solo la luz necesaria en cada situación. En función de la claridad ambiental el iris se dilata o se contrae dejando pasar a través de la pupila los rayos de luz. Divide la cámara anterior de la posterior, y en su raíz se une al ángulo iridocorneal y al cuerpo ciliar (Davis-Silberman & Ashery-Padan, 2008).

La otra estructura que forma parte de la úvea es el cuerpo ciliar. Se trata de un anillo que rodea todo el iris y se continúa con la coroides en la ora serrata. Se divide en la pars plicata o procesos ciliares, donde se produce el humor acuoso, y la pars plana o músculo ciliar, encargado de sujetar las fibras de la zónula de Zinn que moldean el cristalino al estirarse o contraerse durante la acomodación (Levin et al., 2011).

Finalmente, la última estructura que conforma la capa intermedia del ojo es la coroides. Es la zona más posterior ya que se continúa desde la ora serrata hasta el nervio óptico. Está formada principalmente por vasos sanguíneos, y su función principal es la de abastecer de nutrientes suficientes a la retina y la úvea (Forrester et al., 2016a; Levin et al., 2011).

1.1.3. Capa Interna

La capa más interna es aquella formada por la retina, constituyendo la túnica neural. La luz del exterior es enfocada sobre la fovea, el centro de la mácula, dónde será transformada en impulsos neuronales para el posterior procesamiento de las imágenes del entorno. La retina está formada por diferentes tipos de células cuyos núcleos y axones delimitarán un total de 10 capas (Forrester et al., 2016a; Mafee et al., 2005).

Por un lado, el **epitelio pigmentado de la retina (RPE)** es la capa más externa de la túnica neural que conforma el globo ocular. Se encuentra en contacto externamente con la coroides e internamente con la retina neural, y al igual que la túnica vascular, se extiende anteriormente desde la ora serrata hasta la inserción del nervio óptico. Se trata de una única capa celular con gran cantidad de melanina, lo que le confiere unas propiedades óptimas para absorber o reflejar la luz que le llega, siendo esta su principal función junto con la de actuar como barrera y transporte metabólico y aportar una buena adhesión de la capa neuronal (Martínez-Morales et al., 2004; Strauss, 2005).

A continuación, la retina está estratificada de fuera hacia dentro en:

- **Capa de segmentos de los fotorreceptores:** formada por los segmentos de los conos y bastones. Es el lugar dónde comienza la fototransducción.
- **Membrana limitante externa:** entre los núcleos y segmentos de dichos conos y bastones, se forma una membrana con las uniones entre los segmentos y las prolongaciones de las células de Müller.
- **Capa nuclear externa:** dónde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores.
- **Capa plexiforme externa:** en ella se realizan las conexiones entre fotorreceptores, células bipolares, células horizontales y células interplexiformes.
- **Capa nuclear interna:** de nuevo los cuerpos celulares dan lugar a otra capa formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacinas, interplexiformes y las de Müller.

- **Capa plexiforme interna:** los axones de las células bipolares, las ganglionares, amacrinas e interplexiformes, dan lugar a esta capa.
- **Capa de células ganglionares de la retina:** principalmente la conforman los somas de las células ganglionares.
- **Capa de fibras nerviosas de la retina:** los axones de las células ganglionares que se dirigen hacia el nervio óptico forman esta capa.
- **Membrana limitante interna:** Finalmente, las terminaciones de las células de Müller crean esta membrana que limita con el vítreo.

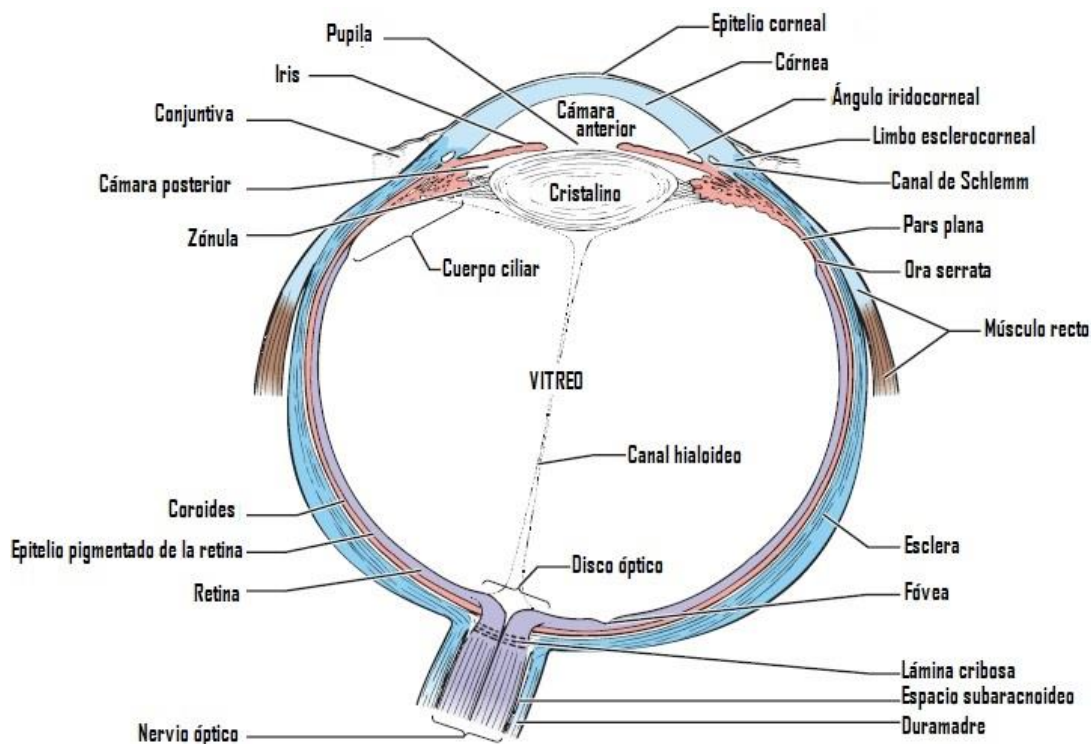


Figura 1. Estructura del globo ocular.

La representación esquemática muestra las estructuras que forman parte de las tres capas del globo ocular. Modificada de (Forrester et al., 2016a).

Además de estas tres capas que se acaban de detallar, para mantener su forma el globo ocular está relleno de dos fluidos transparentes, llamados humor acuoso y humor vítreo. El primero se encuentra ocupando las cámaras anterior y posterior del ojo, en el polo anterior. Estas dos cámaras están divididas por el iris como hemos comentado. El cristalino, sujeto por las fibras de la zónula, limita los dos polos oculares y se encuentra en el centro de todas las capas del ojo que lo rodean. En el polo posterior dando turgencia al globo ocular hallamos el cuerpo vítreo relleno

de humor vítreo ocupando un 80% del volumen total y con una consistencia más gelificada que la del humor acuoso (Forrester et al., 2016a; Remington, 2012b).

A continuación se describen con más detalle las dos estructuras oculares en las que hemos centrado principalmente nuestros estudios: el cristalino y el humor acuoso.

1.2. EL CRISTALINO

El cristalino es una lente biconvexa, avascular y transparente que se sitúa en el polo anterior del globo ocular por detrás del iris, delimitando el humor acuoso de la cámara posterior y el humor vítreo. Estos fluidos, que le rodean, son la principal fuente de nutrientes para sus células ya que no está vascularizado. Su principal función es la de enfocar la luz a la retina y, por lo tanto, es muy importante el mantenimiento de su transparencia. Debido a su posición a lo largo del eje óptico, está continuamente expuesto a la radiación solar (Andley, 2008; Forrester et al., 2016a).

El cristalino tiene un alto contenido en proteínas que representan, aproximadamente, un 38% de su masa. Entre estas proteínas, las cristalinas suponen el 90% de las proteínas solubles presentes en la lente (Pescosolido et al., 2016). La organización estructural de las cristalinas es fundamental para preservar la correcta transparencia del cristalino (Bloemendal et al., 2004). Además de su papel estructural, las cristalinas desarrollan otras funciones tales como actuar como chaperonas, proteger a las células de la apoptosis inducida por estrés, regular el crecimiento celular y aumentar la estabilidad genómica (Pescosolido et al., 2016; Timsina & Mainali, 2021).

En cuanto a la formación embriológica del cristalino, éste se empieza a distinguir a partir del día 27 del embarazo. Se puede observar la llamada vesícula del cristalino compuesta por una capa de células epiteliales formando una esfera vacía en su interior. Las células de la zona posterior se alargan y se diferencian convirtiéndose en las fibras primarias del cristalino, creciendo y llenando la esfera. Por esta razón, en el adulto solo existe epitelio anterior. Durante la vida del

individuo las células del epitelio se dividirán en la zona germinativa e irán formando las fibras secundarias que irán rodeando las más viejas (Forrester et al., 2016b; Remington, 2012a).

Podemos dividir el cristalino en diferentes capas: la cápsula del cristalino, la capa de células del epitelio del cristalino y la capa de fibras del cristalino (Figura 2) (Hejtmancik et al., 2015; Remington, 2012a).

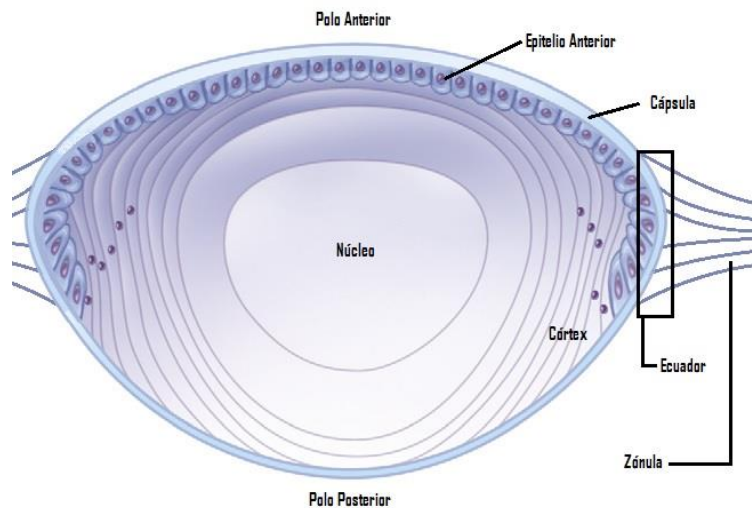


Figura 2. Estructura del cristalino.

Dibujo esquemático representativo de las capas que conforman el cristalino. Modificada de (Remington, 2012a).

1.2.1. Cápsula del Cristalino

La cápsula del cristalino es una membrana basal y es la capa más externa que envuelve toda la lente. En la zona intermedia entre el polo anterior y posterior de la propia lente se encuentra el ecuador. En esta región la cápsula es más gruesa y se insertan las fibras de la zónula responsables de moldear la curvatura del cristalino para acomodar y enfocar así objetos cercanos. En posición de reposo el cristalino tiende a adoptar una forma esférica. Con los años el grosor de la cápsula aumenta, sobre todo la zona pegada al epitelio anterior. Además, ésta actúa como barrera protectora ante grandes moléculas (Levin et al., 2011).

1.2.2. Células del Epitelio del Cristalino

La capa de células del epitelio anterior del cristalino se encuentra adyacente a la región anterior de la cápsula y a medida que se acercan al ecuador, en la zona germinal, se transforman en fibras. Se trata de una monocapa de células cuboidales encargada del transporte metabólico de nutrientes. La zona basal de la célula se dirige hacia la cápsula y, por tanto, la porción apical se orienta hacia el centro. Las células se encuentran unidas entre sí mediante desmosomas y uniones en hendidura (GAP junctions) (Andley, 2008).

1.2.3. Fibras del Cristalino

En la capa de fibras del cristalino, se pueden diferenciar la corteza y la zona nuclear interna. A lo largo de toda la vida se van produciendo nuevas fibras. Desde la zona ecuatorial, las células del epitelio se van diferenciando, alargándose y perdiendo sus orgánulos para convertirse en las fibras secundarias del cristalino que se acumulan concéntricamente como las capas de una cebolla (Zelenka & Arpitha, 2008). Por tanto, la zona nuclear es aquella que alberga las fibras más antiguas. Se puede observar, mediante una sección transversal, como las fibras adoptan una forma hexagonal. Además, en su citoplasma se localizan una gran cantidad de proteínas cristalinas que contribuyen al mantenimiento del índice de refracción necesario (Vavvas et al., 2002). Son muy importantes también los desmosomas y las uniones GAP que se encuentran entre las fibras del cristalino, al igual que en las células del epitelio anterior, y que permiten el transporte de iones y pequeñas moléculas entre ellas. Este transporte está facilitado también por una corriente iónica que se produce entre la zona del ecuador y los dos polos del cristalino, generado gracias a la actividad de Na^+/K^+ ATPasas (Mathias et al., 2007). De la misma manera, existe un constante transporte de agua que ayuda a expulsar los desechos y mantener la transparencia del cristalino siguiendo la misma corriente (Forrester et al., 2016c; Remington, 2012a).

1.3. HUMOR ACUOSO

El humor acuoso es el fluido transparente y especializado que rellena las cavidades de la cámara anterior y posterior del ojo del polo anterior, con un volumen de 250 μ L aproximadamente (Civan, 1998).

1.3.1. Función y composición

Una de sus múltiples funciones es la de proporcionar nutrientes a las estructuras avasculares subyacentes: la córnea y el cristalino. Principalmente aporta oxígeno, glucosa y otros metabolitos necesarios como electrolitos (iones orgánicos e inorgánicos), carbohidratos, glutatión, urea, aminoácidos, proteínas y agua, de los que está compuesto (Goel et al., 2010; Remington, 2012b). Es similar al plasma sanguíneo ya que procede de los capilares fenestrados del estroma de los procesos ciliares, pero con una concentración de proteínas 200 veces menor, entre ellas la albúmina es la más abundante, así como una proporción de entre 20-50 veces más de ácido ascórbico en comparación con el plasma. Esta concentración tan alta de ácido ascórbico contribuye a su vez a la protección del cristalino ante la radiación ultravioleta (Krause & Raunio, 1969; Reddy et al., 1998; Taylor et al., 1991).

Otra de sus competencias es la de actuar como transportador no específico de citoquinas, neurotransmisores e inmunoglobulinas. También se encarga de eliminar los desechos celulares y de mantener una presión intraocular estable. El flujo de entrada y salida del humor acuoso determina la IOP. La alteración de su flujo (tanto de entrada como de salida) puede provocar un aumento en la IOP y conducir al glaucoma (Forrester et al., 2016c; Huang et al., 2018).

Su transparencia es de vital importancia puesto que es importante mantener unas condiciones ideales para que la luz lo atravesase sin desviarse y conservando un índice de refracción de 1.33 para contribuir con la función refractiva que tienen todas las estructuras transparentes del ojo.

1.3.2. Producción

Los procesos ciliares son los encargados de la producción de humor acuoso hacia el interior de la cámara posterior (Figura 3). Tanto el ratio de entrada como el de salida son similares, alrededor del 1-1.5% de su volumen total en mamíferos, así que en ojos sanos de humanos la tasa de producción suele ser de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ aproximadamente (Levin et al., 2011).

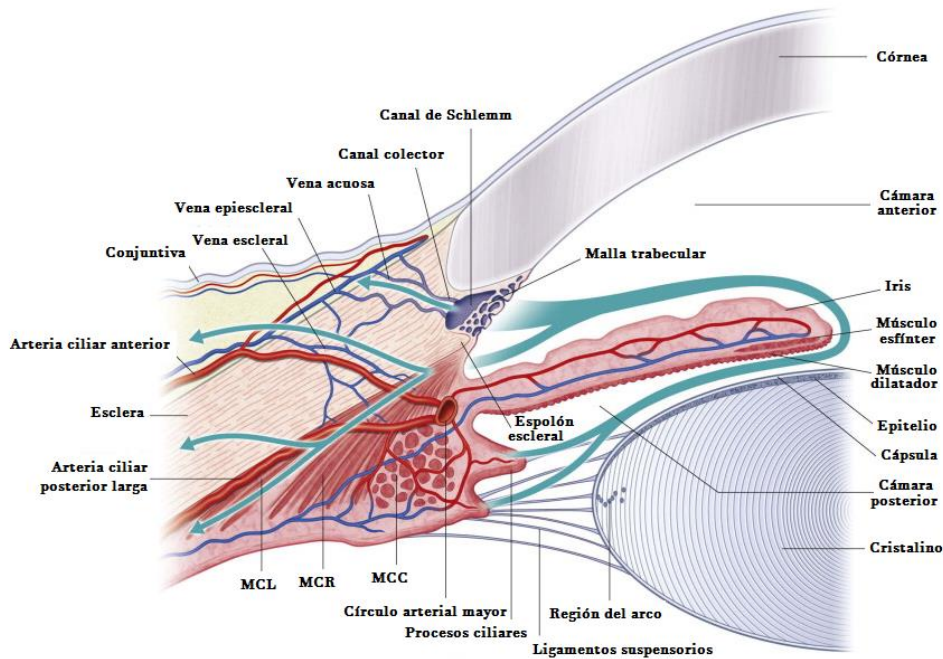


Figura 3. Esquema de entrada y salida del humor acuoso y sus estructuras adyacentes.

El humor acuoso se produce en los procesos ciliares, se dirige hacia el centro del iris a través de la cámara posterior, atraviesa la pupila y se drena en las diferentes estructuras del ángulo iridocorneal pasando por la cámara anterior. Modificada de (Levin et al., 2011).

Los procesos ciliares o pars plicata del cuerpo ciliar están formados por una bicapa de células epiteliales, que está en contacto directo con la cavidad de la cámara posterior y por tanto, con el humor acuoso, es el denominado epitelio no pigmentado. Por debajo de ésta, situada más externamente, nos encontramos con la capa de células del epitelio pigmentado de los procesos ciliares (Forrester et al., 2016a; Levin et al., 2011).

Durante el proceso de formación del humor acuoso existen tres fases consecutivas que se tienen que llevar a cabo. Por un lado, tiene que producirse una irrigación continua de los procesos ciliares, mediante el flujo sanguíneo que

llega a él mediante los capilares que lo rodean. A través de estos capilares fenestrados se filtra el plasma hacia los espacios intersticiales entre los vasos y el epitelio ciliar. Por último, en el epitelio ciliar se produce la secreción de la mayor parte del líquido hacia la cámara posterior mediante una secreción activa, ya que ocurre en contra del gradiente de presión (Brubaker, 1991).

1.3.3. Drenaje

Existen dos vías de salida del humor acuoso: la vía convencional y la vía no convencional. La mayor parte del fluido que rellena las cavidades de la cámara anterior y posterior del ojo se drena sobre todo a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm (vía convencional), creando un flujo de humor acuoso que sale de la pars plicata de los procesos ciliares, pasando por la pupila y termina en el ángulo iridocorneal. A través de la vía de salida uveoescleral (o no convencional), el humor acuoso es drenado por difusión a través de la esclera por los espacios de la malla uveal (Figura 3) (Huang et al., 2018; Macknight et al., 2000; Remington, 2012b).

La vía convencional, como hemos explicado, comienza en la cámara anterior. Desde allí, el humor acuoso pasa a través de la malla trabecular y sus múltiples capas entrando en el canal de Schlemm. Seguidamente el fluido se dirige hacia los canales colectores, llegando al plexo venoso intraescleral y, para terminar, se evacúa en las venas acuosa y episcleral donde el humor acuoso se une a la circulación venosa redirigiéndose hacia el corazón, volviendo a empezar todo el ciclo (Huang et al., 2018).

La vía no convencional, a diferencia de la anterior, desplaza el humor acuoso hacia la zona más anterior del cuerpo ciliar desde la cámara anterior a través del espacio supracoroideo mediante difusión y el líquido acaba saliendo del ojo por los vasos a través de la esclera (Huang et al., 2018).

2. CATARATA

La catarata es la opacificación o pérdida de transparencia del cristalino, siendo ésta la principal causa de ceguera reversible en el mundo. La prevalencia de las cataratas es de alrededor del 47.8% entre la población de más de 50 años (Prokofyeva et al., 2013). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las cataratas son las responsables de más del 40% de los casos de ceguera a nivel mundial (Lee & Afshari, 2017; Prokofyeva et al., 2013) y esta cifra aumenta hasta el 90% en el caso de los países desarrollados (Thompson & Lakhani, 2015). Como consecuencia del aumento de la esperanza de vida se espera un continuo incremento de esta patología en los próximos años, cuyos costes médicos directos suponen una carga económica considerable para los sistemas de salud públicos. En particular, la OMS estima que unas 50 millones de personas tendrán ceguera por cataratas en el año 2050 (Fan et al., 2017).

La característica opacificación del cristalino en las cataratas es el resultado de cambios en las proteínas en las células del cristalino o en la estructura de las células del cristalino perdiéndose la microarquitectura celular del cristalino (Brennan & Kantorow, 2009).

Se trata de una enfermedad multifactorial que está asociada al envejecimiento, a la exposición de la luz, al consumo de tabaco y alcohol; así como a diferentes patologías como la diabetes, la obesidad, hipertensión y el consumo de cierta medicación sistémica (Vrensen, 2009). También puede ocurrir como consecuencia de factores hereditarios, traumatismos, inflamación y trastornos metabólicos o nutricionales, entre otros. Normalmente la aparición de cataratas es bilateral pero se encuentran comúnmente casos asimétricos (Asbell et al., 2005).

El tratamiento más directo y efectivo para las cataratas es la cirugía, en la que los cristalinos opacos se reemplazan por lentes intraoculares. A pesar de ser un procedimiento eficaz, pueden existir algunas complicaciones tales como dislocación intraocular de la lente, inflamación tras la cirugía así como opacificación capsular posterior (Goodman et al., 1989). Por otra parte, en áreas del tercer mundo con pocos recursos médicos y económicos la realización de este

tipo de cirugía no resulta tan accesible (Wang et al., 2016). Por todo ello, el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento y/o prevención de las cataratas sigue representando un importante área de investigación a nivel ocular (Xu et al., 2020).

2.1. TIPOS DE CATARATAS

La clasificación de las cataratas es amplia y compleja, ya que podemos dividir las en función de su causa, el momento de la aparición o dependiendo de la localización de la opacificación. Siguiendo este último criterio podemos distinguir tres tipos de cataratas principalmente: nuclear, cortical y subcapsular posterior (Figura 4) (Asbell et al., 2005; Olver et al., 2014; Thompson & Lakhani, 2015).

2.1.1. Catarata Nuclear

Las cataratas nucleares son el tipo más común de opacificación en el cristalino. Su aparición se asocia al envejecimiento del cristalino con la edad. El número de capas de fibras aumentan, comprimen y endurecen, amarilleando el cristalino. Su progresión es lenta y van asociadas a un cambio de refracción, aumentando el poder dióptrico y provocando consecuentemente una miopía debida a la catarata. Normalmente no afectan mucho a la visión hasta que ya está muy avanzada, pudiendo afectar tanto a la visión de los colores como a la visión de lejos, puesto que tiende a miopizar, mejorando por tanto, la visión de cerca de los pacientes que por norma general suelen ser presbitas (Asbell et al., 2005). En el núcleo de los cristalinos de individuos con este tipo de catarata se ha detectado una reducción en los niveles del agente antioxidante glutatión (Reddy, 1990; Sweeney & Truscott, 1998) lo que, como se comentará posteriormente, va a estar relacionado con la existencia de estrés oxidativo, un evento patológico clave en el desarrollo de las cataratas.

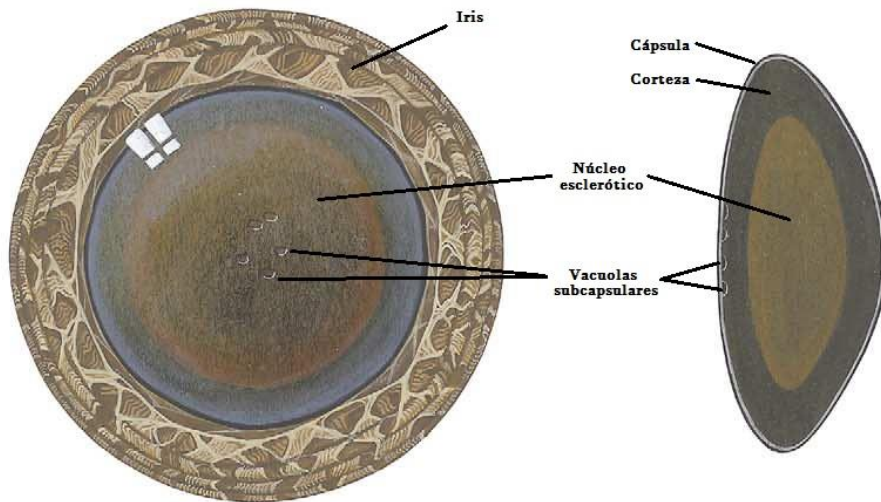
2.1.2. Catarata Cortical

En la corteza del cristalino se van generando las nuevas fibras, con la edad pueden aparecer opacidades blancas en forma de estrías, empezando por la zona más periférica hasta llegar a alcanzar el centro del eje visual, produciendo la aparición de una catarata cortical (Asbell et al., 2005). Entre los síntomas más comunes entre los pacientes con cataratas corticales nos encontramos con el deslumbramiento y la mala visión nocturna que les dificulta la conducción (Remington, 2012a; Thompson & Lakhani, 2015).

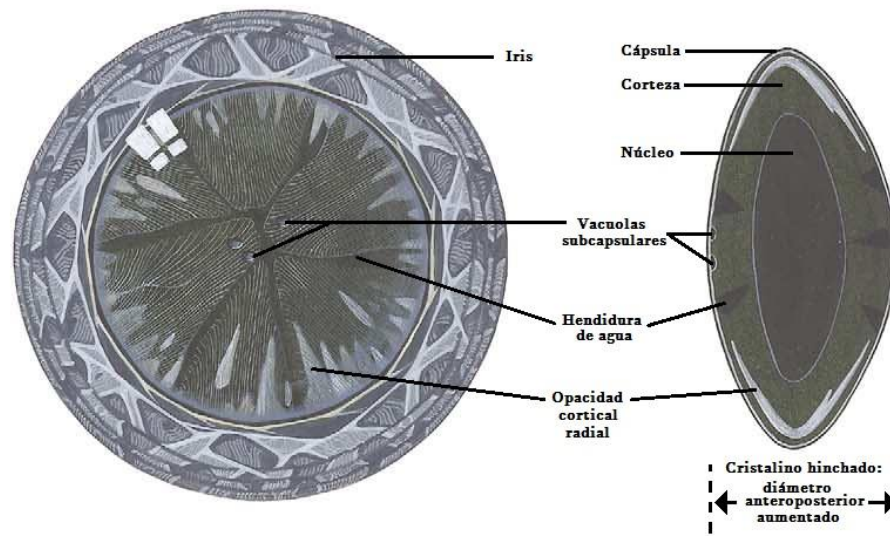
Se ha sugerido la asociación de este tipo de catarata con una alteración del equilibrio osmótico en las fibras debido al aumento de calcio y la alteración de los niveles de sodio y potasio, como consecuencia de un mal funcionamiento de los sistemas de transporte iónico, lo que conduce a la acumulación de agua en la fibra (Delamere & Tamiya, 2009). Las fibras muestran una disrupción de su estructura e incluso puede producirse la rotura de sus membranas. Por otra parte, se ha demostrado que el incremento en la concentración de calcio induce procesos de proteólisis (Rhodes & Sanderson, 2009) debido a la activación de la proteasa calpaína 2 por calcio (Biswas et al., 2005), aspecto que se comentará con más detalle en el apartado sobre mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de cataratas.

Por otra parte, se ha relacionado su aparición con una alta exposición a la radiación de rayos ultravioleta (UV) a lo largo de la vida. Curiosamente, a pesar de asociarse con la exposición a la luz UV, la zona en la que comienza esta degradación es la ecuatorial, aquella que está más protegida de la luz gracias al iris (Remington, 2012a). Además, suele ser el tipo de catarata más común entre pacientes diabéticos (Obrosova et al., 2010).

CATARATA NUCLEAR



CATARATA CORTICAL



CATARATA SUBCAPSULAR POSTERIOR

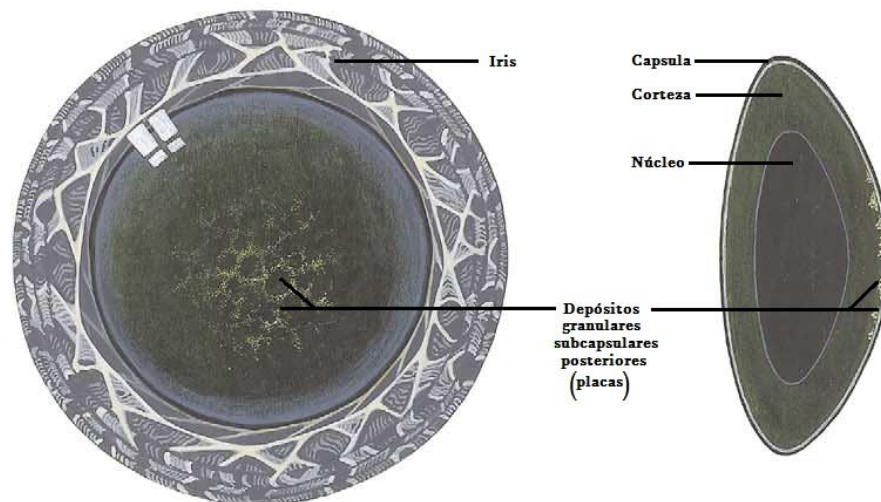


Figura 4. Tipos de cataratas.
 Representación esquemática de las cataratas nucleares, corticales y subcapsulares posteriores. Modificada de (Asbell et al., 2005).

2.1.3. Catarata Subcapsular Posterior

Las cataratas subcapsulares posteriores se producen en la zona central de la corteza del cristalino y tienen forma granular. Este tipo de opacidad se debe a la migración de células epiteliales hacia la región ecuatorial del cristalino y su acumulación en el polo posterior del cristalino (Remington, 2012a). Su evolución es muy rápida y la mayoría de los pacientes no presentan síntomas hasta que la catarata está bien desarrollada. Los pacientes que llegan a presentar síntomas tienden a tener problemas con el exceso de luz y la pupila se contrae, ya que la opacificación se sitúa en la zona central. Los pacientes con este tipo de cataratas suelen ser más jóvenes y se quejan de deslumbramientos nocturnos y de mala visión en cerca (Asbell et al., 2005). Suele ser común en personas que utilizan corticoesteroides (Thompson & Lakhani, 2015).

2.1.4. Opacificación Capsular Posterior

También existe otro tipo de catarata que son secundarias a la propia cirugía de cataratas. A esta anomalía se le llama opacificación capsular posterior (PCO) y es la principal complicación postoperatoria. Ocurre como consecuencia de una proliferación de restos de células del epitelio anterior del cristalino que permanecen adheridas a la cápsula anterior y que, como respuesta a la cicatrización tras el trauma quirúrgico y a la herida que produce la cirugía, se reproducen o se fibrosan en la zona posterior de la capsula del cristalino. La proliferación celular conduce finalmente a la dispersión de la luz y la disminución de la visión. Este tipo de opacificación puede ocurrir después de unos meses e incluso años tras la cirugía de cataratas (de Longh et al., 2005).

Dependiendo del grado de evolución de la opacificación existen dos tipos de PCO. La PCO fibrótica y la PCO regenerativa que aparece a medida que avanza la PCO fibrótica y que se caracteriza por la presencia del llamado anillo de Soemmerring y las perlas de Elschnig (células de aspecto globular debido a una diferenciación aberrante) (Wormstone et al., 2021).

En la PCO fibrótica se observa contracción de la cápsula posterior, aumento de la proliferación y agregación celular, depósitos de matriz extracelular y mayor presencia de miofibroblastos (Wormstone et al., 2021). Crecientes evidencias científicas indican que el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) está implicado en la formación de la PCO fibrótica (Joseph et al., 2019; Mamuya et al., 2014). Durante la EMT, las características específicas de las células de tipo epitelial desaparecen, perdiendo su polaridad y adhesión célula-célula, mientras que adquieren capacidades de invasión y migración y se transforman en células mesenquimales, caracterizadas por una morfología de tipo miofibroblasto (Inés & Niradiz, 2015). La transición comienza con la alteración progresiva de las uniones epiteliales constituidas por las proteínas zónula ocludens-1 (ZO-1), ocludina y E-cadherina, junto con la acumulación de α -actina, reorganización de las fibras de actina y aumento de la expresión de proteínas de la familia *snail* como SNAI-1 (*Snail Family Transcriptional Repressor 1*) (Zeisberg & Neilson, 2009).

Dada la importancia de la EMT en el desarrollo de la PCO, la regulación terapéutica del proceso de transición epitelio-mesénquima está siendo considerada con el fin de disminuir la incidencia de este tipo de complicación tras la cirugía de cataratas (Y. Li et al., 2019).

2.2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE CATARATAS

2.2.1. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando hay una alteración entre el equilibrio de radicales libres y la capacidad de eliminación de éstos por parte de los agentes y enzimas antioxidantes. La estabilidad de una molécula se logra al estar los electrones dispuestos en su último orbital de forma apareada. Los radicales libres se producen cuando un átomo o molécula gana o pierde un electrón por diferentes procesos convirtiéndose en una especie química altamente inestable (Ahmad & Ahsan, 2020; Lobo et al., 2010). Aunque su vida media es muy corta, en cada reacción de oxidación con otro átomo o molécula, los radicales libres puede generar nuevas formas con diferente nivel de estabilidad y toxicidad. En los

organismos aeróbicos, los radicales libres más importantes son los que se generan durante el metabolismo del oxígeno, y se denominan ROS (especies reactivas de oxígeno). Dentro de las especies reactivas de oxígeno más comunes destacan el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A nivel ocular, uno de los más importantes oxidantes encontrados en el humor acuoso y la úvea anterior es el peróxido de hidrógeno (Kruk et al., 2015), siendo sus niveles más elevados tanto en el cristalino como en el humor acuoso de pacientes con cataratas frente a sujetos que no presentan ningún tipo de opacidad (Spector, 1995).

El envejecimiento aumenta la susceptibilidad del cristalino al daño oxidativo, por lo que el estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo y la progresión de las cataratas asociadas a la edad. Con la edad se incrementa la acumulación de productos de oxidación del cristalino, mientras desciende la concentración de agentes y enzimas antioxidantes y se debilitan los sistemas de reparación y protección frente al daño oxidativo (Brennan & Kantorow, 2009). En este sentido, se ha demostrado un descenso de los niveles de glutatión reducido (GSH) en el cristalino con la edad (Bova et al., 2001). El glutatión tiene importantes funciones en el cristalino protegiéndole frente a estrés químico y oxidativo y manteniendo el estado reducido de los grupos tiol proteicos previniendo de este modo la formación de agregados de cristalinas y la pérdida de transparencia (Pescosolido et al., 2016). Igualmente, en cristalinos de sujetos de mayor edad existe una reducción de la expresión de Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor*) (Gao et al., 2015). La proteína Nrf2 es un sistema celular de defensa antioxidante inducible, que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de múltiples genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes previniendo así la toxicidad y daño celular (Königsberg, 2007).

Asimismo, durante el envejecimiento disminuye la actividad de enzimas antioxidantes fundamentales tales como como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa (Babizhayev, 2016; Brennan & Kantorow, 2009). Por el contrario, la actividad de algunas enzimas pro-oxidantes como la xantina

oxidasa sérica muestra un gradual incremento con la edad en pacientes con catarata senil (Miric et al., 2013).

En el cristalino, al igual que en otras partes del ojo, la mitocondria es una fuente endógena fundamental de ROS, los cuales son principalmente generados en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Ott et al., 2007).

A nivel exógeno cabe destacar la contribución de la luz UV y visible. La radiación UVA y las longitudes de onda más largas de la radiación UVB son absorbidas por el cristalino. El cristalino posee moléculas de tipo cromóforo que actúan como filtros UV, tales como la 3-hidroxiquinurena (Mizdrak et al., 2008) y las cristalinas por sí mismas poseen mecanismos para dispersar de manera eficiente la energía absorbida (Chen et al., 2009). Con la edad, la capacidad del cristalino para filtrar la luz UV es inferior, aproximadamente, en un 12% por década (Ferrer Fernández et al., 2009) y las sustancias que actúan como filtro experimentan alteraciones, de modo que comienzan a comportarse como fotosensibilizadores. Así, pasada la mediana edad, cromóforos protectores, como la 3-hidroxiquinurena, se convierten en cromóforos destructivos, que al absorber luz generan la formación de ROS (Finley et al., 1998; Roberts et al., 2001) Por consiguiente, la exposición continua a la radiación UV puede inducir un significativo incremento en especies oxidantes, promoviendo daño fotooxidativo en el cristalino. Diversos estudios epidemiológicos indican la relación entre la exposición acumulativa a luz solar y la formación de cataratas (Tang et al., 2015; Vashist et al., 2020).

Por otra parte, en el caso de la luz visible, en los últimos años ha adquirido una particular importancia la luz blanca de tipo LED (*light-emitting diode*) para la iluminación de la pantalla de diversos dispositivos electrónicos así como para la iluminación general a nivel doméstico. Algunos artículos han sugerido que esta luz blanca LED, caracterizada por un intenso componente de luz azul (longitudes de onda corta en el visible), podría inducir también reacciones de fotosensibilización favoreciendo el daño fotooxidativo en el cristalino y el desarrollo de cataratas (Song et al., 2020; Wang et al., 2020; Xie et al., 2014).

Respecto a los efectos que provoca el estrés oxidativo en el cristalino en relación a la generación de cataratas, el exceso de ROS conduce a la oxidación y agregación de las cristalinas, provocando la pérdida de transparencia y la formación de cataratas (Moreau & King, 2012). Además de la oxidación de las cristalinas, la peroxidación lipídica de las membranas celulares, el desequilibrio en la homeostasis de calcio, el daño al ADN, y fenómenos de muerte celular de tipo apoptótico también contribuyen al desarrollo de cataratas inducido por estrés oxidativo (Babizhayev et al., 2004; Kernt et al., 2010; Liu et al., 2017).

Además, se ha determinado que el estrés oxidativo en el cristalino puede estar asociado a la aparición de procesos inflamatorios y de piroptosis (muerte celular de tipo inflamatorio). Concretamente, se ha demostrado la activación del inflamasoma NLRP3 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3*) por ROS en el cristalino (Zou et al., 2020). La activación del inflamasoma NLRP3 ha sido recientemente considerada como un mecanismo implicado en el desarrollo de cataratas ya que el bloqueo de la actividad de este complejo proteico permitió inhibir la inducción de cataratas en un modelo murino (Marneros, 2016).

2.2.2. Mecanismos Patológicos en Catarata Diabética

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica debida a una deficiencia de insulina, la resistencia o incapacidad de absorción de esta hormona o una combinación de ambas. Como consecuencia de ello se va a producir una hiperglucemia crónica y una alteración en el metabolismo de diferentes sustancias como las grasas, las proteínas o los carbohidratos.

Existe una alta incidencia de las cataratas en pacientes diabéticos, por lo que se considera una de las principales causas de discapacidad visual entre este grupo de pacientes (Pollreisz & Schmidt-Erfurth, 2010).

Las cataratas en los pacientes con diabetes se originan como consecuencia de la acumulación de sorbitol en el cristalino (Figura 5). La alta concentración de glucosa

desencadena la activación de la aldosa reductasa, primera enzima de la vía de los polioles, ruta metabólica en la que la glucosa se transforma en sorbitol (Kador et al., 2016). En los pacientes diabéticos se produce un desequilibrio entre la acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa, que debería convertir el sorbitol en fructosa, y la producción de sorbitol. Esto lleva a que el sorbitol se acumule (su carácter polar impide su difusión) generándose cambios osmóticos que acaban provocando fibras hidrópicas en el cristalino (Kiziltoprak et al., 2019). Estas fibras hinchadas pueden incluso romperse, dando como resultado opacidades en el cristalino.

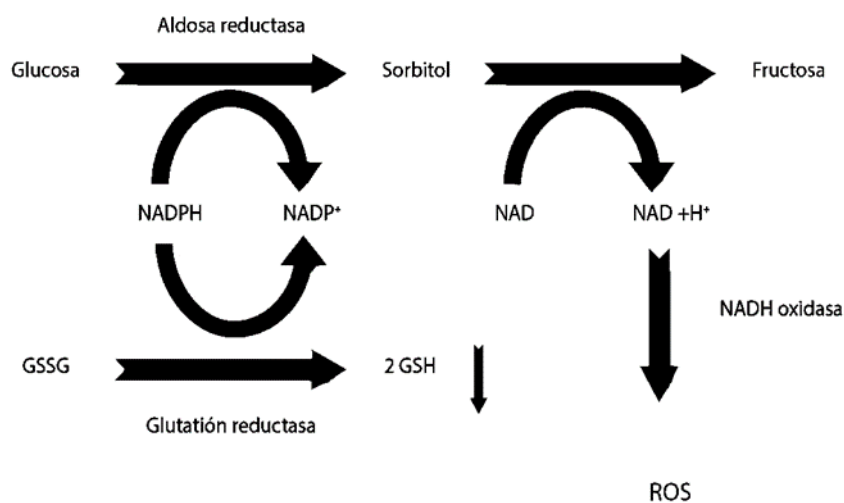


Figura 5. Vía de los polioles. Modificada de (Tang et al., 2012).

La vía de los polioles, además, contribuye a generar un exceso de ROS (Figura 5). La coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), necesaria para el inicio de la vía de los polioles, se precisa también para la regeneración de glutatión reducido, por ello, el consumo de NADPH en la vía de los polioles puede disminuir la regeneración del agente antioxidante glutatión (Tang et al., 2012). Además, en la reacción del sorbitol a fructosa se origina NAD + H⁺, que puede generar ROS por medio de la NADH oxidasa. La fructosa producida en la ruta puede transformarse en 3-desoxiglucosona, la cual es un potente agente de glicación no enzimática. De esta forma el flujo de glucosa a través de la vía de los polioles lleva a la generación de ROS y al incremento en la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Tang et al., 2012). Esta glicación no enzimática puede afectar a las cristalinas aumentando su tendencia a agregarse o

entrecruzarse con otras proteínas (Nagaraj et al., 2012), así como inactivar a enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Morgan et al., 2002).

Por otra parte, los niveles altos de glucosa pueden también estimular el estrés oxidativo a través de la auto-oxidación de la glucosa (Wolff & Dean, 1987) o bloqueando las cadenas de transporte de electrones en las mitocondrias lo que conlleva una producción excesiva de aniones superóxido (Nishikawa et al., 2000).

2.2.3. Desregulación del Contenido en Calcio

La alteración de la homeostasis del calcio se ha asociado con varios tipos de cataratas humanas y experimentales (Gupta et al., 2004). Se han encontrado elevados niveles de calcio intracelular en cristalinos humanos de cataratas corticales y el tratamiento de cristalinos sanos con calcio extracelular induce la aparición de cataratas corticales (Duncan & Jacob, 1984; Marcantonio et al., 1986). Junto con la opacificación producida en esos cristalinos con un contenido en calcio intracelular incrementado, se observó además una activación de procesos proteolíticos existiendo una importante reducción del contenido en cristalininas en ellos (Rhodes & Sanderson, 2009). Estudios posteriores revelaron que esa actividad proteolítica aumentada era debida a la activación por calcio de las calpaínas (Shearer et al., 2000). Las calpaínas son cisteín-proteasas dependientes de calcio y dentro de esta familia se ha identificado a la calpaína 2 como la principal responsable de la degradación de las cristalininas y la inducción de catarogénesis (Biswas et al., 2004)

Por otra parte, recientemente se ha determinado que el aumento intracelular de calcio en el cristalino puede activar hemicanales de conexina en las fibras del cristalino alterando su correcta homeostasis y favoreciendo así el desarrollo de cataratas (Hu et al., 2020).

2.3. MODELOS EXPERIMENTALES DE CATARATA EN ANIMALES

Debido a la dificultad para realizar estudios en humanos sobre el proceso de formación de las cataratas se han creado diferentes modelos de experimentación animal con catarata, siendo los roedores los que se han utilizado en la mayoría de las investigaciones. Dependiendo del proceso utilizado se inducirá un tipo de catarata u otro.

Hay diferentes formas de emular las cataratas nucleares asociadas a la edad y de otros tipos como la administración de varios agentes químicos, inducir alteraciones en la dieta o proporcionar radiación UV a los animales (Lim et al., 2016). Además existen modelos genéticos de tipo hereditario y knockout.

Se generó una cepa de ratas, llamadas OXYS, mediante una dieta alta en galactosa cuya alteración en el metabolismo de la glucosa llevaba a la aparición de opacidades en el cristalino (Solov'eva et al., 1982). Para la inducción de cataratas nucleares puede inyectarse selenito de sodio (Na_2SeO_3), provocando la rápida aparición de cataratas a los 4-6 días (Shearer et al., 1997). El selenito de sodio parece disminuir los niveles de glutatión reducido, favoreciendo la aparición de estrés oxidativo, así como aumentar la concentración de calcio originando fenómenos de proteólisis en el cristalino (Lim et al., 2016). Caixinha y colaboradores (Caixinha et al., 2016) utilizaron este modelo para clasificar este tipo de opacificaciones en ratas ya que provoca una catarata muy similar a las cataratas asociadas a la edad en humanos, donde el daño oxidativo juega un papel muy importante en su evolución. Dependiendo del momento de la inyección con selenito o de la concentración, se pueden obtener diferentes niveles de gravedad en las cataratas inducidas mediante esta técnica (Caixinha et al., 2016).

Otro compuesto que se ha empleado para el desarrollo de cataratas es la L-butionina- (S, R)-sulfoximina. Tras repetidas inyecciones con este agente en ratones, se ha detectado que produce una alteración en los niveles de sodio, potasio y calcio así como la aparición de vacuolas en las células epiteliales y las fibras que conducen al desarrollo de cataratas corticonucleares (Lim et al., 2016; Mårtensson & Meister, 1991). Por otra parte, mediante la ingesta del agente

químico naftalina en ratas se consigue inducir unos niveles altos de estrés oxidativo al producir la depleción de glutatión reducido, lo que conduce a la formación de cataratas corticales (Xu et al., 1992).

El uso de la radiación UVA ha sido estudiado en cobayas, demostrando que la exposición crónica a radiación UV originaba procesos de agregación proteica y dispersión de luz en el núcleo del cristalino, generando cataratas (Simpanya et al., 2008). Los rayos X son otro tipo de radiación generadora de cataratas al inducir en las células del cristalino de ratones a una transición epitelio-mesenquimatosa (EMT) que acaba alterando sus fibras (De Stefano et al., 2016). También se analizó el efecto del tratamiento de descompresión mediante cámara hiperbárica con oxígeno, en conejillos de indias (*in vivo*) (Giblin et al., 1995) y en cristalinos de conejo (*in vitro*) (Giblin et al., 1988), pudiéndose utilizar esta tecnología en animales con una edad más avanzada que con el resto de métodos de inducción a la catarata. Los cambios estructurales que aparecen recuerdan los presentes en cataratas humanas incipientes (Freel et al., 2003) y también se detectaron cambios bioquímicos característicos de las cataratas nucleares como el incremento del estado oxidativo, descenso de los niveles de glutatión reducido o agregación de proteínas (Lim et al., 2016) sugiriendo la utilidad de este modelo para estudiar los cambios bioquímicos asociados a la formación de cataratas (Lim et al., 2016).

Respecto a los modelos genéticos, en 1982, fue estudiado el ratón Emory, un ratón capaz de desarrollar cataratas seniles de forma lenta (a los 5-6 meses de edad), permitiéndole ser una buena opción para realizar ensayos farmacológicos que intenten actuar sobre el proceso de cataratogénesis para evitar la aparición de opacidades (Kuck et al., 1981). También existen modelos de tipo *knockout* como el *knockout* de la proteína glutaredoxina 2, que desarrolla opacidad nuclear a los 5 meses y ésta se extiende a la capa cortical a los 8 meses (Wu et al., 2014). Entre los cambios bioquímicos observados en el modelo figuran la pérdida de glutatión reducido y de actividad chaperona, así como una actividad mitocondrial comprometida (Wu et al., 2014).

Mediante el empleo de agentes químicos es también posible generar modelos de animales diabéticos que van a desarrollar cataratas. Los dos compuestos más frecuentemente utilizados para el desarrollo de este tipo de modelos son la estreptozotocina y el aloxano, de acción citotóxica sobre las células β -pancreáticas de los islotes de Langerhans. Estas células son las responsables de la síntesis y secreción de la insulina, de esta forma se origina una diabetes crónica caracterizada por bajos niveles de insulina y altos niveles de glucosa (Lenzen, 2008).

Concretamente, en esta tesis doctoral se utilizó el agente aloxano (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) que puede actuar como inductor de la diabetes en diferentes modelos animales experimentales (Figura 6) (Szkudelski, 2001). Es importante administrar la cantidad adecuada para el efecto que se pretende conseguir según la especie de animal de experimentación de queramos analizar, ya que la sensibilidad al aloxano depende del espécimen que estudiemos (Tyrberg et al., 2001). En conejos la dosis recomendada es de 100-150 mg/kg (Bozkurt & Pekiner, 2006; Hsu et al., 2012). Se ha demostrado que aplicar dosis de 200 mg/kg o más, en conejos, provoca graves daños en los islotes de Langerhans y sus células (Dunn et al., 1944). El efecto del tratamiento con aloxano se ha confirmado en diferentes modelos animales de experimentación, observando claramente una relación inversa entre la concentración de aloxano añadida y la insulina liberada (Eizirik et al., 1994).

La exposición prolongada a la situación de hiperglicemia conduce al desarrollo de la catarata. Como ya se ha comentado en el apartado de mecanismos patológicos en catarata diabética, la catarata diabética se caracteriza por el estrés osmótico que afecta a las fibras del cristalino debido a la acumulación de sorbitol generado en la ruta de los polioles (Hsu et al., 2012). Además, la activación de esta ruta contribuye a generar un exceso de ROS. Los cambios histológicos oculares encontrados en estos animales diabéticos resultan ser similares a los observados en pacientes diabéticos (Herse & Hooker, 1994).

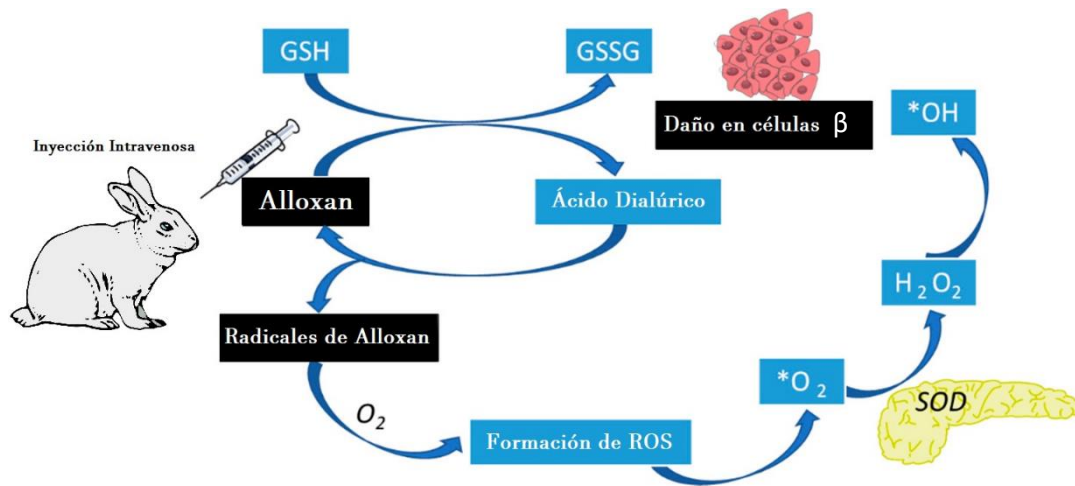


Figura 6. **Mecanismo de acción del aloxano.**

El aloxano tras inyectarse en la vena de la oreja se reduce a ácido dialúrico. Éste se vuelve a oxidar a aloxano produciendo radicales y ROS que mediante la SOD sufrirá una dismutación formando peróxido de hidrógeno. A su vez, el peróxido de hidrógeno se transforma en el radical hidroxilo, pudiendo provocar reacciones secundarias además de dañar a las células β -pancreáticas y conducir a su apoptosis. Modificada de (Vieira et al., 2019).

3. GLAUCOMA

El glaucoma está considerado como la segunda causa principal de ceguera en el mundo por detrás de las cataratas, y la primera si tenemos en cuenta tan solo las cegueras irreversibles (Alkozi et al., 2020; Quigley, 2011). Afecta alrededor de 60 millones de personas en todo el mundo, provocándoles una neuropatía óptica (Dietze et al., 2020). Ello acaba proporcionando un aspecto en el nervio óptico muy característico de la enfermedad y conduce a una pérdida de visión periférica y progresiva, dejando al paciente con una visión en túnel muy distintiva de esta enfermedad (Dietze et al., 2020).

Entre los principales factores de riesgo para desarrollar el glaucoma están la edad, factores genéticos, la miopía y la presión intraocular (Quigley, 2011). El único factor de riesgo tratable es el aumento de presión intraocular detectado en muchos pacientes y el tratamiento de la enfermedad está enfocado en su disminución. La reducción de la presión intraocular se consigue mediante tratamiento farmacológico, o mediante tratamiento quirúrgico (trabeculotomía). Dentro de los fármacos para su tratamiento están las prostaglandinas, los bloqueantes de receptores β -adrenérgicos, los inhibidores de anhidrasas carbónicas y los agonistas de receptores α -adrenérgicos. Sin embargo, algunos de ellos pueden presentar efectos secundarios indeseables y su eficacia se puede reducir tras un uso prolongado (Guzman-Aranguez et al., 2013; Weinreb & Khaw, 2004).

El glaucoma puede clasificarse según la amplitud del ángulo iridocorneal, como glaucoma de ángulo abierto o de ángulo cerrado. Además, puede subdividirse según su etiología en primario o secundario (Tabla 1).

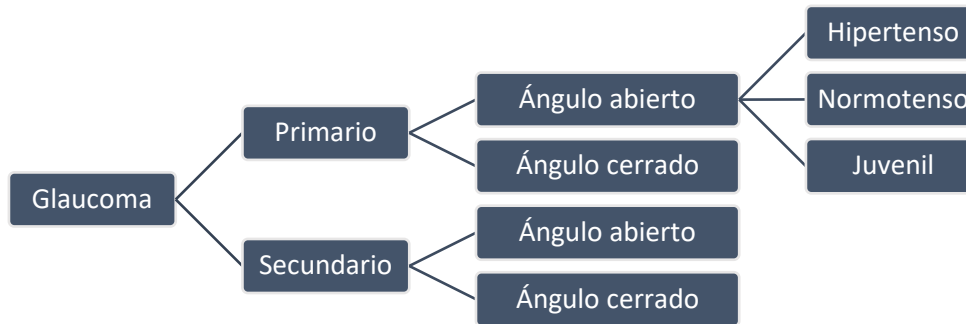


Tabla 1. Esquema de los tipos de glaucoma.

3.1. GLAUCOMA DE ÁNGULO ABIERTO

El glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) es la forma más común de glaucoma. En general se caracterizan por generar una resistencia al drenaje del humor acuoso en pared interna del canal de Schlemm a pesar de presentar una cámara anterior amplia. Al salir con más dificultad y aumentar por tanto la resistencia del flujo de salida crea poco a poco una IOP alta. Esta alta IOP puede causar el bloqueo del transporte axonal a nivel de la lámina cribosa, provocando la muerte de las células ganglionares por insuficiencia de factores tróficos (Johnson et al., 2009). Además, el aumento de la presión intraocular puede generar una disminución del flujo sanguíneo y acabar provocando daños por isquemia. La enfermedad se manifiesta lentamente y sin dolor. Cuando la enfermedad está más avanzada se va perdiendo la visión periférica en ambos ojos, lo que conlleva la pérdida de visión central si no se trata. Debido a la lenta progresión los pacientes no se dan cuenta de la enfermedad hasta que tienen una gran pérdida de la visión y les obstaculiza la zona central (Dietze et al., 2020; Jonas et al., 2017).

A su vez este tipo de glaucoma se puede subdividir en otro dos tipos menos comunes: el glaucoma juvenil de ángulo abierto y el glaucoma normotenso. El primero afecta a pacientes entre 5 y 35 años. El glaucoma juvenil es poco común y suele diagnosticarse tarde debido a la elevación lenta y precoz de la presión intraocular que llega a superar los 30 mm Hg (Turalba & Chen, 2008). Por otro lado, el glaucoma normotenso cursa con una IOP baja o normal pero la sintomatología es similar, ya que los pacientes tienen pérdida del campo visual

periférico. Esto podría deberse a que estos pacientes presentan un nervio óptico muy sensible a los cambios de presión o por falta de riego sanguíneo debido a insuficiencia vascular (Drance et al., 2001).

Con respecto al glaucoma secundario de ángulo abierto, se caracteriza por el bloqueo de la malla trabecular originado por causas diversas tales como traumatismo, el consumo de ciertos fármacos como los esteroides o tras una cirugía láser (Dietze et al., 2020).

3.2. GLAUCOMA DE ÁNGULO CERRADO

El glaucoma de ángulo cerrado puede cursar de forma aguda al cerrarse el ángulo abruptamente y provocar el bloqueo de la salida del humor acuoso. La mayoría de los casos se suelen dar como consecuencia del envejecimiento que tiende a engrosar el cristalino, éste bloquea el flujo normal del humor acuoso tapando la pupila y la presión del humor acuoso de la cámara posterior empuja el iris hacia adelante impidiendo el correcto drenaje en las estructuras del ángulo iridocorneal. El 90% de los casos de este tipo de glaucoma suelen ocurrir debido a este bloqueo pupilar. El otro 10% en general sucede como efecto secundario a fármacos que dilatan la pupila y el iris se engrosa demasiado y bloquea el drenaje del humor acuoso a través de la red trabecular aumentando drásticamente la IOP.

Existen diferentes causas que se pueden acabar provocando un glaucoma secundario de ángulo cerrado como son: la subluxación del cristalino (Izquierdo et al., 1992), el iris de meseta (Kiuchi et al., 2009), el síndrome endotelial iridocorneal (Laganowski et al., 1992), la neovascularización del iris (Sivak-Callcott et al., 2001) o el edema del cuerpo ciliar tras una cirugía ocular (Perez et al., 1976), entre otras, pero lo que tienen en común es que por una razón u otra el iris se desplaza anteriormente y bloquea las estructuras de drenaje del líquido (Dietze et al., 2020).

4. MELATONINA

4.1. GENERALIDADES

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona descubierta por el dermatólogo Aaron Lerner (Lerner et al., 1960). Esta indolamina deriva del neurotransmisor llamado serotonina.

La melatonina es secretada principalmente, aunque no exclusivamente, por la glándula pineal. La síntesis y liberación de melatonina de la glándula pineal sigue un ritmo circadiano, siendo la secreción de melatonina elevada por la noche y reducida durante el día (Shillcutt et al., 2014). El ciclo de luz/oscuridad es el principal sincronizador del sistema que regula la secreción de melatonina (Figura 7). La ruta retino-hipotalámica es la ruta neural que media la regulación de la síntesis de melatonina. Junto con los fotoreceptores, en la retina hay también otras células que funcionan como sensores de luz, las llamadas células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, que contienen el fotorpigmento melanopsina (Schmidt et al., 2011). Cuando la luz con una longitud de onda alrededor de 460-480 nm llega al ojo, activa la melanopsina contenida en las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, desencadenando un potencial de acción (Berson et al., 2002). La señal eléctrica neuronal viaja a través las proyecciones retinohipotalámicas hasta el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y al ganglio cervical superior y la glándula pineal, donde la señal lumínica suprime la síntesis de melatonina (Vartanian et al., 2015). Este sistema envía también información lumínica al centro de control pupilar llamado núcleo olivar pretectal del mesencéfalo (Markwell et al., 2010).

La melatonina tiene un papel fundamental en la regulación de los ritmos circadianos y estacionales (Hardeland et al., 2012; Kaminski-Hartenthaler et al., 2015).

La melatonina se comercializa como suplemento dietético y está recomendada principalmente como tratamiento para ciertas alteraciones del sueño como el insomnio o el jet lag. En este sentido, la melatonina produce efectos conocidos para favorecer el sueño tales como la bajada de la temperatura y la tensión

corporal (Simko & Pechanova, 2009). Aparte de su uso en el tratamiento de los trastornos del sueño, existen diferentes investigaciones clínicas que han sugerido su aplicación en diferentes patologías tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, alteraciones reproductivas o trastornos neurodegenerativos (Savage et al., 2020).

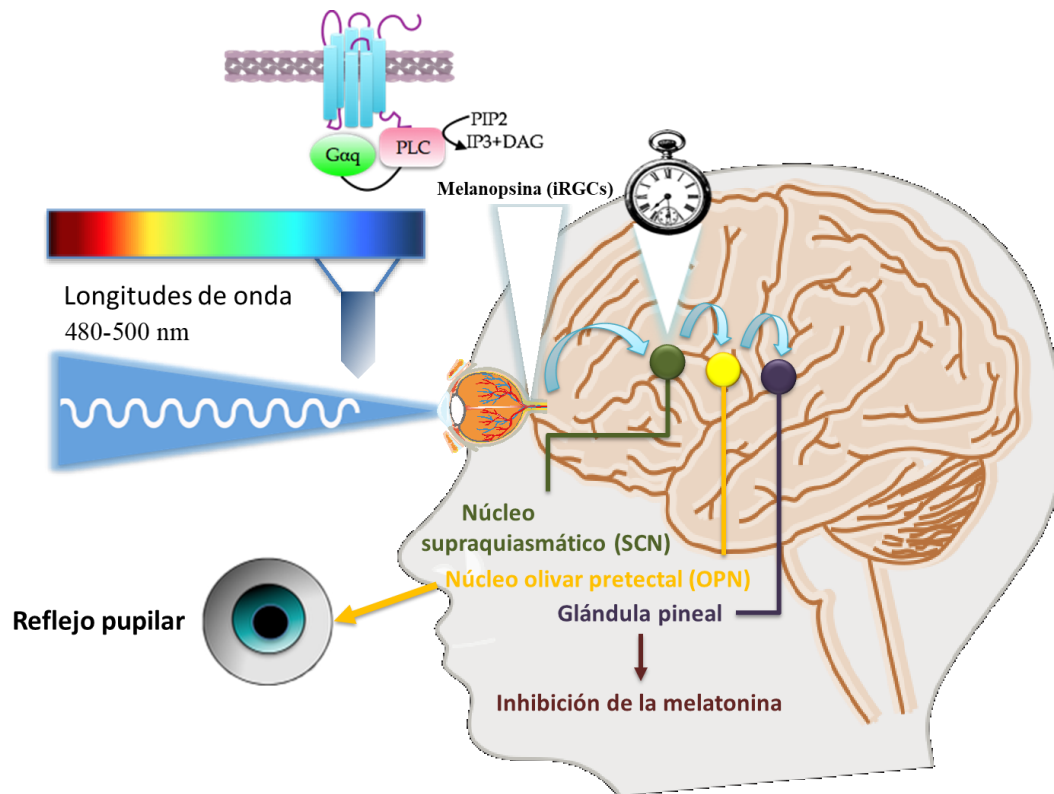


Figura 7. Esquema de la regulación de la síntesis de melatonina a través de la vía de la melanopsina presente en las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (Alkozi, 2019).

4.2. METABOLISMO DE MELATONINA: SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN

La síntesis de melatonina, mostrada en la Figura 8, empieza por el triptófano, aminoácido que se hidroxila en primer lugar para formar 5-hidroxitriptófano. Para la síntesis del neurotransmisor serotonina, este aminoácido es descarboxilado (Axelrod, 1974). Un porcentaje de dicha serotonina se acetila y convierte en N-acetilserotonina (NAS) mediante la acción de la enzima Aralquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), también conocida como serotonina N-acetiltransferasa. La reacción catalizada por esta enzima supone una etapa limitante en la síntesis de

melatonina. La actividad AANAT es entre 20 y 100 veces mayor por la noche que de día, lo que explica los altos niveles nocturnos de melatonina (Reiter, 1993).

Finalmente la enzima Hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) cataliza la O-metilación de NAS para formar melatonina (Abe et al., 1999; Alkozi, Wang, et al., 2017; Wurtman et al., 1963).

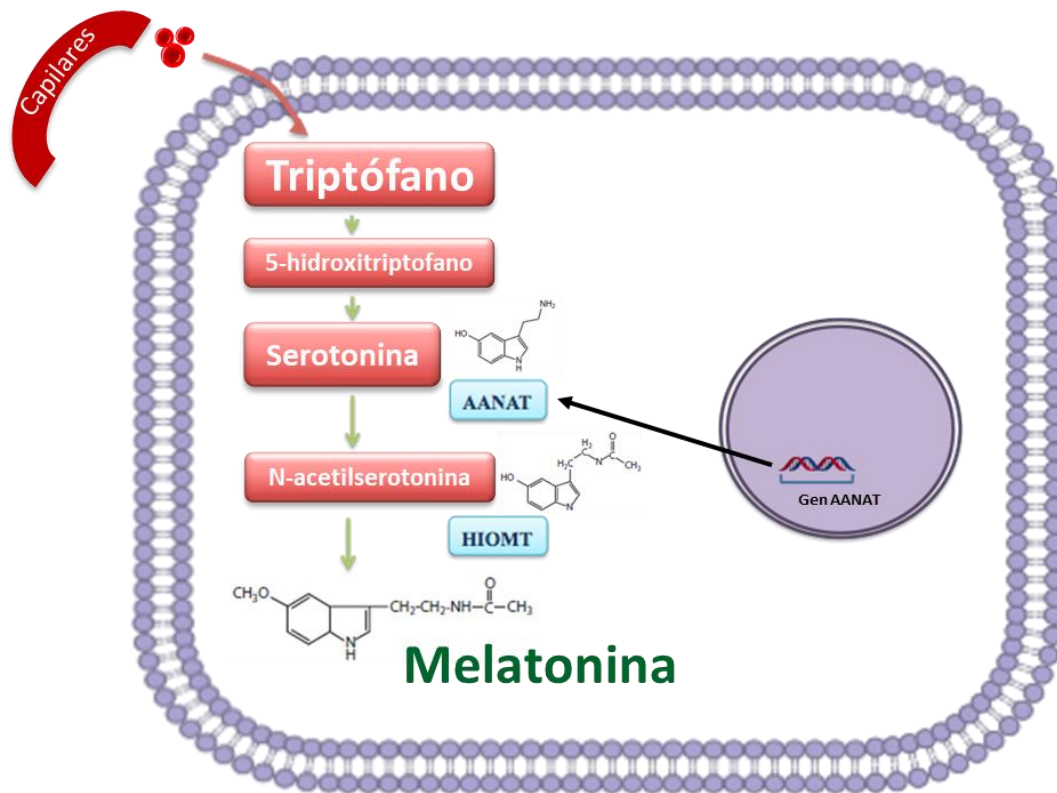


Figura 8. Esquema de la síntesis de melatonina (Shillcutt et al., 2014).

La degradación de la melatonina es un proceso complejo y menos entendido que su síntesis. La melatonina puede ser degradada vía enzimática, por un proceso pseudoenzimático o tras su interacción con especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y NOS) (Tan et al., 2015). El producto degradativo principal es la 6-hidroxi-melatonina (Facciolá et al., 2001) (Figura 9), si bien puede generar otros metabolitos. La enzima hepática citocromo P450 es la principal responsable del metabolismo de la melatonina en animales y la consiguiente producción de 6-hidroxi-melatonina. Ésta última se conjuga con sulfato o glucorónido y es secretada en la orina (Arendt et al., 1985; Facciolá et al., 2001; Ma et al., 2005). La enzima

critocromo P450 ha sido identificada en estructuras oculares como el cristalino (Choudhary et al., 2007; Patel et al., 2010).

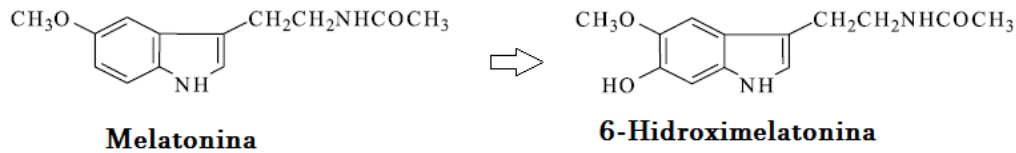


Figura 9. Producto degradativo de la melatonina. Modificada de (Maharaj et al., 2002).

4.2.1. Biosíntesis en los Tejidos Oculares

Tras el descubrimiento inicial de la melatonina se consideró que esta indolamina se sintetizaba exclusivamente en la glándula pineal. Sin embargo, en 1974, la determinación de la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de la melatonina en la retina (Bubenik et al., 1974) llevó a ampliar este concepto, identificándose la síntesis de melatonina en más tejidos extrapineales (Reiter et al., 1983; Stefulj et al., 2001).

A nivel ocular, además de la expresión de las enzimas AANAT y HIOMT en la retina, también se ha demostrado su expresión en el cuerpo ciliar (Martin et al., 1992) siendo el epitelio ciliar no pigmentado la principal área implicada en la secreción de melatonina (Alkozi, Perez de Lara, et al., 2017). Otras estructuras oculares donde también se ha encontrado la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de melatonina son la glándula lagrimal (Mhatre et al., 1988) y el cristalino (Abe et al., 1999; Abe et al., 2000).

En el cristalino de ratas, la actividad de la enzima AANAT mostró un comportamiento circadiano, aumentado sus niveles durante la noche (Abe et al., 2000). Estudios recientes sobre la influencia de la luz en la expresión de esta enzima biosintética han demostrado que los niveles proteicos de AANAT en células epiteliales del cristalino disminuyen en condiciones de exposición a la luz, observándose un descenso concomitante en la secreción de melatonina (Alkozi, Wang, et al., 2017). Además, la incubación de las células con un antagonista de melanopsina bloqueó la reducción de los niveles de AANAT y melatonina en

condiciones de exposición lumínica (Alkozi, Wang, et al., 2017), indicando que la estimulación por luz de este fotopigmento regula la producción de melatonina en el epitelio del cristalino.

En resumen, dado que la síntesis de melatonina en el ojo se produce en diversas estructuras es posible detectar la presencia de esta neurohormona en distintas localizaciones oculares tales como la superficie ocular, el cuerpo ciliar, el humor acuoso, el cristalino y como hemos mencionado previamente, en la retina (Abe et al., 2000; Aimoto et al., 1985; Alkozi, Wang, et al., 2017; Mhatre et al., 1988; Olcese & Møller, 1989; Quay, 1984).

Por otro lado, a pesar de su presencia en distintas partes del ojo y su implicación en diversas funciones oculares, aspecto que se aborda en un apartado posterior, existe un número muy limitado de estudios analizando los cambios en la biosíntesis y secreción ocular de esta neurohormona en procesos patológicos del ojo. En este sentido, se ha detectado un incremento en sus niveles en el humor acuoso de pacientes con retinopatía diabética (Aydin & Sahin, 2016) y con glaucoma (Alkozi, Sánchez-Naves, et al., 2017), pero por ejemplo se desconoce si varía su concentración en enfermedades como las cataratas o la degeneración macular asociada a la edad.

4.3. RECEPTORES DE MELATONINA

Han sido descubiertos tres tipos de receptores de melatonina llamados MT₁ (también denominado Mel1a), MT₂ (Mel1b) y MT₃ (no clonado, pero identificado farmacológicamente). MT₁ y MT₂ pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana y muestran una alta homología en su secuencia aminoacídica. Estos dos receptores se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa aunque el receptor MT₂ puede activar también la fosfolipasa C al igual que el receptor MT₃ (Luchetti et al., 2010).

Aparte de estos tres receptores, se ha descrito en mamíferos otro receptor con una elevada homología de secuencia con los receptores MT₁ y MT₂, el GPR50. Sorprendentemente, este receptor no une melatonina y se considera un receptor

huérfano de ligando desconocido (Li et al., 2013). Por último, se ha descrito otro receptor diferente, el RZR/ROR α perteneciente a la familia de receptores nucleares RZR/ROR (Pozo et al., 2004).

Además de la presencia de melatonina en el ojo, también se ha demostrado la presencia de los receptores de melatonina en diferentes estructuras del globo ocular. Podemos encontrar los diferentes tipos de receptores de melatonina distribuidos en córnea, cuerpo ciliar, cristalino, coroides, esclera y retina (Figura 10), lo que indica que mediarán distintas funciones dependiendo de la estructura dónde se localicen (Alarma-Estrany & Pintor, 2007; Shillcutt et al., 2014).

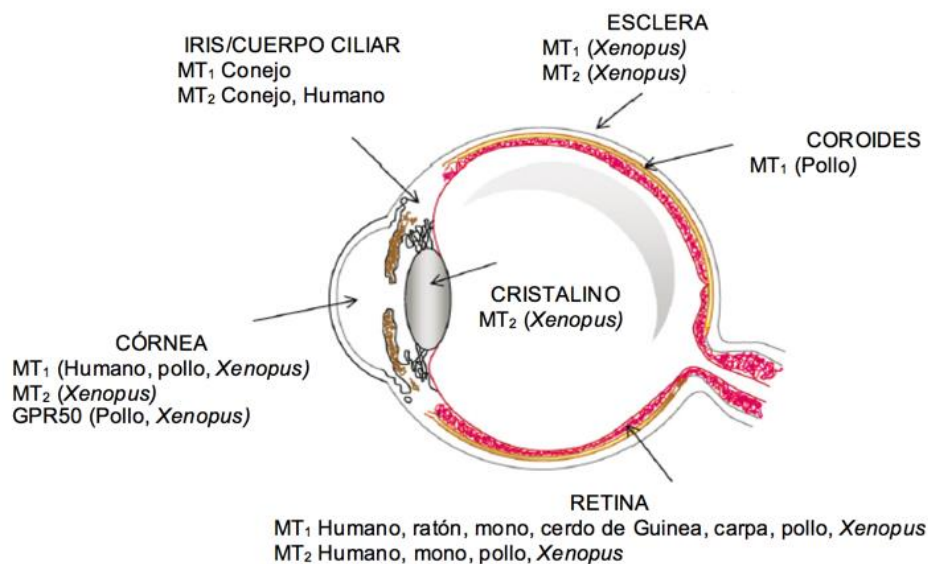


Figura 10. Localización de los diferentes receptores de melatonina en el ojo.

Descripción de los tipos de receptores de melatonina MT_1 , MT_2 y $GPR50$ que se han encontrado en las células de las diferentes estructuras que conforman el globo ocular (Alarma-Estrany & Pintor, 2007).

En la córnea se encuentran tanto receptores MT_1 como MT_2 (Wiechmann & Rada, 2003). En el iris y cuerpo ciliar se han identificado también estos dos receptores (Osborne & Chidlow, 1994) Además, en las células del epitelio no pigmentado, se localizó en *Xenopus Laevis* el receptor MT_3 (Wiechmann & Wirsig-Wiechmann, 2001).

En la retina está ampliamente estudiada la localización de los receptores MT_1 y MT_2 , variando su abundancia en función las distintas capas celulares (Shillcutt et al., 2014; Wiechmann & Sherry, 2013). Estos dos receptores también han sido

observados tanto en la esclera como en vasos oculares (Wiechmann & Rada, 2003). Los datos sobre la coroides son escasos pero parece haber inmunomarcaje del receptor MT₁ (Alarma-Estrany & Pintor, 2007).

En cuanto al cristalino, en un estudio con *Xenopus laevis* (Wiechmann et al., 2004) se observaron bandas de inmunoreactividad frente al anticuerpo Mel1b, el equivalente al receptor de melatonina MT₂ en mamíferos. Exactamente se localizaron en las membranas celulares de las fibras del cristalino (Alarma-Estrany & Pintor, 2007; Shillcutt et al., 2014; Wiechmann et al., 2004).

4.4. FUNCIONES DE LA MELATONINA EN EL OJO

La presencia de melatonina y de sus receptores a nivel ocular sugiere un importante papel de esta neurohormona en la fisiología ocular. De hecho, son diversas las funciones atribuidas a la melatonina en distintas localizaciones oculares.

En la córnea la aplicación de melatonina exógena y agonistas de ella acelera el proceso de cicatrización en estudios *in vitro* en células de epitelio corneal mediante la estimulación del proceso de migración celular (Crooke et al., 2015).

A nivel de la esclera, se ha sugerido que la melatonina puede modular el crecimiento y remodelación de las capas de la esclera, por lo que podría desempeñar un destacado papel en la regulación del crecimiento ocular y la refracción (Rada & Wiechmann, 2006).

En la retina, la melatonina desarrolla distintas funciones: participa en la regulación de movimientos retinomotores en vertebrados inferiores (Pierce & Besharse, 1985) y en el ajuste de la sensibilidad a la luz de las células horizontales (Wiechmann et al., 1988). Además, contribuye a la regulación de la liberación de dopamina, de manera que concentraciones picomolares de melatonina bloquean selectivamente la liberación de dopamina dependiente de calcio en la retina de conejo (Dubocovich, 1983). También está implicada en la regeneración de los discos externos de los fotorreceptores (Besharse & Dunis, 1983). Por último,

protege a las células del epitelio pigmentado de la retina del estrés oxidativo (Liang et al., 2004).

La actividad antioxidante de la melatonina, como la que ejerce a nivel del epitelio pigmentado de la retina, es una de las propiedades más destacadas de esta hormona. La melatonina media acciones oxidantes directas funcionando con un eliminador (“*scavenger*”) de radicales libres (Tan et al., 2015) y también de manera indirecta mediante la modulación de la expresión de factores de transcripción de respuesta al estrés oxidativo como Nrf2 (Ahmadi & Ashrafizadeh, 2020) y enzimas antioxidantes (Rodríguez et al., 2004). El papel como antioxidante de la melatonina ha sido también detectado en el cristalino, donde el tratamiento con melatonina redujo la concentración intracelular de ROS en células epiteliales de cristalino sometidas a estrés oxidativo (Bai et al., 2013). Dada la relación de las cataratas con el estrés oxidativo, el potencial anticataratogénico de la melatonina ha sido evidenciado en distintos modelos animales (Anwar & Moustafa, 2001; Khorsand et al., 2016; Yağci et al., 2006), si bien, los mecanismos moleculares que subyacen en esta acción anticataratogénica no han sido completamente esclarecidos.

Por otra parte, la melatonina se ha relacionado con la modulación de la IOP. La secreción del humor acuoso y la IOP están influenciadas por el ritmo circadiano y, como ya se ha comentado, la melatonina tiene un papel fundamental en la regulación del ritmo circadiano. Concretamente, los niveles de melatonina y los valores de IOP varían de forma inversa a lo largo del día, de manera que los valores más bajos de IOP se observan por la noche, cuando se alcanzan los niveles más elevados de melatonina (Figura 11). El efecto hipotensor de la melatonina ha sido demostrado en diferentes modelos animales, normotensos e hipertensos (Martínez-Águila et al., 2013; Martínez-Águila et al., 2016), y también en pacientes glaucomatosos (Pescosolido et al., 2015). Su acción hipotensora es mediada por la estimulación de receptores de melatonina localizados en el cuerpo ciliar produciéndose un incremento de AMP cíclico y una reducción del flujo de cloro. La reducción del flujo de este ion lleva finalmente a la disminución de la producción de humor acuoso y la consiguiente reducción de la IOP (Huete-Toral et al., 2015).

La reducción de la presión intraocular mediada por melatonina indica el interés de esta molécula como alternativa terapéutica en el tratamiento del glaucoma.

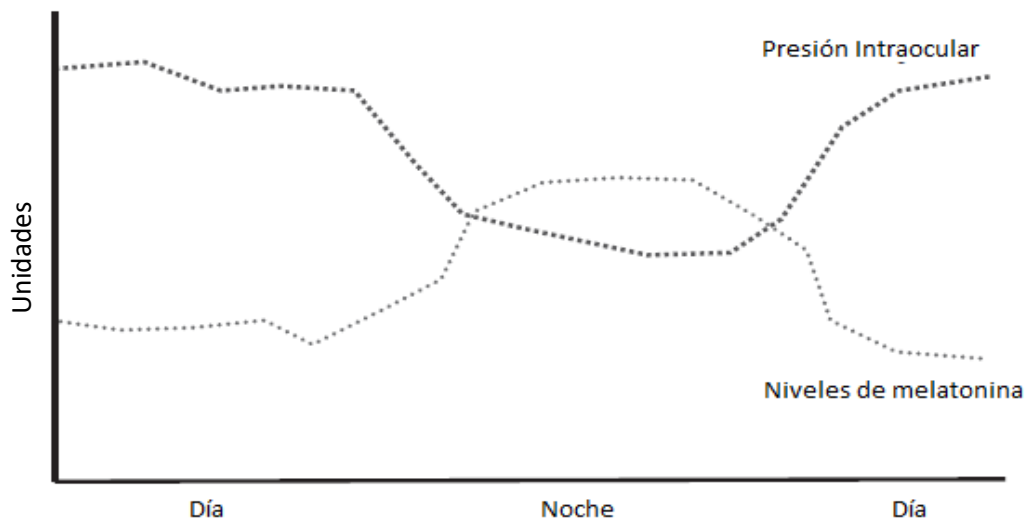


Figura 11. Relación entre la PIO y la melatonina a lo largo del día.

En la gráfica se observan los niveles relativos de presión intraocular y la melatonina a lo largo del día, la IOP se mantiene más alta durante el día respecto a la noche y en el caso de los niveles de melatonina ocurre exactamente lo contrario, los valores más altos de melatonina los obtenemos durante la noche. Esta observación sugiere una clara relación entre ambos. Modificada de (Shillcutt et al., 2014).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. HIPÓTESIS

La melatonina desarrolla importantes funciones a nivel ocular, en el cristalino destaca su papel como antioxidante lo que la convierte en una molécula con un relevante papel preventivo en el desarrollo de cataratas. Sin embargo, se desconoce su capacidad antioxidante frente a nuevos agentes potencialmente generadores de estrés oxidativo como la luz blanca tipo LED. Asimismo, los mecanismos moleculares a través de los cuáles puede mediar su efecto la melatonina en el cristalino no han sido completamente esclarecidos. Además, estaría dentro de lo probable que sus niveles se encontrarán alterados en patologías relacionadas con el estrés oxidativo, tales como las cataratas, lo que podría repercutir en la progresión de la enfermedad.

Por otra parte, en estudios recientes se ha demostrado la presencia de melanopsina en el cristalino y como ésta al activarse por exposición a luz azul decrece la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de melatonina así como la producción de esta neurohormona. Estos hallazgos sugieren que la modificación de las condiciones lumínicas, por ejemplo mediante el uso de filtros, podría permitir regular la liberación endógena de melatonina. Esta melatonina endógena podría entonces contribuir al desarrollo de importantes funciones en el ojo tales como proteger frente situaciones de estrés oxidativo asociadas a patologías oculares crónicas como las cataratas o regular la IOP ejerciendo una acción hipotensora.




2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar el efecto protector de la melatonina aplicada de forma exógena frente al estrés oxidativo inducido por distintos agentes productores de ROS, al ser éste un mecanismo patológico clave en la opacificación del cristalino y la consiguiente aparición de cataratas, analizando los mecanismos moleculares a través de los cuáles media su acción antioxidante la melatonina.
- Analizar los cambios en los niveles de melatonina y su producto de degradación 6-hidroximelatonina en el humor acuoso en condiciones patológicas del cristalino (cataratas).
- Determinar los posibles cambios en la expresión de enzimas biosintéticas y en la liberación de melatonina en el cristalino bajo distintas condiciones de luz/oscuridad y al interponer un filtro amarillo.
- Evaluar si la liberación de melatonina endógena mediante el uso de filtro amarillo puede desarrollar efectos antioxidantes y protectores a nivel del cristalino, así como regular la IOP.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar los cambios en viabilidad celular, especies reactivas de oxígeno, factores y enzimas anti-oxidantes (NRF2, SOD), mediadores inflamatorios (inflammasoma NLRP3) y marcadores de la transición epitelio-mesénquima inducidos por el estrés oxidativo y como la melatonina aplicada de manera exógena modula dichos cambios identificando las rutas intracelulares responsables del posible efecto protector de la melatonina frente al estrés oxidativo.
- Determinar los niveles de melatonina y de su producto de degradación 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de sujetos control y con catarata diabética y no diabética.

- 
- Evaluar la expresión proteica de las enzimas responsables de la biosíntesis de esta neurohormona (HIOMT, AANAT y pAANAT) así como la concentración de melatonina secretada en distintas condiciones de luz/oscuridad y al emplear un filtro amarillo tanto en estudios *in vitro*, usando células epiteliales humanas de cristalino como en ensayos *in vivo* empleando un modelo animal de conejo diabético.
 - Estudiar el posible efecto protector y antioxidante del uso de un filtro amarillo como consecuencia de la modulación endógena de melatonina.
 - Analizar la capacidad de la melatonina endógena liberada mediante la aplicación de filtro amarillo de regular la presión intraocular en un modelo animal.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. MATERIAL

1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS

En la siguiente tabla aparecen los diferentes reactivos y productos químicos utilizados.

USO	REACTIVO	CASA COMERCIAL
Cultivos celulares	2-Propanol	Merck
	A92593	Sigma-Aldrich
	Azul tripán	Invitrogen
	DMEM/f-12, HEPES	Thermo Fisher Scientific
	FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific
	Medio Eagle's Minimum Essential (EMEM)	ATCC
	Melatonina	Sigma-Aldrich
	MTT (M5655-1G)	Sigma-Aldrich
	Penicilina/Estreptomina	Thermo Fisher Scientific
	Peróxido de Hidrógeno	Sigma-Aldrich
	Piruvato sódico	Thermo Fisher Scientific
	Triprina-EDTA (0.25%)	Thermo Fisher Scientific
Electroforesis y Western Blot	β -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
	Acrilamida-Bisacrilamida	Bio-Rad
	Azul de Bromofenol	Sigma-Aldrich
	ECL (Enhanced ChemiLuminescence)	GE Healthcare Amersham™
	Glicerina	Bio-Rad
	Leche deslipidizada	Bio-Rad
	Membrana de nitrocelulosa	GE Healthcare Amersham™
	Películas fotográficas	GE Healthcare Amersham™
	Persulfato Amónico	Sigma-Aldrich
	Precision Plus Protein™	Bio-Rad
Kaleidoscope™		

	SuperSignal™ West Pico PLUS (Chemiluminescent Substrate) TEMED Trizma base Tween-20	Thermo Fisher Scientific Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Conservación de muestras	RNA-later	Thermo Fisher Scientific
Agentes anestésicos y para desarrollo de modelo diabético	Aloxano Anestésico doble (Tetracaína hidrocloreuro/ Oxibuprocaína hidrocloreuro) Clorhidrato de Medetomidina (DOMTOR®) Ketamina (Ketamidor®) Sedante (Calmo Neosan®)	Cayman Chemical Colircusí® Esteve Richter Pharma ag Boehringer Ingelheim
HPLC	Metanol	Merck
Antagonistas de receptores de melatonina y de melanopsina	4-P-PDOT A92593 Luzindole	Tocris Sigma-Aldrich Tocris

Tabla 2. Reactivos y productos químicos.

A continuación, se muestran las diferentes soluciones y tampones usados (Tabla 2), así como los distintos kits de ensayos de tipo fluorimétrico y colorimétrico (Tabla 3).

SOLUCIÓN TAMPÓN	COMPOSICIÓN
PBS 1x pH 7.3	10% (v/v) PBS 10x; 90% (v/v) H ₂ O
PBS 10x pH 7.3	NaCl (1.37 mM); KCl (26.8 mM); Na ₂ HPO ₄ (81 mM)
Solución de bloqueo WB	Leche/FBS al 5% en TBS 1x Tween-20 0.1%
Solución anticuerpo 1º WB	Leche/FBS al 5% en TBS 1x Tween-20 0.1%
Solución anticuerpo 2º WB	Leche/FBS al 0.25% en TBS 1x; Tween-20 0.1%
Solución reprobing	Tris (62.5 mM) pH 6.8; SDS (2%); β-mercaptoetanol (100 mM)
Tampón de electroforesis 1x	Tris (0.025 M); glicina (0.192 M); SDS (0.1%)
Tampón de electroforesis 5x	Tris (0.125 M); glicina (0.192 M); SDS (0.5%)
Tampón de transferencia semi-dry	Tris (25 mM); glicina (192 mM); metanol (20%)
Tampón Laemmli 3x	Tris (195 mM) pH 6.8; SDS (9%); glicerol (30%); azul de bromofenol (0.02%); β-mercaptoetanol (15%)
TBS 1x Tween-20 0.1%	100 mL TBS 10x; 900 mL de H ₂ O; 1 mL de Tween-20
TBS 1x pH 7.6	10% (v/v) TBS 10x; 90% (v/v) H ₂ O
TBS 10x pH 7.6	Trizma HCl (0.2 M); NaCl (1.369 M); HCl 37%

Tabla 3. Soluciones tampón.

KIT	CÓDIGO	CASA COMERCIAL
6-Hydroxymelatonin ELISA Kit	CSB-EQ027870HU	Cusabio
Fluorometric Intracellular ROS KIT	MAK143-1KT	Sigma-Aldrich
IL-1β Quantikine R&D kit	DLB50	R&D systems
Melatonin ELISA Kit	AB213978	ABCAM
Superoxide Dismutase Assay Kit	706002	Cayman Chemical

Tabla 4. Kits de ensayo.

1.2. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

USO	REACTIVO	CASA COMERCIAL
Estudios en animales	Agujas 23G 1" - Nr.16 0.6 x 5mm	Microlance™ 3
	Biomicroscopio espejular SP 2000 P	Topcon
	Cámara MD-130	Electronic Eyepiece
	Jeringuillas (5 mL)	Plastipak™
	Lámpara de hendidura Topcon SL-8Z	Topcon
	Tiras de Schirmer	Lenticon SA
	Tonómetro de contacto	TonoVet, Tiolat Oy
Cultivos celulares	Botellas de cultivo (25 y 75 cm ²)	Cultek
	Cámara de Neubauer	Brand GMBH
	Campana de flujo laminar	Heraeus
	Criotubos	Nunc
	Incubador Hera Cell	Heraeus
	Led stripe 150x RGM LED total 24 W	Light & more GmbH
	Luxómetro digital MT-192	Shenzhen Flus Technology
	Microscopio biológico vertical SE	Nikon
	Mr. Frosty™	Nalgene
	Pellet Pestle Motor	Kimble Chase
	Placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos	Cultek
General	Agitador de balanceo	Biogen
	Agitador orbital Bunsen	Nessler
	Autoclave	Trade Raypa
	Balanza de precisión	Arpival SA
	Baño termobloque	Labnet
	Centrífuga de sobremesa Biofuge® pico	Heraeus

	Centrífuga Labofuge 400	Heraeus
	Centrífuga refrigerada KUBOTA 6500	Kubota Corporation
	Espátula de microprecisión	Selecta
	Espectrofotómetro Spectronic 200	Thermo Fisher Scientific
	Filtros 20 µm (Minisart®)	Sartorius Stedim Biotech
	Filtro amarillo (465-480 nm)	Clairefontaine
	Lector de placas Power Wave XS2	BioTek
	Pipetas estériles (5, 10 y 25 mL)	Nessler
	Pipetas automáticas	Eppendorf
	2-20 µL/ 20-200 µL/ 100-1000 µL	
	Puntas	Nessler
	Tubos Eppendorf (1,5/2 mL)	Eppendorf
	Tubos Falcon (15/25 mL)	Thermo Fisher Scientific
	Sonicador ultrasónico	Selecta
	Vórtex	Heidolph
HPLC	Bomba de flujo isocrático Waters 1515	Waters
	Columna Kromaphase C18 (5µm)	Scharlau
	Detector dual de absorbancia 2487	Waters
	Jeringas Hamilton	SGE Analytical Science
	Precolumna Kromaphase (5µm)	Scharlau
Western Blot	Mini Protean® 3 Cell	Bio-Rad
	Mini-Trans Blot Electrofonetic Transfer Cell	Bio-Rad
	Trans-Blot® SD Semy-Dry Transfer Cell	Bio-Rad

Tabla 5. Equipos e instrumentos.

USO	PROGRAMAS INFORMÁTICOS
Análisis de datos/gráficas	GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.)
Búsqueda bibliográfica	Pubmed (National Institutes of Health)
Densitometría	Image J (National Institutes of Health)
Espectrometría	Gen 5.0 Data Analysis Software (BioTek)
Fluorimetría	Fluoroskan Ascent FL (Thermo)
HPLC	Breeze software de Waters
Lámpara de hendidura	Imaginet 2000 (Topcon)

Tabla 6. *Software y herramientas informáticas.*

2. MÉTODOS

2.1. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN Y MUESTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS

2.1.1. Modelo *in vitro*: Células de epitelio de cristalino humano

Se utilizó la línea celular HLE-B3 de ATCC® (ATCC-CRL-11421 Lens Epithelium Human LOT: 62025431) para la realización de diferentes experimentos.

2.1.1.1. Descongelación, mantenimiento y almacenamiento

Para descongelar las células se siguió siempre el mismo protocolo. Primero se atemperó el medio celular y se sacaron los crioviales de células del congelador de -80°C donde se mantenían almacenados. Rápidamente se añadían 2 mL de medio en 1 falcon de 15 mL, se descongelaba el contenido del criovial con la ayuda de ese medio a temperatura ambiente y se introducía todo el contenido en el falcon. A continuación, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar del DMSO (dimetil sulfóxido), presente en el vial de congelación. Después se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio. Finalmente, se sembraron las células en una botella o flask, de tamaño variable dependiendo de los experimentos a realizar.

Para el mantenimiento de las células normalmente se cultivaron en botellas de 75 cm² con Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) (ATCC® 30-2003™) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 20% y penicilina-estreptomicina al 0.5%. Las células se incubaron y mantuvieron en una estufa humidificada con 5% de CO₂ a 37°C y 95% de humedad hasta alcanzar la confluencia. Una vez alcanzada la confluencia en a botella (pasados unos 7 días), se descartó el medio y se lavó con 5 mL de tripsina, previamente descongelada. Se volvió a descartar y se incubó la botella con 10 mL de tripsina durante unos 3 minutos en la estufa para levantar las células. Pasado ese tiempo se añadieron 10 mL de FBS para neutralizar el efecto de la trispsina. Se llevó todo el contenido a 2 tubos falcons de 15 mL, recogiendo bien todas las células que deberían haberse despegado. Por último, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se

resuspendió el pellet en 3/5 mL de medio dependiendo de la cantidad de material celular que se observó. Se contaron las células mediante una cámara de Neubauer. Finalmente, las células se sembraron en placas de distinto tamaño en función del experimento a realizar. Dependiendo de la placa y del número de células, volvieron a tener confluencia pasados 2 o 3 días. Para los experimentos en que se añadió melatonina con 24 horas de antelación, ésta se añadió cuando las células tenían una confluencia del 80 o 90%, para que el día del experimento no se levantasen por los laterales de los pocillos debido al exceso de células.

Para la congelación de las células se rotularon los criotubos de 2 mL con el número de células a congelar, el día de la congelación y el número de pase celular (equivalente al número de veces que las células se habían tripsinizado en experimentos anteriores). Se introdujeron 900 μ L de células con su medio y 100 μ L de DMSO. Tras ello, rápidamente se metían los criotubos en el recipiente de congelación Mr. Frosty® y de ahí al congelador de -80°C para su almacenamiento.

2.1.1.2. Tratamiento con inductores de estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno y luz) y aplicación exógena de melatonina

Para estos tratamientos se sembraron las células en placas de cultivo, de diferentes tamaños dependiendo del experimento, hasta llegar a estar confluentes.

Para evaluar la posible toxicidad de la aplicación de melatonina sola, las células se incubaron con distintas concentraciones de esta neurohormona (0.1, 1, 10 y 100 μ M) durante 24 horas.

Con el fin de determinar la concentración de peróxido de hidrógeno capaz de inducir daño oxidativo en las células se testó el efecto de la incubación de distintas concentraciones del agente (50 μ M, 200 μ M, 350 μ M, 600 μ M, 1 mM y 1.5 mM) durante 2 horas. El día en que se realizaba el experimento se preparó medio de cultivo celular sin suplementación con FBS y con ese medio se realizaron las diferentes disoluciones con peróxido de oxígeno. Se descartó el medio de los pocillos y se sustituyó por éste. En aquellos pocillos considerados

como controles, también se les cambió el medio por el mismo sin FBS. Se introdujeron las placas de cultivo en la estufa durante 2 horas en oscuridad para proceder a continuación a la evaluación de la viabilidad celular.

En los experimentos realizados para examinar el posible efecto citoprotector de la melatonina frente al estrés oxidativo, la hormona se aplicó a distintas concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μM) 24 horas antes de la exposición a peróxido de hidrógeno 350 μM durante 2 horas (condición seleccionada en los estudios arriba indicados). En algunos ensayos también se evaluó la aplicación simultánea de melatonina durante la incubación con peróxido de hidrógeno.

Para los estudios de western blot destinados a analizar los cambios en la expresión de Nrf2 y NLRP-3 se seleccionó una concentración de 100 μM de melatonina 24 horas antes de la incubación de 2 horas con peróxido de hidrógeno 350 μM .

En el caso de los estudios realizados con luz, se fijó un sistema de iluminación LED (Light and More, Alemania) en el interior de la estufa de cultivo. Se evaluó la intensidad de la luz emitida por la tira de luces LED mediante un luxómetro MT-912 (Shenzhen Flus Technology, Guangdong, China) estableciendo una intensidad de 400 luxes en la zona de exposición al iluminar con la luz LED blanca (400-700 nm). Este valor se seleccionó para simular la iluminancia típica de la luz artificial previamente publicada (Behar-Cohen et al., 2011).

Las placas correspondientes se introdujeron en la estufa equipada con el sistema LED para exponerlas a la luz LED blanca durante 2 horas, como control se empleó una placa cubierta por papel de aluminio que permanece así aislada de la luz. En los experimentos con melatonina, ésta se aplicó a una concentración 100 μM 24 horas antes de la exposición a la luz.

Finalmente, en algunos experimentos se emplearon inhibidores de receptores de melatonina: luzindole (N-acetil-2-benzilriptamina) (100 μM) y 4-P-PDOT (4-fenil-2-propionamidotetralina) (100 μM), los cuales se añadieron 30 minutos antes de la exposición al agente inductor de estrés oxidativo.

2.1.1.3. Tratamiento con Luz y Filtro Amarillo

Las células se expusieron a luz LED blanca de 400 luxes en la estufa con el sistema LED en ausencia o en presencia de un filtro amarillo.

El filtro amarillo utilizado en estos experimentos fue analizado con un espectrofotómetro (Spectronic 200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mostrando absorbancia entre 400-500 nm con un pico máximo a 440 nm.

El día de los experimentos después de llegar a la confluencia en sus respectivas placas de cultivo, se procedió a cambiar el medio para empezar los experimentos con el medio completo y nuevo. Las placas correspondientes a las situaciones dónde se bloqueaba la luz emitida por la banda de luces LED se cubrieron con el filtro amarillo y se introdujeron en la estufa junto con una placa cubierta por papel de aluminio (condiciones de oscuridad) y otra sin ningún tipo de recubrimiento, por lo que las células permanecían completamente expuestas a la luz LED blanca en la estufa. Las placas permanecieron en el interior de la estufa durante dos horas en estas diferentes condiciones experimentales: células expuestas a la luz, células cubiertas con el filtro amarillo y células en condiciones de oscuridad.

Adicionalmente, en algunos experimentos examinando la producción de ROS las células se expusieron no a luz blanca LED, si no a luz azul (465-480 nm, 400 luxes) y luz roja (625-640 nm, 400 luxes).

En los experimentos empleando inhibidores de receptores de melatonina, luzindole (100 μ M) y 4-P-PDOT (100 μ M), éstos se adicionaron 30 minutos antes de la exposición a la luz LED.

Tras la exposición a las distintas condiciones lumínicas se evaluaron los cambios en la producción de ROS, la viabilidad celular o se recogieron los medios condicionados (para medir la concentración de melatonina y 6-hidroxi melatonina) y/o los extractos celulares. Tanto los medios condicionados como los extractos celulares fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis.

2.1.2. Modelo *in vivo*: modelos animal de conejo

En la experimentación con animales se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con pesos de 3.05 ± 0.57 Kg. Los animales permanecieron en jaulas individuales con acceso libre a comida y bebida. Se les proporcionaron ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los protocolos descritos fueron aceptados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid que sigue los principios de la European Communities Council Directive (86/609/EEC).

De todos los animales se obtuvieron diferentes muestras de humores acuosos y tejidos oculares, que se analizaron mediante diferentes técnicas detalladas más adelante.

2.1.2.1. Modelo de conejo diabético

Los conejos fueron divididos en 3 grupos: control (grupo I, n = 4), diabéticos (grupo II, n = 4), diabético con filtro (grupo III, n = 4). En el caso de del grupo III, los animales se ubicaron en cajas envueltas con un filtro amarillo (Figura 12).

La diabetes se indujo mediante una única inyección de aloxano en una dosis de 125mg/kg. Este compuesto se disolvió en 5 mL de cloruro sódico y se introdujo directamente al torrente sanguíneo a través de la vena de la oreja. Aquellos conejos a los que se les provocó la diabetes se les suplementó el agua con glucosa al 10% durante las primeras 24 horas tras la inyección, mientras que los demás tan solo recibieron una inyección intravenosa de 5 mL de NaCl al 90%. Los conejos del grupo III (diabéticos con filtro) se trataron con aloxano dos semanas después de permanecer en las cajas cubiertas con el filtro amarillo.

Una semana después de la inducción de la diabetes se midieron los niveles de glucosa en sangre de todos los conejos, y posteriormente se realizaron medidas semanales a aquellos conejos diabéticos mediante el uso de un glucómetro de sangre. Niveles de glucosa superiores a 16.6 mM son indicativos de la presencia de diabetes. La formación de la catarata se siguió por biomicroscopia mediante iluminación directa o por medio de retroiluminación indirecta.



Figura 12. Conejos cubiertos con la caja fabricada con el filtro amarillo.

2.1.2.2. Modelo animal para los estudios de presión intraocular

En estos experimentos los animales se dividieron en dos grupos: 3 conejos control y otros 3 ubicados en una jaula cubierta con un filtro amarillo. Se mantuvieron con vida a lo largo de 8 semanas. En el caso de los conejos con filtro amarillo, se suspendió su tratamiento a partir de las 4 semanas para observar el recobro a la normalidad. Se les realizaron semanalmente diferentes pruebas, empezando siempre a las 10 de la mañana para minimizar las posibles variaciones en los resultados. Primero se les media la presión intraocular, seguido del test de Schirmer, se les pesaba para el cálculo de la sedación, y una vez dormidos se les extraían aproximadamente 100 μ L de humor acuoso. Se dejó pasar una semana entre cada medición para que los valores no estuviesen alterados debido a este último procedimiento.

2.1.3. Muestras biológicas humanas

Para la realización de los estudios con muestras biológicas humanas se siguieron los principios de la Declaración de Helsinki y la aprobación por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Instituto Balear de Oftalmología (Palma de Mallorca, España). Después de la explicación del estudio, cada paciente firmó un consentimiento informado. Para nuestros estudios, se seleccionaron sujetos control o pacientes con cataratas, descartándose aquellos pacientes cuyo historial clínico reflejara alguna enfermedad ocular adicional como el glaucoma, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o algún tipo de enfermedad inflamatoria activa.

Se recogieron muestras de humor acuoso de pacientes (36 sujetos en total) divididos en 3 grupos. El grupo control constaba de 12 pacientes con un cristalino transparente que se iban a someter a una cirugía refractiva con inclusión de lente intraocular. Los otros 24 pacientes presentaban cataratas las cuales fueron el motivo de su intervención quirúrgica. Ese grupo se subdividió, a su vez, en 2 grupos: 1 grupo con catarata no diabética (n= 12) y 1 grupo de pacientes con catarata diabética (n= 12). Los pacientes diabéticos tenían un buen control de los niveles de glucosa en sangre y no padecían retinopatía.

El humor acuoso se aspiró durante el primer paso de la cirugía de cataratas con gotas anestésicas (lidocaína al 2%), se utilizó una cánula Rycroft de calibre 30 en una jeringa de tuberculina (1 mL) a través de una microincisión corneal estándar de 1 mm, mientras se observaba mediante el microscopio quirúrgico. Se recogieron unos 300/400 μ L de humor acuoso, se almacenó a -20°C y se mantuvo protegido de la luz.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

2.2.1. Ensayo con azul tripán

El método de tinción por exclusión mediante Trypan blue o azul de tripán se utilizó para diferentes ensayos de viabilidad celular. Se trata de un compuesto azoico, con un color azul intenso, que tiñe las células muertas. Se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular relativo entre las células vivas y muertas. Esto se consiguió gracias a que el colorante solo atraviesa la membrana de las células muertas ya que la membrana celular de las células viables no permite la difusión a su interior.

Esta técnica se utilizó para algunos estudios preliminares encaminados a valorar el tiempo de incubación óptimo al que someter a las células a estrés oxidativo mediante el tratamiento con H₂O₂ así como por exposición a luz blanca tipo LED.

Las células se incubaron en la estufa con 5 mL de tripsina durante 3 minutos que fue neutralizada con 5 mL de FBS. Las células levantadas se recogieron en un falcon de 10 mL. En un eppendorf se mezclaron 50 µL de la muestra celular junto con otros 50 µL de azul tripán y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se introdujo una pequeña cantidad de muestra de unos 30 µL en una cámara de Neubauer para poder realizar el recuento de las células muertas (teñidas) y las células totales. Se calculó el porcentaje de muerte celular empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Muerte Celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células teñidas}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

2.2.2. Ensayos con MTT

La viabilidad celular también se analizó mediante ensayos con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Figura 13). Se trata de un ensayo que cuantifica colorimétricamente las células que son capaces de reducir el reactivo amarillo (MTT) a un compuesto de color azul/púrpura (formazán). Esta reacción transcurre gracias a la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Al final, cuanto más formazán se haya generado, mayor número de células vivas habrá. El color del compuesto generado se determina midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

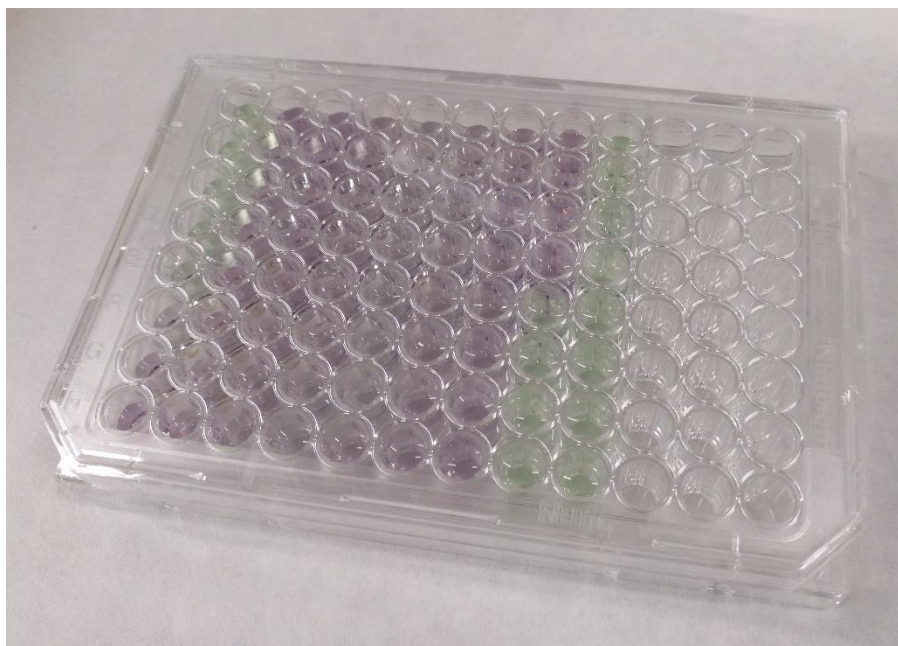


Figura 13. Placa de 96 pocillos tras realizar la lectura en el espectrofotómetro.

Los ensayos de MTT fueron empleados para realizar los estudios de dosis respuesta tanto para el tratamiento con melatonina, como con peróxido de oxígeno. Asimismo se usó este método para los estudios del efecto protector de la aplicación exógena de melatonina tras la inducción de estrés oxidativo por tratamiento con peróxido de hidrógeno o exposición a luz blanca LED. Para la realización de estos ensayos se sembraron unas 200000 células/pocillo en placas de 24 pocillos y tras alcanzar la confluencia se realizaron los distintos tratamientos. Pasado el tiempo de cada experimento se retiró el medio y se añadieron 400 μ L de MTT (0.5 mg/mL en PBS 1X) en cada pocillo y se esperaron 2 horas en la estufa a 37°C sin luz. Transcurridas las 2 horas, se retiró con cuidado

el MTT, se desechó y se añadieron 350 μL de DMSO para resuspender los cristales de formazán formados en cada pocillo. Se trasvasaron 250 μL de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, dejando el primer pocillo para el blanco que únicamente contenía DMSO. Finalmente se realizó la lectura de la placa en el lector de placas espectrofotométrico, PowerWave XS2 (BioTek, Winooski, VT, USA), a una longitud de onda de 570 nm y se corrigió el valor de absorbancia intrínseca del plástico restando la absorbancia a 690 nm. Los valores numéricos resultantes se expresaron como porcentaje de la viabilidad celular con respecto al control (células sin tratamiento).

2.3. DETECCIÓN DE ROS

Los ensayos fluorométricos para detectar especies reactivas del oxígeno (ROS) se realizaron utilizando un kit específico (Sigma-Aldrich, MO, USA). La adición de un sensor fluorogénico permeable a nivel celular, proporcionado por el kit, resulta en la formación de un producto fluorimétrico proporcional a la concentración de ROS presente en las células.

Para estos ensayos se cultivaron 15000 células HLE-B3 por pocillo en placas opacas de 96 pocillos. En los ensayos donde se emplea melatonina, ésta se añadió a una concentración 100 μM 24 horas antes del experimento, en los pocillos indicados, y se cambió el medio al resto de los pocillos. En caso de emplear antagonistas (luzindole 100 μM y 4-P-PDOT 100 μM), éstos se añadieron 30 minutos antes de la adición de melatonina.

El primer paso fue la preparación de la Master Reaction Mix. Para ello se reconstituyó el agente de detección de ROS con 40 μL de DMSO, obteniéndose 4 alícuotas de 10 μL , las cuales se pueden almacenar a -20°C , hasta un máximo de un mes, para su posterior uso. Con esas alícuotas se preparó la Master Reaction Mix dependiendo del volumen necesario para cada experimento. Para la generación de la Master Reaction Mix se estableció una proporción de 20 μL del agente de detección de ROS reconstituido por cada 10 mL de tampón de ensayo.

Tras retirar el medio de los pocillos, se añadieron 100 μL de la Master Reaction Mix en cada pocillo. Se incubó 1 h en la estufa al 5% de CO_2 y 37°C en oscuridad. Posteriormente, se introdujeron las placas en la estufa con sus respectivas condiciones de luz, oscuridad y filtro durante 2 horas. Finalmente, transcurridas las 2 horas se leyeron rápidamente las placas en el lector de fluorescencia Fluoroskan Ascent™ FL Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), midiendo a una $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ y la $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$.

2.4. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE MELATONINA

El análisis mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) se aplicó para la determinación de los niveles de melatonina en el humor acuoso de los conejos empleados en los estudios de la presión intraocular. Aunque es un método sensible y relativamente sencillo, debido al elevado número de muestras a procesar en muchos de los estudios, en el resto de los casos se recurrió a un ensayo de tipo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para medir la concentración de melatonina.

2.4.1. Análisis Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución

El humor acuoso primero se procesó manteniéndolo en hielo durante 5 minutos. Los eppendorfs se calentaron en el termobloque a 98°C durante 2 minutos y se transfirió a hielo durante 10 min. Para terminar, se precipitaron las proteínas centrifugando los tubos a 22000 g durante 10 min a 4°C .

Mediante HPLC se midieron las concentraciones de melatonina en los humores acuosos ya procesados. El sistema cromatográfico consistía en una columna Kromaphase C18 de 5.0 mm (25 cm de largo, 0.4 cm de diámetro interior) (Scharlau, Madrid, España), una bomba HPLC isocrática 1515, un detector de absorbancia dual 2487 y un Inyector Reodyne, todo gestionado por el software Breeze de Waters (Milford, MA). El sistema se equilibró durante la

noche con 40% metanol, 60% H₂O. Las mediciones se realizaron a un caudal de 0.8 mL / min fijando el detector a una longitud de onda de 244 nm.

La cuantificación de la melatonina se realizó comparando las muestras con estándares externos de melatonina (M5250-5G, Sigma-Aldrich) disuelta en DMSO.

2.4.2. Ensayo de ELISA para la Medida de Melatonina

Previamente a la realización del ensayo de ELISA, se llevaron a cabo estudios preliminares con la finalidad de determinar si era necesaria la concentración de las muestras mediante un concentrador de vacío, o, por el contrario, los niveles de melatonina presentes en la muestra sin concentrar estaban dentro del rango de medida del kit de ELISA para melatonina que se iba a emplear. Se determinó que los niveles de melatonina eran perfectamente medibles sin la concentración previa de la muestra en el caso de los humores acuosos de conejos e individuos, mientras que en el caso de los medios condicionados de células se requirió realizar la concentración previa de la muestra. Los ensayos de tipo ELISA realizados son de tipo competitivo (Melatonin ELISA kit de ABCAM, Cambridge, UK) y para llevarlos a cabo se siguió paso a paso el procedimiento proporcionado por el fabricante.

Primero se atemperaron todos los materiales y reactivos antes de su uso. En la placa de 96 pocillos, la cual está tapizada con un anticuerpo goat anti-mouse IgG, se añadieron 100 µL de un tampón estabilizador a los pocillos B0 (0 ng/mL standard) y 150 µL a los pocillos NSB. Se continuó incorporando 100 µL de los distintos puntos de la recta estándar de melatonina y 100 µL de cada muestra en los pocillos correspondientes. Después se añadieron 50 µL de un trazador de melatonina marcado con biotina a todos los pocillos excepto al blanco y 50 µL de anticuerpo monoclonal frente a la melatonina a todos los pocillos excepto al NSB y al blanco. Se selló la placa y se dejó incubando a temperatura ambiente en un agitador de placas durante 1 hora a unas 500 rpm. Durante la incubación, de

forma competitiva, el anticuerpo monoclonal se une a la melatonina de las muestras o al marcador de melatonina añadido.

A continuación, se vació el contenido de los pocillos y se lavó el pocillo con 300 μ L de solución de lavado. Este lavado se repitió 2 veces más hasta un total de 3 lavados. Después del lavado final, se vació golpeando la placa firmemente sobre un papel de filtro y se aspiraron los pocillos para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Se añadieron 200 μ L del estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), la cual se une al marcador biotinilado, a todos los pocillos excepto el blanco. Se volvió a sellar la placa incubándose de nuevo a temperatura ambiente en un agitador de placas durante 30 minutos a 500 rpm.

Se vació de nuevo el contenido de los pocillos y se lavó con 300 μ L de tampón de lavado. Se repitió el lavado 2 veces y se volvió a eliminar por completo cualquier resto de tampón de lavado. Se añadieron 200 μ L de la solución de sustrato TMB a todos los pocillos. Se selló e incubó la placa a temperatura ambiente en un agitador de placas durante 30 minutos a 500 rpm por última vez. Para terminar, se añadieron 50 μ L de la solución de parada a todos los pocillos y se leyó la placa a 450 nm en el lector de placas PowerWave XS2 (Biotek). Para el análisis de datos se restó el blanco a todos los pocillos y la concentración de melatonina en cada muestra se calculó por interpolación con la recta patrón del estándar.

2.5. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE 6-HIDROXIMELATONINA

La 6-hidroxi melatonina es el producto de degradación de la melatonina. Para medir sus niveles se utilizó un kit ELISA de CUSABIO (Houston, TX, USA). El rango de detección del kit es de 10 – 400 pg/mL.

Lo primero que se hizo a la hora de realizar este experimento fue dejar a temperatura ambiente todos los materiales y reactivos que se iban a utilizar. Además, se centrifugó la muestra tras su descongelación justo antes del experimento. Se preparó la placa que viene en el kit, la cual está tapizada con un anticuerpo frente a 6-hidroxi melatonina, dejando solo los pocillos necesarios según la cantidad de muestra a analizar el día del experimento, y se almacenó el resto de los pocillos a 4°C para su posterior uso. En primer lugar, se añadieron 50 µL de los estándares de concentración conocida o de muestra en los pocillos que se habían seleccionado. A continuación, se añadieron 50 µL de un conjugado de la 6-hidroxi melatonina con HRP a cada pocillo, excepto al blanco. Se mezcló bien y luego se llevó a incubar en la estufa durante 1 hora a 37°C. Durante esta incubación, la 6-hidroxi melatonina marcada con HRP y la 6-hidroxi melatonina sin marcar presente en las muestras compiten por su unión al anticuerpo de la placa.

Pasado ese tiempo, se vació bien el contenido de los pocillos se lavaron con 200 µL de tampón de lavado. Se repitió el proceso hasta un total de 3 lavados. Tras el lavado final se vaciaron y aspiraron los pocillos golpeándolos firmemente sobre un papel de filtro para eliminar cualquier resto de tampón de lavado. Se añadieron 50 µL de sustrato A y 50 µL de sustrato B, proporcionados por el kit, a cada pocillo y se mezcló bien. La placa se dejó incubando de nuevo en la estufa durante 15 minutos a 37°C en la oscuridad. Por último, se agregaron 50 µL de solución de parada a cada pocillo. La densidad óptica se analizó a 450 nm en un lector de placas espectrofotométrico PowerWave XS2 (Biotek) antes de que transcurrieran 10 minutos tras el último paso. Para el análisis de datos se restó el blanco a todos los pocillos y la concentración de 6-hidroxi melatonina en cada muestra se calcula por interpolación con la recta patrón del estándar.

2.6. LISADO DE CÉLULAS Y TEJIDO OCULARES

2.6.1. Lisado de Células

Las muestras celulares se lisaron utilizando diferentes tampones de lisado (tampón RIPA, tampón para extractos citosólicos de contenido diferente al RIPA y tampón para lisados nucleares).

En el caso del lisado con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), tras realizar los diferentes experimentos se retiró el medio. Se lavó 2 veces con PBS 1x. Se añadieron en cada pocillo entre 50 y 150 μ L de tampón RIPA, dependiendo de la placa en la que se realizó el ensayo, suplementado con un kit de cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Fisher Scientific) al 1%. Se rasparon las placas, se recogió el volumen con la micropipeta y se introdujo en un eppendorf que se mantuvo a su vez en hielo. Se agitó cada muestra con un *Pellet Pestle* (Thermo Fisher Scientific) durante 10 segundos. Finalmente, se centrifugó durante 15 minutos a 15000 rpm y 4°C, y se recogió el sobrenadante para almacenarlo a -20°C para su posterior uso.

Para la obtención de proteína nucleares se empleó un protocolo específico que combina el uso de dos tampones de lisado, uno para la extracción de material citosólico y otro para la lisis de los núcleos celulares (Tabla 7). En estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 100 mm de diámetro con el fin de obtener suficiente concentración de proteínas nucleares para su posterior análisis.

Tampón de lisis citosólico	Tampón de lisis nuclear
HEPES 50 mM, pH 7.2	HEPES 50 mM, pH 7.2
EDTA 2 mM	EDTA 2 mM
NaCl 10 mM	NaCl 400 mM
Sacarosa 250 mM	Glicerol al 20% (v / v)
Nonidet P40 al 10% (v / v)	Nonidet P40 al 10% (v / v)
Inhibidores de proteasas al 1%	Inhibidores de proteasas al 1%

Tabla 7. Composición de los tampones de lisado celular citosólico y nuclear.

Después de exponer a las células a sus respectivos tratamientos, se retiró el medio de incubación y se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS 1x. Posteriormente, se promovió la lisis mediante la adición de 150 μ L de tampón de lisis citosólico, se rasparon y se recogieron las células lisadas. El lisado se transfirió a un tubo eppendorf frío y se centrifugó a 3000 g durante 4 minutos a 4°C, de esta forma se obtuvieron las muestras de proteína citosólica del sobrenadante y se guardaron a -20°C.

El sedimento se utilizó para la extracción de proteínas nucleares. Se lavó resuspendiéndolo en 150 μ L de tampón de lisis citosólico, se centrifugó nuevamente a 3000 g durante 4 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, los pellets se resuspendieron en 25 μ L de tampón de lisis nuclear y se dejaron incubar 20 minutos en hielo, pasándolos por el vórtex cada 5 minutos. Tras ello, las muestras de proteína nuclear se obtuvieron del sobrenadante residual que quedó al centrifugar a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C.

2.6.2. Lisado de Cristalinos

Para realizar el lisado de los cristalinos primero se descongelaron y se pasaron a un eppendorf con la ayuda de unas pinzas. A continuación, se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA suplementado con los inhibidores a una concentración del 2%. Se trocearon los cristalinos manualmente con unas tijeras durante aproximadamente 20 minutos cada muestra. Se pasaron 30 veces a través de una pipeta de 1000 μ L y se dejaron reposar 30 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 4°C y 15000 g durante 30 min. Para terminar, se recogió el sobrenadante y se hicieron alícuotas de 20 μ L, almacenándolas a -80°C.

2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS LISADOS

Una vez obtenidos los lisados, es importante cuantificar la cantidad de proteína presente en cada muestra, con el fin de cargar la misma cantidad al realizar la electroforesis en los ensayos de western blot y poder analizar así, minimizando los posibles errores, las diferencias entre las muestras que se pretenden comparar.

Para la determinación de la concentración de proteína presente en los lisados de células y cristalinos se utilizó el kit comercial BCA Protein Assay de Thermo Scientific. El kit está basado en la reacción del ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} mediante el ácido bicinconínico. El producto resultante de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo Cu^{+1} -BCA y presenta una absorbancia característica a 562 nm. La concentración de proteínas de los lisados se determina mediante la creación de una recta de calibrado construida con una proteína de referencia de concentración conocida. A partir de esta recta se determina la concentración de proteína de los lisados.

Para llevar a cabo el ensayo, primero se descongelaron las muestras, manteniéndolas siempre en hielo. Se realizó una dilución 1:10 de la muestra en H_2O ultrapura, calculando el volumen necesario para hacer triplicados utilizando 25 μL de la dilución por pocillo. Tras realizar la dilución, las muestras se volvieron a congelar para su posterior uso. Se preparó el reactivo WR, resultado de combinar los reactivos A (formado por una mezcla de bicarbonato sódico, ácido bicinconínico, tartrato sódico e hidróxido sódico) y B (4% de sulfato cúprico), y se calculó el volumen necesario siguiendo las siguientes fórmulas:

$$A = [(n^{\circ} \text{demuestras} \times 3) + 9] \times 200$$

$$B = \frac{A}{50}$$

Se introdujeron ambos reactivos en un falcon, se agitó con vórtex, se tapó y se puso en hielo. A continuación, se anotó el orden de las muestras a valorar. Se

añadieron 25 µL de proteína de referencia de concentración conocida en cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Como proteína de referencia para la construcción de la recta de calibrado se usó albumina de suero bovino (BSA) con concentraciones comprendidas entre 25 y 2000 µg/mL de proteína. Después se pipetearon 25 µL de las muestras de los lisados diluidas en los pocillos correspondientes de la placa de 96 pocillos. Finalmente se adicionaron 200 µL del compuesto WR en cada pocillo. Se tapó la placa y se incubó durante 30 minutos en la estufa a 37°C. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 562 nm en el lector de placas PowerWave XS2 (BioTek).

Finalmente, con los datos de la absorbancia a 562 nm de la proteína de referencia BSA y las distintas concentraciones, se obtuvo la recta de calibrado por regresión lineal a partir de la cual se calculó la cantidad de proteína de los lisados. Para ello, se despeja la incógnita “X” de la ecuación según los valores obtenidos de absorbancia para las distintas muestras de los lisados valorados que son la “Y”.

$$Y = \beta_1 X + \beta_0$$

La concentración final de las muestras se multiplicó por 10 para tener en cuenta la dilución realizada.

2.8. WESTERN BLOT

El western blot es un ensayo de inmunodetección de proteínas. Se selecciona una proteína a estudiar y se detecta su presencia en una muestra biológica, en el caso de esta tesis doctoral se utilizaron lisados de células del epitelio del cristalino humano y de cristalinos de conejos albinos de Nueva Zelanda. El primer paso antes de la realización del western blot consiste en la separación electroforética de proteínas de las muestras de interés en función de su masa molecular. Para ello se cargó una cantidad de proteína equitativa de cada muestra en un gel de poliacrilamida y se procedió a llevar a cabo la electroforesis. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Se incubaron los diferentes anticuerpos y finalmente la señal de quimioluminiscencia generada permitió la impresión de una película fotográfica.

Por último se densitometraron las bandas resultantes según la muestra a estudiar (Gavini & Parameshwaran, 2021).

2.8.1. Preparación de los geles

Antes de poner en marcha la electroforesis se prepararon los geles necesarios para cargar las muestras. Se seleccionó el grosor del gel dependiendo del volumen que se iba a cargar, en función de la concentración de proteínas que tuviera nuestra muestra a analizar. Pudiendo ser de 0.75 o 1.50 mm de grosor. La concentración de acrilamida del gel separador también es variable, y se seleccionó en función de la masa molecular de la proteína que queríamos analizar.

Lo primero que se hizo fue limpiar con alcohol los cristales donde se iba a polimerizar el gel de poliacrilamida. Se montaron en un dispositivo de pinzas en vertical y se rellenaron con agua para comprobar que no se salía. Mientras se fue preparando el gel separador empleando una disolución de acrilamida al 30% (p/v) y N,N'-metilen-bisacrilamida al 0.8% (p/v) en agua ultrapura. La polimerización de los geles se inició por adición de persulfato amónico y TEMED. Antes de introducir la disolución del gel separador se retiró el agua que se había añadido y se secó por dentro con papel de filtro. Se echó la disolución del gel separador muy despacio y con cuidado de que no se formaran burbujas. Se añadieron unos 20 μ L de butanol al final para eliminar todas las posibles burbujas y crear una capa superficial. Se esperaron entre 45 minutos y 1 hora a temperatura ambiente para que polimerizase el gel. Se retiró el líquido superficial por decantación y se secó con papel de filtro sin tocar el gel. Durante la polimerización se preparó el gel concentrante que contenía acrilamida al 4%. Se añadió el gel concentrante sobre el gel separador y se introdujo el peine para dar forma a los pocillos. Se volvieron a esperar 45 minutos para que polimerizase de nuevo. Pasado el tiempo, se quitó el peine. Los geles se prepararon el mismo día de la electroforesis o el día anterior; en este último caso, se guardaban los geles en la nevera envueltos en papel humedecido con agua ultrapura.

2.8.2. Preparación de las muestras

Primero se sacaron las muestras y se mantuvieron en hielo para su descongelación. Una vez descongeladas se centrifugaron durante 3 minutos a 15000 rpm y 4°C. En un eppendorf nuevo se pipeteó el volumen de muestra y de tampón Laemmli 3x calculado en función de la cantidad total de proteína a cargar (generalmente entre 15-30 µg). Se introdujeron los eppendorfs con la muestra y el tampón Laemmli 3x en el termobloque a 98°C durante 5 minutos y después se centrifugaron durante 1 minuto a 15000 rpm y 4°C.

2.8.3. Electroforesis

Una vez preparadas las muestras, se colocaron los geles en un sistema vertical de electroforesis Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), situando el cristal pequeño hacia la parte interna. Se añadió el tampón de electroforesis 1x entre los dos geles y se aplicó el patrón y las muestras en los pocillos. Se introdujo el sistema con los geles en la cubeta de electroforesis y se añadió más tampón de electroforesis 1X a la cubeta. Se conectaron los cables, estableciéndose un amperaje constante de 0.025 A por cada gel durante unos 45 minutos o 1 hora hasta que el frente electroforético llegó al final del gel separador, vigilándolo para no perder la muestra (Figura 14).

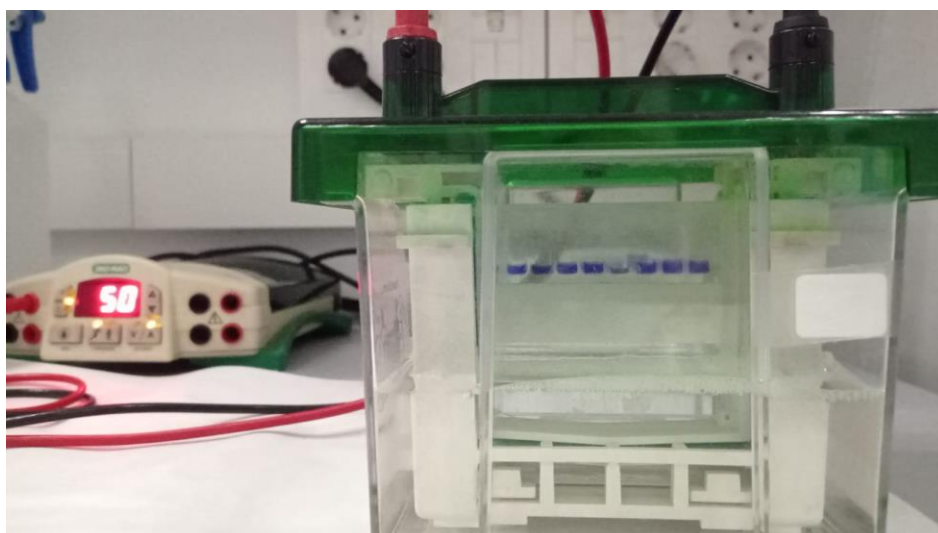


Figura 14. Imagen del sistema electroforético y fuente de alimentación para el desarrollo de la electroforesis.

2.8.4. Transferencia

Finalizada la electroforesis se sacaron los geles, se recortó la esquina inferior derecha y la zona del peine, y se introdujeron los geles y las membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido) durante 15 minutos en tampón de transferencia. Transcurrido ese tiempo se colocó, sobre el equipo de transferencia semi-seca (Bio-Rad), papel de filtro humedecido en tampón de transferencia eliminándose las posibles burbujas. Se colocó encima la membrana de nitrocelulosa y el gel y también se volvieron a retirar las burbujas. Se recortó la membrana sobrante y por último se colocó otro papel de filtro húmedo y se procedió a eliminar una vez más las posibles burbujas. Para el desarrollo de la transferencia se aplicó un voltaje constante de 22 V durante 60-75 minutos dependiendo del grosor del gel.

2.8.5. Inmunodetección

Al finalizar la transferencia y antes de comenzar la inmunodetección, en ocasiones se cortaron las membranas según la masa molecular de las proteínas que nos interesaba detectar. El patrón de colores de masas moleculares conocidas sirvió de guía para seleccionar la zona de corte.

La membrana sin cortar o los trozos de membrana cortados se bloquearon con leche deslipidizada o BSA al 5% en TBS 1x con Tween-20 al 0.1% incubándose durante 1 hora en el agitador a temperatura ambiente. Posteriormente se dejó incubando con el anticuerpo primario, diluido en leche/BSA al 5% en TBS 1x Tween 20 al 0.1% durante toda la noche en la nevera a 4°C. Los distintos anticuerpos utilizados y sus diluciones se muestran en la Tabla 8.

Tras la incubación de la membrana con el anticuerpo primario, al día siguiente, se recogieron y congelaron los anticuerpos primarios diluidos usados. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min en TBS 1x Tween 20 al 0.1% y temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 9),

diluido en leche al 0.25% en TBS 1x Tween 20 al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente 4 veces durante 10 min en TBS 1x Tween 20 al 0.1%.

Anticuerpo primario	Casa Comercial	Código	Dilución	Bloqueo	Anticuerpo secundario	MW de la proteína detectada (kDa)
AANAT	Abcam	#ab3505	1:1000	Leche	GAR (Policlonal)	23-25
AANAT	Invitrogen	#PA5-75722	1:1000	Leche	GAR (Policlonal)	23-25
Caspasa-1	Invitrogen	#PA5-77886	1:500	Leche	GAR (Policlonal)	20
E-Cadherina	Santacruz	#sc-8426	1:500	Leche	GAM (Monoclonal)	132
N-Cadherina	Santacruz	#sc-59987	1:500	Leche	GAM (Monoclonal)	132
GAPDH	Santacruz	#sc-166574	1:500	Leche	GAM (Monoclonal)	37
HIOMT	Abcam	#ab175100	1:1000	Leche	GAR (Policlonal)	38
HIOMT	Abnova	#H00000438-A01	1:1000	Leche	GAM (Monoclonal)	38
JNK 1/2	Cell Signaling	#9252	1:500	Leche	GAR (Policlonal)	54,46
NRF-2	Invitrogen	#PA5-27882	1:500	Leche	GAR (Policlonal)	130
Occludin	Invitrogen	#40-4700	1:200	Leche	GAR (Policlonal)	65
pAANAT	Abcam	#ab3439	1:1000	BSA	GAR (Policlonal)	23-25
pJNK 1/2	Signalway antibody	#SAB11504	1:500	BSA	GAR (Policlonal)	54,46
SNAI-1	Santacruz	#sc-271977	1:200	Leche	GAM (Monoclonal)	34
Vinculina	Santacruz	#sc-25336	1:500	Leche	GAM (Monoclonal)	117
ZO-1	Invitrogen	#40-2200	1:500	Leche	GAR (Policlonal)	225

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo 2º	Donador	Dilución	Casa Comercial	Referencia
Anti-IgG de ratón-HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch	115-035-008
Anti-IgG de conejo-HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch	111-035-046
Anti-IgG de cabra-HRP	Conejo	1:10000	Jackson ImmunoResearch	305-035-008

Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados.

En el último paso se revelaron las membranas. El proceso se basa en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H₂O₂ catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo.

Para ello se incubó la membrana con Pierce Super Signal Substrate (Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos en el agitador o con ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) durante 1 minuto, siempre en oscuridad. Después se secó el borde de la membrana sobre un papel limpio y se colocó en una lámina de plástico con cuidado para que no se formaran burbujas de aire.

En el cuarto oscuro se expuso una película fotográfica a la membrana el tiempo necesario en función de la potencia quimioluminescente. Dependiendo del anticuerpo, el tiempo de exposición varió desde segundos hasta 30 minutos o 1 hora. Los mejores resultados se suelen obtener transcurridos los primeros 15 minutos de incubación con el sustrato. Finalmente, se introdujo la película en el líquido revelador durante 1 minuto o menos, hasta que se consideró que ya se observaban bien las bandas. Después se pasó al líquido fijador, durante otro minuto y se introdujo en agua destilada.

Cuando se terminó de revelar, se almacenó la membrana en PBS 1x a 4 °C para realizar un reprobing en los días siguientes. Las películas se dejaron secar para su posterior densitometrado.

2.8.6. Reprobing

Tras el análisis por inmunodetección de la proteína a estudiar, frecuentemente se reutilizaron las membranas de nitrocelulosa empleando un anticuerpo frente a la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, proteína que permanece invariable en el modelo de estudio) o frente a JNK (para las membranas previamente incubadas con p-JNK). Así, se pudieron obtener valores de referencia que permitieron la normalización de las intensidades de las bandas de las proteínas a analizar. En algunos casos también se volvieron a utilizar las membranas para detectar otras proteínas distintas a la estudiada inicialmente.

Para ello, se sumergió la membrana en 10 mL de la solución de reprobing (Tabla 10) y se incubó en la estufa a una temperatura entre 50-60°C durante 30 min con agitación ocasional cada 10 minutos.

A continuación, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min en TBS 1x Tween 20 al 0.1% en agitación y a temperatura ambiente. A partir de este punto, los siguientes pasos se realizan igual que un western blot desde la etapa de bloqueo en leche o BSA.

Tampón de reprobing	
Beta-mercaptoethanol	100 mM
SDS 10%	2%
Tris 1M pH 6.8	62.5 mM

Tabla 10. *Tampón de reprobing.*

2.8.7. Densitometrado de las películas

Las películas se escanearon y se realizó un análisis densitométrico utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Los datos se corrigieron respecto a la intensidad de la banda correspondiente a GAPDH y se normalizaron respecto al valor control expresándose en porcentaje. En el caso de las películas para estudiar la fosforilación de la ruta de las JNK, los datos se corrigieron respecto a las bandas de la proteína JNK1/2.

2.9. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se analizó en los lisados celulares mediante un kit colorimétrico (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

El kit utiliza sal de tetrazolio que produce un producto coloreado de formazán soluble en agua tras la reducción con el anión superóxido, generado por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una actividad aumentada de SOD en las muestras provoca una disminución de la concentración de superóxido y una reducción del color del producto. Una unidad de SOD corresponde a la cantidad de enzima necesaria para inducir una dismutación del 50% del radical superóxido.

Para realizar este ensayo previamente se prepararon los reactivos que se iban a necesitar. Para preparar el tampón de ensayo y tampón de dilución de muestras se partió de stocks concentrados proporcionados por el kit que se diluyeron 1:10 y 1:20, respectivamente. Se prepararon también el agente detector de radicales (dilución 1:400 del stock del kit) y los diferentes estándares de SOD (0.005-0.050 U/mL de SOD). Finalmente, el último reactivo a preparar antes de iniciar el experimento fue la xantina oxidasa (dilución 1:40 a partir del vial stock).

Tras la preparación de todos los reactivos se procedió a comenzar el ensayo. Para ello se añadieron a todos los pocillos a analizar 200 μ L del agente detector de radicales, después se incorporaron los estándares por duplicado (10 μ L por pocillo) y las muestras a analizar, también por duplicado (10 μ L por pocillo). El siguiente paso fue añadir 20 μ L de la preparación de xantina oxidasa en cada pocillo. Este paso se debe realizar rápidamente ya que a partir de ese momento comienza la reacción. Se agitó con cuidado la placa, se cubrió y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm usando el lector de placas PowerWave XS2 (BioTek).

Los datos se analizaron calculando la absorbancia promedio de los estándares y las muestras. Se dividió el valor de la absorbancia del primer estándar "A" entre el resto de los valores, tanto de los estándares como las muestras de los lisados, para obtener el ratio linealizado (LR) de cada muestra. Con los resultados del ratio linealizado para los estándares y los valores de actividad de SOD conocidos de dichos estándares se generó una curva estándar. Los valores de la actividad de SOD para las muestras se calcularon a partir de la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar, considerando el valor de LR obtenido para cada muestra:

$$\text{SOD(U/mL)} = \left[\left(\frac{\text{LR muestra} - y - \text{intercepto}}{\text{pendiente de la recta}} \right) \times \frac{0.23 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \right] \times \text{dilución de la muestra}$$

2.10. MEDIDA DE INTERLEUQUINA 1 β

Los niveles de Interleuquina 1 β (IL-1 β) se evaluaron mediante un ensayo ELISA con el kit *Quantikine R&D* (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

Se añadieron 200 μ L de estándares de IL-1 β o de las muestras correspondientes a los pocillos de una placa de 96, los cuales tienen anclado un anticuerpo monoclonal que reconoce a la IL-1 β , y se incubaron durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se realizan tres lavados y se adicionaron 200 μ L del conjugado HRP a cada pocillo. Se incubó durante otras 2 horas a temperatura ambiente y nuevamente se lavó la placa 3 veces. A continuación se añadieron 200 μ L del sustrato TMB y se incubó la placa durante otra hora más. Al cabo de esa hora, se pipetearon 50 μ L de la solución de parada del kit. Las densidades ópticas se midieron a 450 nm en el lector de placas espectrofotométrico PowerWave XS2 (Biotek). La concentración de las muestras se calculó por interpolación en la recta patrón del estándar de IL-1 β .

2.11. MEDIDAS EN EL MODELO ANIMAL

2.11.1. Medida de los niveles de glucosa en el modelo animal

Los niveles de glucosa se estuvieron analizando previamente en la orina de los conejos, hasta observar a la semana de la inyección con aloxano que los niveles eran los más altos detectables por las tiras de orina colorimétricamente (Figura 15). Tras la evaluación de estos niveles en la orina, y la confirmación de la obtención de unos niveles altos de glucosa en los conejos cuya diabetes había sido inducida mediante una inyección de aloxano se les comenzó a cuantificar la glucosa en sangre.




Figura 15. Test colorimétrico de glucosa en la orina de conejos.

Como hemos mencionado anteriormente, se midieron semanalmente los niveles de glucosa en sangre desde la primera semana tras la inyección de aloxano. No solo se midió a aquellos conejos diabéticos sino también a los conejos control para obtener la comparativa entre ambos grupos. En el caso de estos últimos tan solo se les tomó la medida una vez. Para analizar la glucosa en sangre se utilizó un glucómetro de sangre (Bayer, Leverkusen, Germany) con el cual se pinchó y se recogió una gota de sangre procedente de una vena de la oreja del conejo.

En el caso de esta prueba no es necesaria la sedación, pero como igualmente se anestesiaba al animal para la recogida de humor acuoso semanal, procedíamos al pinchazo con el animal tranquilo tras realizarle el resto de las pruebas.

2.11.2. Evaluación del desarrollo de la catarata mediante lámpara de hendidura

La formación de cataratas fue evaluada mediante la observación a través de la lámpara de hendidura (Topcon SL-8Z, Tokio, Japón). Se tomaron imágenes de todos los ojos de los conejos al inicio de los experimentos, exactamente una semana después de la inyección de aloxano, como control individual. Esta primera imagen se realizó mediante iluminación directa, enfocando el epitelio



anterior del cristalino transparente. Tras la observación semanal de los cristalinos, se volvió a realizar una fotografía de cada ojo después de 13 semanas desde la inducción a la diabetes. Esta vez se utilizó la técnica de la retroiluminación indirecta ya que permitió una mejor observación de la catarata, en aquellos conejos en los que ya se habían formado claramente.

2.11.3. Estudios de refracción

También se procedió a la medición de la refracción de los conejos mediante reglas de esquiascopía. Se observó el reflejo pupilar de cada ojo de cada conejo buscando la neutralidad de los movimientos de la luz con las reglas de esquiascopía. Para su cálculo se tuvo en cuenta la distancia del brazo de 0.66 cm, restando por tanto 1.50 D al resultado obtenido en las reglas (Figura 16).

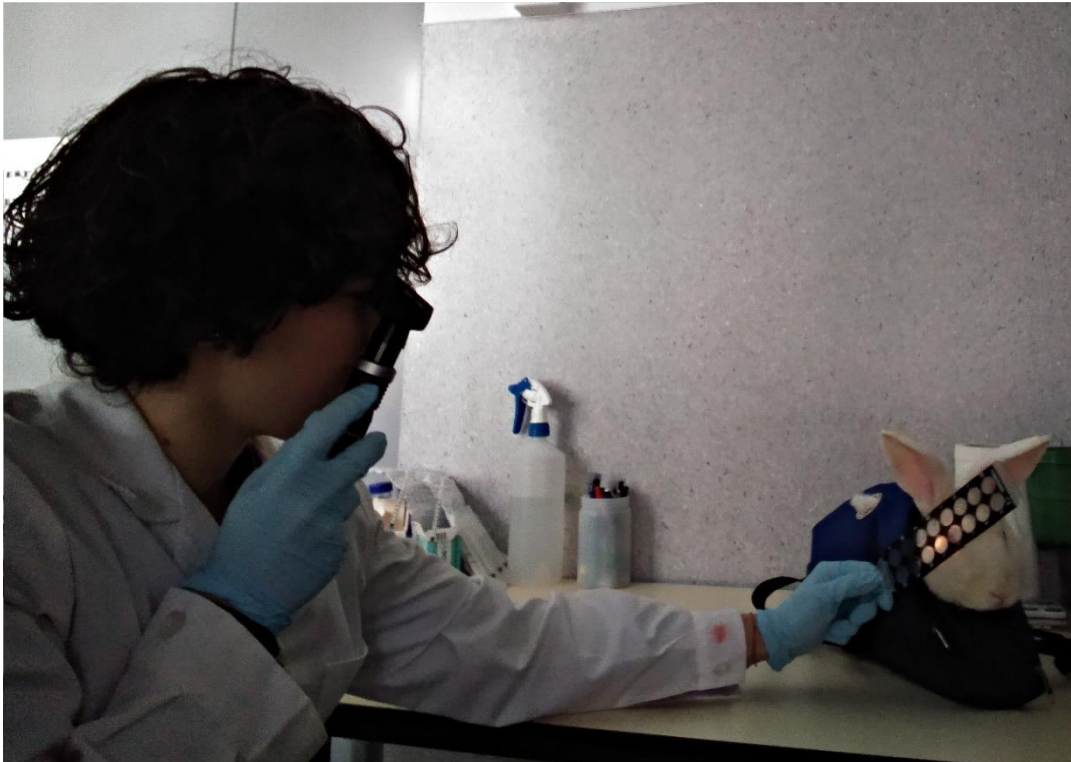


Figura 16. Retinoscopia mediante reglas de esquiascopia en conejos.

2.11.4. Extracción del humor acuoso en el modelo animal

Se extrajeron aproximadamente 100 μ L de humor acuoso de cada ojo de todos los conejos una vez a la semana. Para ello se anestesió al animal mediante una inyección intramuscular con una mezcla de ketamina (7.5 mg/kg, Ketamidor, Karizoo Laboratories, Barcelona, España) y dexmedetomidina (0.04 mg/kg, Dexmopet®, Vetpharma Animal Health, Barcelona, España). Una vez dormidos, se penetró con una aguja de calibre 30, conectada a una jeringa de 1 mL, en el limbo esclerocorneal, se extrajeron unos 100 μ L y se introdujeron en eppendorfs de 1.5 mL (Figura 17). Se almacenaron las muestras a -20°C para su posterior análisis.



Figura 17. Extracción de humor acuoso en conejos.

2.11.5. Enucleación y conservación de tejidos

A las 16 semanas, se sacrificaron todos los conejos pertenecientes a los estudios con el modelo diabético de conejo. Para ello, se empleó una dosis de 1 mL de pentobarbital sódico (400 mg / mL) (EXAGON, Karizoo Laboratories). Los ojos se enuclearon inmediatamente (Figura 18) y se diseccionaron, fotografiándose los cristalinos sobre un papel milimetrado. Seguidamente se almacenaron los tejidos oculares obtenidos, introduciéndolos en falcons de 15 mL con 1 mL de RNA-later (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.), a -80°C para lizarlos posteriormente y analizarlos mediante western blot.

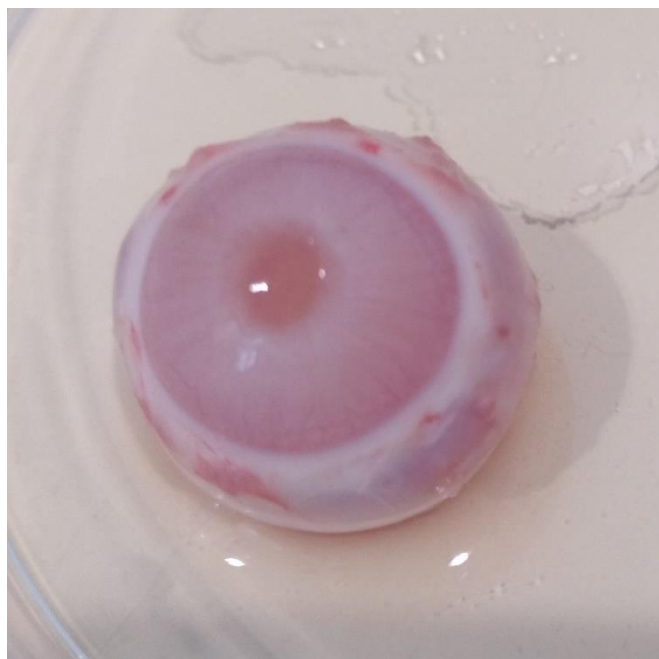


Figura 18. Globo ocular de conejo recién enucleado.

2.11.6. Medidas de presión intraocular

Mediante el tonómetro de rebote TonoVET® (Tiolat Oy, Helsinki, Finlandia) se midió la presión intraocular de los conejos (Figura 19). Éste es un tonómetro de uso veterinario que no requiere utilizar anestesia tópica. Sujutando al conejo en posición horizontal, se realizaron 5 medidas para finalmente seleccionar las 3 más cercanas y realizar su análisis estadístico.

Las medidas se tomaron una vez a la semana y siempre alrededor de las 10 de la mañana con el fin de minimizar posibles variaciones en IOP. Para los experimentos con el filtro, la IOP se evaluó una vez a la semana durante 1 mes antes de quitarles el filtro para medir posibles cambios durante el siguiente mes.

Tras permanecer 3 semanas con el filtro, se realizaron experimentos suministrando agentes farmacológicos tales como inhibidores de receptores de melatonina o antagonistas de melanopsina a los conejos (20 µL de fármaco en cada ojo). En el caso de estos estudios empleando fármacos, se tomaron 2 medidas 30 minutos antes de la adición de los compuestos y a continuación se tomaron medidas a distintos tiempos en función del estudio tras la instilación de dichos fármacos.



Figura 19. Medición de la PIO mediante el TonoVET®.

2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética \pm la desviación estándar de la media (SD). Las comparaciones entre los diferentes resultados se realizaron utilizando principalmente análisis estadísticos paramétricos. Las comparaciones entre las medias de tres o más grupos se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y se realizaron pruebas post-hoc de comparación de medias (Tukey test). Se consideró como estadísticamente significativo un p valor menor de 0.05. A partir de ese valor los niveles de significación establecidos fueron: * $p < 0.05$, diferencias significativas; ** $p < 0.01$, diferencias muy significativas; *** $p < 0.001$, diferencias extremadamente significativa; y **** $p < 0.0001$, como diferencias muy extremadamente significativas. Los gráficos al igual que el análisis estadístico se realizaron mediante el software GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA).



RESULTADOS



1. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MELATONINA EN LA VIABILIDAD CELULAR

Con el fin de analizar si el tratamiento con melatonina podría inducir algún efecto citotóxico en las células del epitelio del cristalino humano (HLE-B3), se utilizó el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para medir la viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de melatonina durante 24 horas.

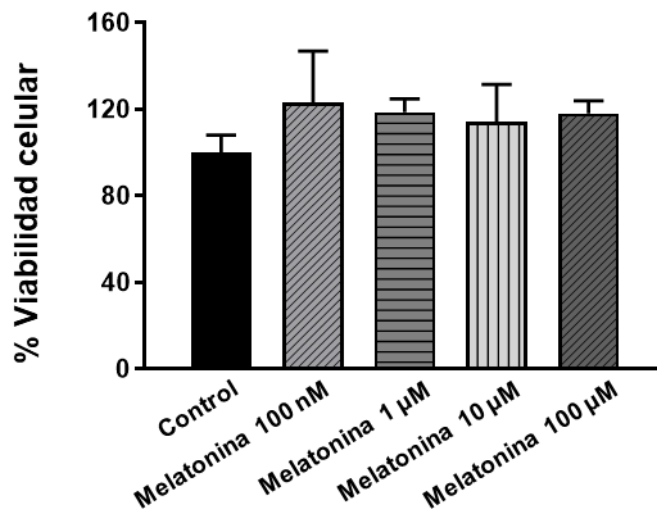


Figura 20. Ensayo de dosis respuesta de la melatonina sobre la viabilidad de las células HLE-B3. Se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT tras la administración de melatonina a diferentes concentraciones (100 nM, 10 µM, 1 µM y 100 µM) durante 24 horas en células del epitelio del cristalino humano. Los datos se normalizaron respecto al valor control (100%). Se muestran las medias \pm SD (n = 3).

Como se muestra en la Figura 20, el porcentaje de viabilidad celular de las células del epitelio del cristalino humano (HLE-B3) no experimentó ninguna disminución importante. De hecho, se pudo observar un ligero aumento, si bien los cambios no resultaron ser estadísticamente significativos. Estos hallazgos revelaron la ausencia de efectos citotóxicos tras el tratamiento con melatonina.

2. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para evaluar el efecto de la exposición de peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células epiteliales de cristalino humano, se sometieron las células HLE-B3 a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (50 μ M, 200 μ M, 350 μ M, 600 μ M, 1 mM y 1.5 mM) durante dos horas (Figura 21) y se evaluó la inducción de muerte celular mediante el ensayo de MTT.

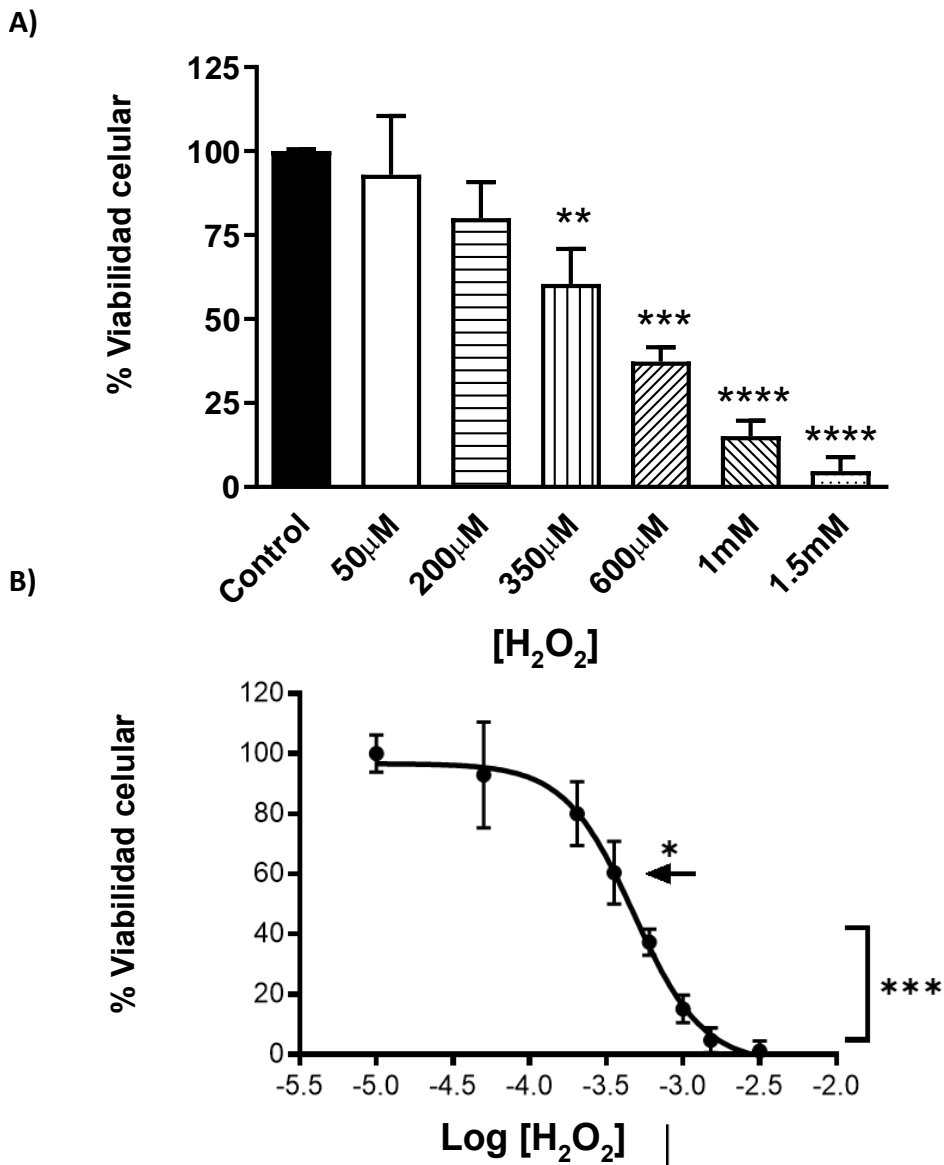


Figura 21. Análisis de la viabilidad celular tras el tratamiento con H₂O₂.

A) Mediante análisis de MTT se estudiaron los cambios en viabilidad celular tras someter a las células HLE-B3 a estrés oxidativo con diferentes concentraciones de H₂O₂ (50 μ M, 200 μ M, 350 μ M, 600 μ M, 1 mM y 1.5 mM). B) Se muestra la curva dosis-respuesta a escala logarítmica de las distintas concentraciones de H₂O₂. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, (n = 8).

Como se observa en la Figura 21, la concentración más baja con la que se detectaron diferencias estadísticamente significativas fue 350 μM ($p < 0.01$), disminuyendo la viabilidad celular al 60% respecto al control (100%). La reducción de la viabilidad celular fue dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno empleada, observándose un dramático descenso de la misma (valores inferiores al 20% respecto al control) a concentraciones de 1 mM y 1.5 mM ($p < 0.0001$). El valor de IC_{50} resultante fue de 477 μM (Figura 21B).

3. EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA TRAS LA EXPOSICIÓN A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Dado que el tratamiento con una concentración de 350 μM de peróxido de hidrógeno indujo una significativa reducción de la viabilidad celular se seleccionó esta concentración para evaluar el posible efecto protector de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en las células HLE-B3. Para ello, se estresaron las células con la adición de H_2O_2 en el medio celular durante dos horas y se comparó su viabilidad con respecto a células no expuestas a H_2O_2 y con células expuestas a H_2O_2 pretratadas previamente con melatonina a diferentes concentraciones durante las 24 horas anteriores al experimento.

Como era de esperar se observó una significativa reducción del 40% en la viabilidad de las células del epitelio del cristalino humano expuestas al estrés oxidativo inducido por 350 μM de H_2O_2 en comparación con los valores de viabilidad de las células HLE-B3 control ($p < 0.01$). En cambio, al proporcionar a las células un pretratamiento con melatonina, las concentraciones de esta neurohormona entre 1 y 100 μM permitieron paliar el deterioro en viabilidad celular provocado por el H_2O_2 detectándose diferencias estadísticas muy significativas ($p < 0.0001$, respecto al tratamiento con H_2O_2) (Figura 22).

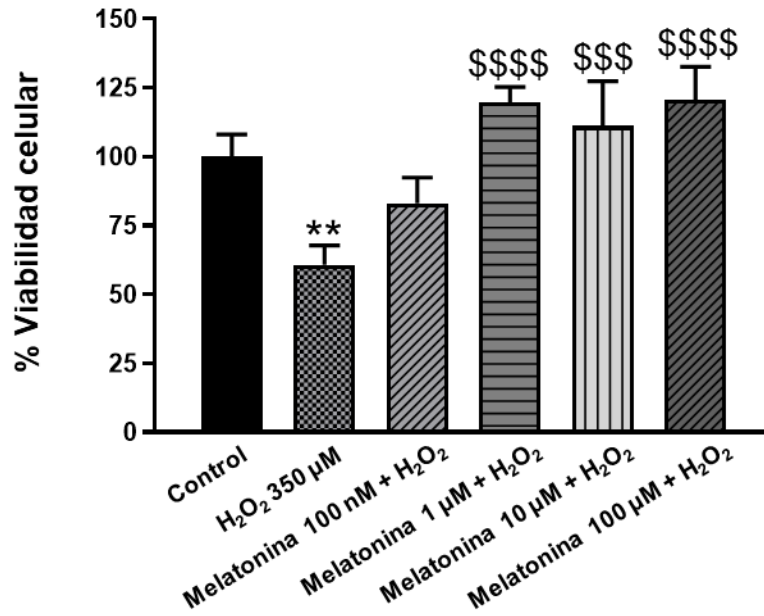


Figura 22. Acción de la melatonina en la viabilidad de células HLE-B3 tratadas con H₂O₂. Resultados de MTT mostrando la viabilidad celular de las células HLE-B3 expuestas durante dos horas a H₂O₂ (350 µM) solo o a H₂O₂ y pretratamiento de melatonina durante 24 horas a diferentes concentraciones (100 nM, 1 µM, 10 µM y 100 µM). Se muestran los porcentajes normalizados respecto al control. Los datos representan la media ± SD (n = 3). ** p < 0.01, en comparación con el control. \$\$\$ p < 0.001, \$\$\$\$ p < 0.0001, en comparación con las células con H₂O₂.

Por otro lado, también se comparó la eficacia protectora de la melatonina frente a la citotoxicidad si existía un pretratamiento previo con esta neurohormona durante las 24 horas previas a la adición de H₂O₂ o si era añadida junto con H₂O₂ (Figura 23).

Como se aprecia en la Figura 23, la viabilidad celular de las células expuestas a H₂O₂ (350 µM) disminuye hasta alcanzar un 60.84% en comparación con el control (100%) (p < 0.01, n= 5). En cambio, al recibir el tratamiento con melatonina durante 24 horas antes, ésta evita el daño celular y aumenta la viabilidad celular respecto a las células estresadas con H₂O₂ (p < 0.0001, n=5). Por el contrario, al añadir la neurohormona en el mismo momento en el que se adiciona el H₂O₂, el tratamiento no es capaz de impedir el impacto que tiene el H₂O₂ sobre las células, aumentando solo ligeramente su viabilidad con respecto a las células expuestas a H₂O₂, sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas.

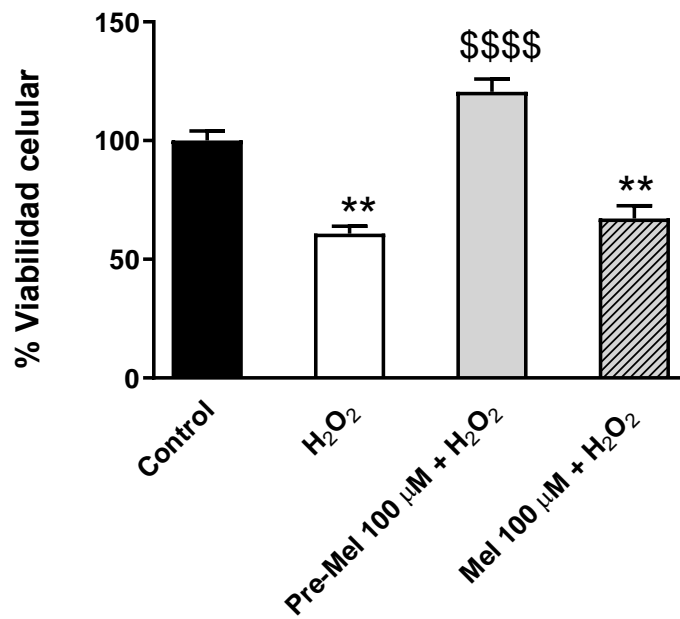


Figura 23. Efecto en la viabilidad celular modificando el momento de aplicación de la melatonina. Estudio de la viabilidad celular con diferentes tratamientos de melatonina variando el momento de la administración (24 horas antes o únicamente durante la exposición a H₂O₂). Los datos se normalizan respecto al control (100%) y se expresan como la media ± desviación típica. ** $p < 0.01$ en comparación con el control, \$\$\$\$ $p < 0.0001$ respecto a la exposición a H₂O₂, (n = 5).

4. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO POR EXPOSICIÓN A LUZ LED EN LAS CÉLULAS HLE-B3

Con el fin de confirmar que la exposición a luz de tipo LED puede inducir estrés oxidativo se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno mediante ensayos fluorimétricos en las células HLE-B3 expuestas a luz LED de diferentes longitudes de onda. Concretamente, se sometieron las células HLE-B3 durante 2 horas a oscuridad (control), luz LED blanca (400-700 nm), luz LED roja (625-640 nm) y luz LED azul (465-480 nm) (Figura 24).

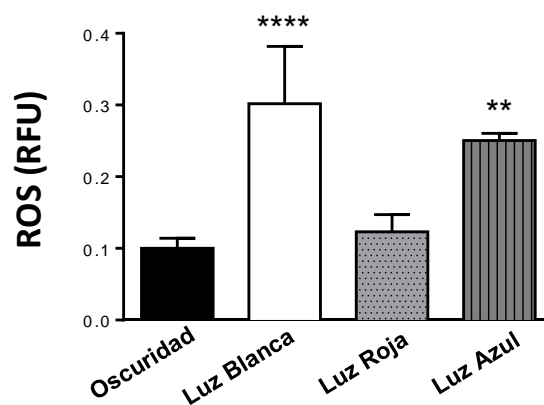


Figura 24. Especies reactivas de oxígeno detectadas tras la exposición a luz LED de diferentes tipos. Células expuestas a oscuridad y luz LED blanca, roja y azul durante dos horas. Media \pm SD. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, en comparación con el control ($n = 3$).

La luz LED blanca produjo un incremento en la producción de ROS de 3.2 veces en comparación con los niveles en condiciones de oscuridad ($p < 0.0001$). Al analizar el efecto de la luz en función de su longitud de onda, comprobamos que este efecto se producía esencialmente con la exposición a la longitud de onda más energética (luz azul) a diferencia de la luz roja que mantuvo niveles más similares a los del control en oscuridad (Figura 24). En base a estos resultados, se seleccionó la luz LED blanca para los experimentos con células en los que se indujo estrés oxidativo mediante la radiación lumínica.

5. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA PRODUCCIÓN DE ROS EN CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Se examinó la producción de ROS en células expuestas a distintas condiciones experimentales: células expuestas durante 2 horas a oscuridad (control), luz LED blanca, luz LED blanca y pretratamiento de melatonina con una concentración de 100 μM durante las 24 horas anteriores al experimento, y células tratadas 30 minutos antes de la adición de la neurohormona con 2 antagonistas diferentes de los receptores de melatonina (luzindol y 4-P-PDOT) (Figura 25).

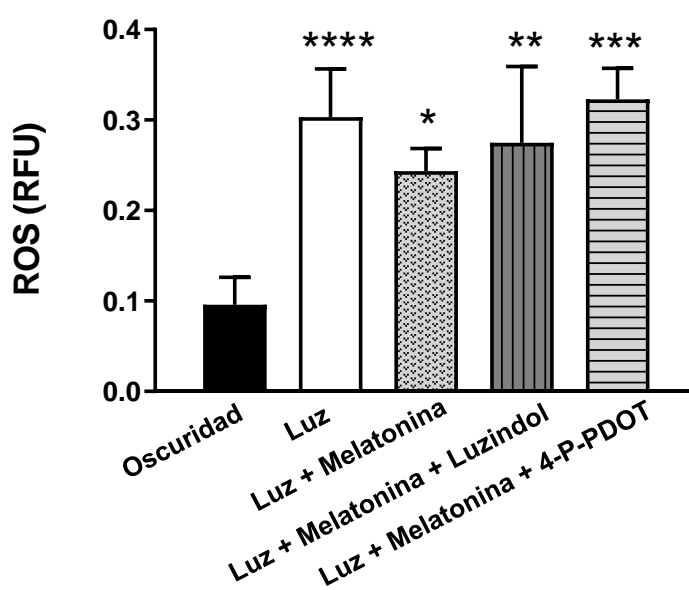


Figura 25. Efecto de la melatonina en la producción de ROS en células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca. Las células se expusieron durante 2 horas a oscuridad o luz LED blanca, sin y con un pretratamiento de 24 horas con melatonina 100 μM , y otras células fueron tratadas con luzindol o 4-P-PDOT (antagonistas de los receptores de melatonina) además de la luz y la melatonina. La acumulación de ROS se evaluó por fluorimetría. Se muestra la media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$, en comparación con el control, ($n = 5$).

Se detectó un aumento de las especies reactivas de oxígeno en las células expuestas a la luz, exhibiendo unos valores alrededor de tres veces superiores respecto al control ($p < 0.0001$). La administración de melatonina disminuyó el incremento de ROS provocado por la luz LED blanca, aunque no se llegaron a recuperar los niveles presentes en el control, existiendo diferencias estadísticas entre el control y el tratamiento con luz y melatonina ($p < 0.05$) (Figura 25). Al añadir tanto luzindol como 4-P-PDOT, antagonistas no selectivo y selectivo de los receptores de melatonina MT_2 , respectivamente, el efecto inducido por la melatonina sobre la producción de ROS se bloqueó, volviendo a niveles de ROS

semejantes a los de las células HLE-B3 en condiciones de 2 horas con luz LED blanca sin ningún tipo de tratamiento. El efecto inhibitorio sobre la acción de la melatonina fue más acusado en el caso del antagonista de los receptores MT₂, 4-P-PDOT (Figura 25).

6. EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Se estudió también la viabilidad celular mediante ensayos de MTT de las células del epitelio del cristalino humano en condiciones control (en oscuridad), con luz LED blanca y luz con un pretratamiento de melatonina (100 μ M) administrado 24 horas antes. A otras células se les añadió además antagonistas de los receptores de melatonina (luzindol y 4-P-PDOT), ambos a concentraciones de 100 μ M. Los antagonistas de los receptores fueron administrados 30 minutos antes de la incorporación de la melatonina.

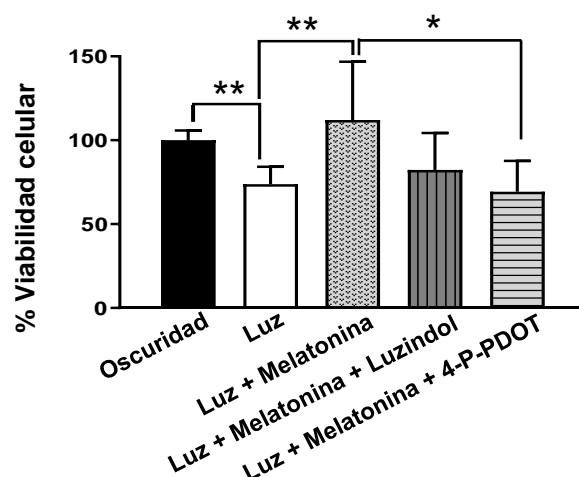


Figura 26. Efecto de la melatonina en la viabilidad celular de las células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca.

Las células se expusieron durante 2 horas a oscuridad o luz LED blanca, sin y con un pretratamiento de 24 horas con melatonina 100 μ M, y otras células fueron tratadas con luzindol o 4-P-PDOT (antagonistas de los receptores de melatonina) además de la luz y la melatonina. Los datos mostrados corresponden a los porcentajes normalizados frente al control en oscuridad (100%). Se muestra la media \pm SD. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ($n = 3$).

Los resultados de estos experimentos se muestran la Figura 26. En el caso de las células expuestas a la luz, se produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular del 26% en comparación con el control ($p < 0.01$). En cambio, al administrar la melatonina, ésta actuó como protector frente al daño citotóxico desencadenado por la luz LED blanca, aumentando la viabilidad hasta un valor de 112%, no mostrando diferencias significativas en comparación con el control, pero sí respecto a las condiciones de luz ($p < 0.01$). Por el contrario, tal y como cabía esperar, al administrar tanto el antagonista no selectivo de los receptores de melatonina de MT_1 y MT_2 (luzindol) como el

específico de MT_2 (4-P-PDOT) se bloqueó el efecto de la melatonina exógena aplicada, disminuyendo la viabilidad celular a niveles similares a los de las muestras expuestas a luz sin melatonina. Nuevamente, fue el antagonista 4-P-PDOT el que revirtió de modo más significativo el efecto protector de la melatonina ($p < 0.05$). Estos resultados indican que el efecto protector de la melatonina sobre la viabilidad celular parece ser mediado por receptores de melatonina, especialmente por receptores del tipo MT_2 .

7. EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS CONJUNTAMENTE A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y LUZ LED BLANCA

Se analizó si el pretratamiento con melatonina podría proteger del efecto tóxico inducido por la combinación de los dos agentes estresores empleados: H_2O_2 y luz LED blanca (Figura 27). Como se observa en la Figura 27, la aplicación de melatonina previno significativamente el descenso en viabilidad celular inducido por H_2O_2 y luz LED blanca ($p < 0.0001$). El efecto protector de la melatonina fue revertido por el tratamiento con antagonistas de receptores de melatonina (Figura 27).

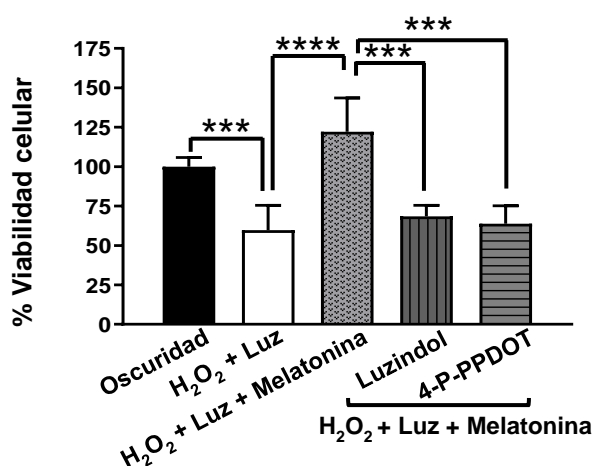


Figura 27. Efecto de la melatonina en la viabilidad celular de las células HLE-B3 expuestas a H_2O_2 y luz LED blanca.

Las células se expusieron durante 2 horas a oscuridad o luz LED blanca junto con H_2O_2 , sin y con un pretratamiento de 24 horas con melatonina $100 \mu M$, y otras células fueron tratadas con luzindol o 4-P-PPDOT (antagonistas de los receptores de melatonina) además de la luz en combinación con H_2O_2 y la melatonina. Los datos mostrados corresponden a los porcentajes normalizados frente al control en oscuridad (100%). Se muestra la media \pm SD ($n = 3$). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

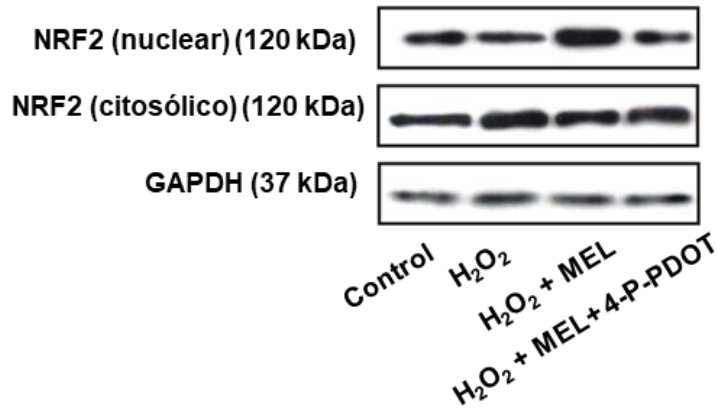
8. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MODULADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO NRF2 Y DE LA ENZIMA SOD EN CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDATIVO

Como se comentó en la introducción, la proteína Nrf2 es un sistema celular de defensa antioxidante inducible, que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de distintos genes de enzimas antioxidantes. Nrf2 es por tanto un importante regulador de la respuesta antioxidante que contribuye a limitar el daño celular inducido por el estrés oxidativo. En condiciones basales Nrf2 se localiza en el citoplasma celular unido a la proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), la cual dirige su degradación proteosomal. En condiciones de estrés oxidativo, la oxidación de residuos de cisteína de Keap1, altera su unión a Nrf2 y ésta se transloca al núcleo celular para inducir la transcripción de genes antioxidantes. Dada la importancia de Nrf2 como regulador de la respuesta antioxidante se analizó si la actividad antioxidante y el efecto protector frente al daño celular observado para melatonina en las células humanas epiteliales del cristalino estaba relacionado con la modulación de la expresión proteica de Nrf2 así como la consiguiente regulación de enzimas antioxidantes como la SOD.

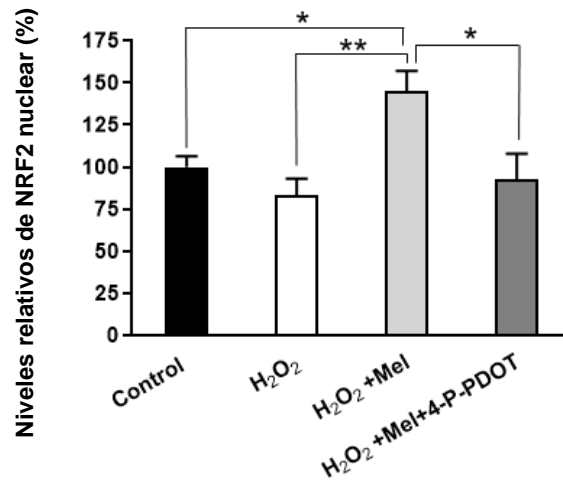
8.1. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA NRF2 MEDIANTE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS HEL-B3 TRATADAS CON H₂O₂

Se analizó la expresión de la proteína Nrf2 en extractos citosólicos y nucleares de células del epitelio del cristalino humano sometidas a distintas condiciones experimentales (H₂O₂, H₂O₂ y pretratamiento con melatonina sin y con incubación con el antagonista de receptores de melatonina 4-P-PDOT) mediante estudios de western blot (Figura 28).

A)



B)



C)

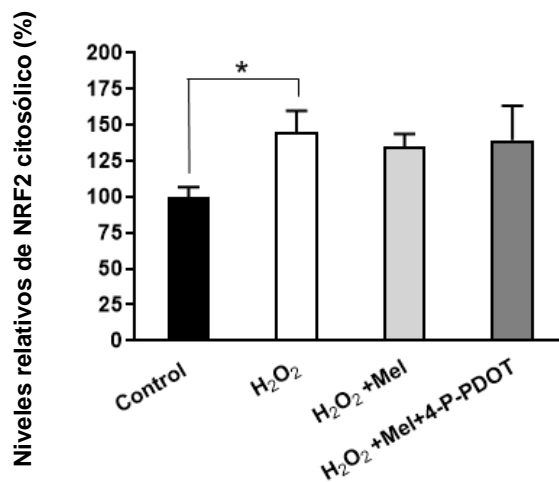


Figura 28. Niveles de Nrf2 en células tratadas con H₂O₂ en ausencia o presencia de melatonina. Las células HLE-B3 se expusieron durante dos horas a H₂O₂ (350 μM), también se realizó un pretratamiento de melatonina (100 μM) sin y con el antagonista de los receptores de melatonina 4-P-PDOT (100 μM). A) Bandas representativas de los western blots realizados con el anticuerpo anti-Nrf2 y anti-GAPDH (control de carga). B) Histograma de los niveles relativos de la proteína Nrf2 nuclear. C) Histograma de los niveles proteicos de Nrf2 medidos en los extractos citosólicos. Los resultados vienen indicados como la media ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ($n = 3$).

Los niveles proteicos de Nrf2 mostraron unos resultados opuestos entre los extractos nucleares y citosólicos tras la exposición a H_2O_2 (Figura 28). En las células expuestas a H_2O_2 , la concentración proteica de Nrf2 en los extractos nucleares era más bajas respecto al control (Figura 28B), mientras que sus niveles se incrementaron significativamente con respecto a éste en los extractos citosólicos (Figura 28C) ($p < 0.05$). La aplicación de melatonina de forma exógena, 24 horas antes de someter a las células a estrés oxidativo, aumentó drásticamente ($p < 0.01$) la concentración nuclear de Nrf2 bloqueando el descenso en sus niveles originado por el peróxido de oxígeno, incrementándose incluso los niveles de Nrf2 (1.45 veces) con respecto al control ($p < 0.05$) (Figura 28B). Al añadir el antagonista de los receptores de melatonina (4-P-PDOT) se observó un cambio apreciable en la proteína Nrf2 nuclear revirtiendo este agente el incremento inducido por la melatonina ($p < 0.05$) (Figura 28B).

8.2. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD DE LAS CÉLULAS HEL-B3 EXPUESTAS A H_2O_2

Dado que la proteína Nrf2 regula la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, se analizó la actividad de dicha enzima en las células expuestas a los tratamientos anteriormente indicados. En la Figura 29 se observa como la exposición a H_2O_2 disminuyó la actividad de SOD respecto al control, aunque este descenso no fue estadísticamente significativo (Figura 29). El pretratamiento con melatonina incrementó la actividad de la SOD de modo significativo respecto a la exposición a H_2O_2 ($p < 0.05$). En cambio, al añadir 4-P-PDOT (antagonista de los receptores de melatonina MT_2) la actividad de la SOD no sufrió cambios respecto a las células expuestas a H_2O_2 .

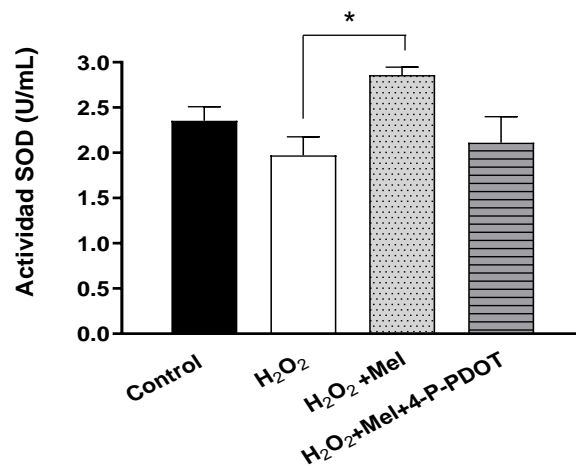


Figura 29. Actividad de la enzima SOD en lisados de células HLE-B3 expuestas a H₂O₂ en ausencia o presencia de melatonina.

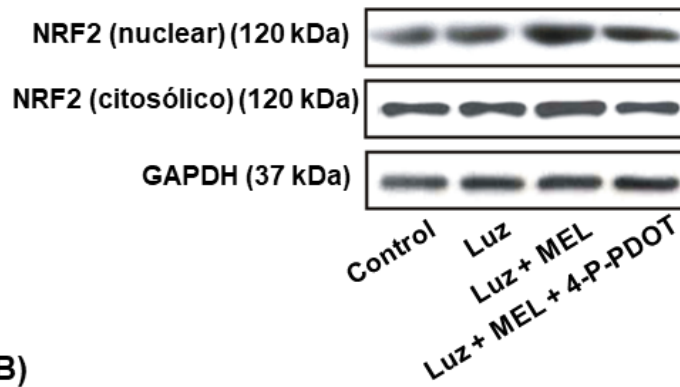
Histograma representando la actividad de la enzima SOD (U/mL) en los lisados de las células expuestas a condiciones de 2 horas con H₂O₂ (350 μM), pretratamiento con melatonina (100 μM) y H₂O₂ y pretratamiento con melatonina e incubación con el antagonista 4-P-PDOT (100 μM). Los datos muestran la media ± SD. * p < 0.05 frente a H₂O₂ (n=3).

8.3. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA NRF2 POR MELATONINA EN LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

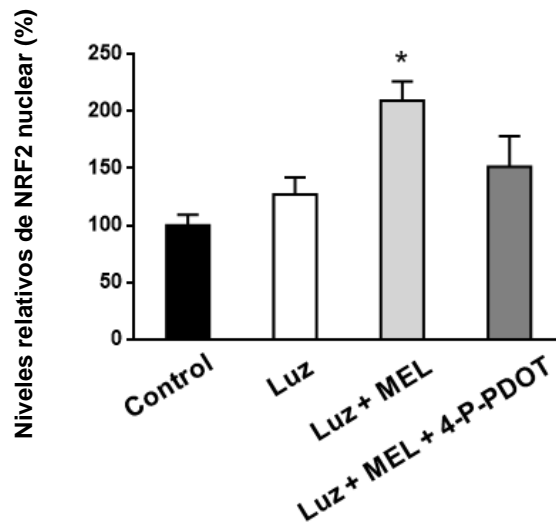
Se analizaron mediante ensayos de western blot los niveles de la proteína Nrf2 tanto en extractos citosólicos como nucleares de las células HLE-B3 expuestas a distintas condiciones lumínicas: dos horas en oscuridad (control), dos horas de exposición a luz LED blanca sin y con pretratamiento de melatonina y dos horas de exposición a luz LED blanca y pretratamiento con melatonina e incubación con el antagonista de receptores de melatonina MT₂, 4-P-PDOT (Figura 30).

En el caso de las células sometidas a condiciones de luz LED blanca y con el pretratamiento de melatonina se detectaron unos niveles proteicos de Nrf2 nuclear de alrededor del doble en comparación con el control (p < 0.05) (Figura 30B), así como un incremento en los niveles citosólicos de la proteína, si bien este aumento fue inferior (p < 0.05) (Figura 30C). En ambos casos los efectos de la melatonina sobre la expresión proteica de Nrf2 fueron anulados por el antagonista 4-P-PDOT disminuyendo los niveles de proteína Nrf2 (Figura 30B y C).

A)



B)



C)

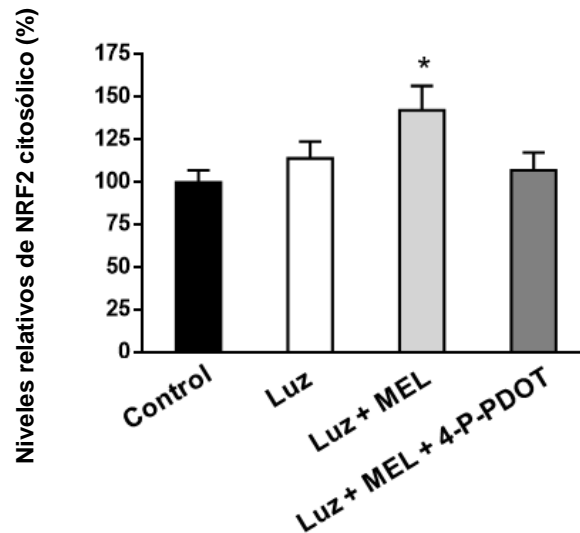


Figura 30. Niveles de Nrf2 en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz en ausencia o presencia de melatonina.

Las células HLE-B3 se expusieron durante dos horas a oscuridad (control), luz LED blanca y a la misma luz con un pretratamiento de melatonina (100 μ M) sin y con el antagonista de los receptores de melatonina 4-P-PDOT (100 μ M). A) Bandas representativas de los western blots realizados con el anticuerpo anti-Nrf2 y anti-GAPDH (control de carga). B) Histograma de los niveles relativos de la proteína Nrf2 nuclear. C) Histograma de los niveles proteicos de Nrf2 medidos en los extractos citosólicos. Los resultados se muestran como la media \pm SD. * $p < 0.05$ ($n = 3$).

8.4. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA ACTIVIDAD DE LA SOD DE LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

La actividad de la superóxido dismutasa fue analizada también en los lisados celulares de las células HLE-B3 expuestas a estrés oxidativo inducido por la exposición a luz LED blanca. En la Figura 31 se observa como el pretratamiento con melatonina incrementó la actividad de la SOD ($p < 0.05$). En cambio, al añadir 4-P-PDOT (antagonista de los receptores de melatonina MT_2) la actividad de la SOD no sufrió cambios respecto a las condiciones de las células expuestas a la luz sin melatonina (Figura 31).

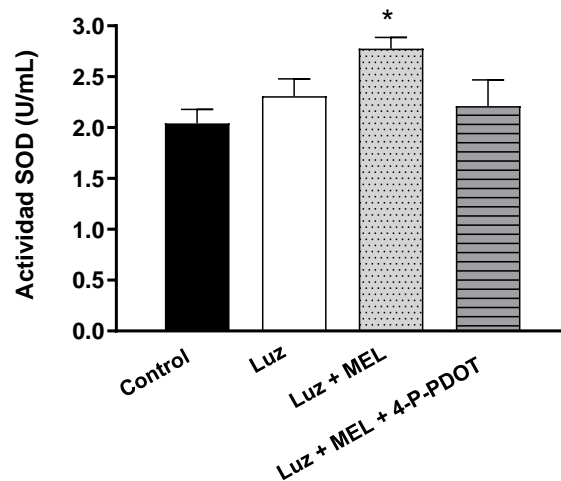


Figura 31. Actividad de la SOD en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz sin y con melatonina.

Histograma representando la actividad de la enzima SOD (U/mL) en los lisados de las células expuestas a dos horas de oscuridad, luz LED blanca, luz LED blanca con melatonina ($100 \mu M$) sin y con antagonistas de los receptores de melatonina 4-P-PDOT ($100 \mu M$). Los datos muestran la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ frente a las condiciones de oscuridad ($n=3$).

9. EFECTO DE LA MELATONINA EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3

Como se indicó en la introducción, la acumulación de ROS puede originar la activación del inflamasoma NLRP3 en el cristalino. El inflamasoma NLRP3 conduce a la activación de caspasa-1, la cual cataliza el corte de la pro-IL-1 β (pro-interleuquina 1 β) generando IL-1 β madura que es entonces secretada. La activación del inflamasoma NLRP3 es considerada como un mecanismo implicado en el daño al cristalino asociado al desarrollo de cataratas. Por ello, se estudió si el efecto protector observado para la melatonina podría también estar relacionado con la capacidad de esta neurohormona para regular la activación del complejo NLRP3.

9.1. REGULACIÓN POR MELATONINA DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LAS CÉLULAS HLE-B3 TRATADAS CON H₂O₂

Se examinaron los niveles de la proteína NLRP3 así como la activación de la caspasa-1. Para ello se realizaron ensayos de western blot a partir de las muestras obtenidas de células HLE-B3 expuestas a las condiciones experimentales previamente descritas: células control, tratamiento con H₂O₂ sin y con pretratamiento con melatonina exógena, así como incubación con 4-P-PDOT (antagonista de los receptores MT₂) además de H₂O₂ y melatonina (Figura 32).

Los niveles de la proteína NLRP3 mostraron un aumento estadísticamente significativo de 1.4 veces en las células expuestas a H₂O₂ en comparación con las células control (p<0.01) (Figura 32B). La aplicación exógena de melatonina consiguió reducir significativamente este incremento provocado por H₂O₂ (p<0.05) (Figura 32B). Al incluir el antagonista 4-P-PDOT los efectos de la melatonina se revirtieron aunque no en su totalidad (Figura 32B).

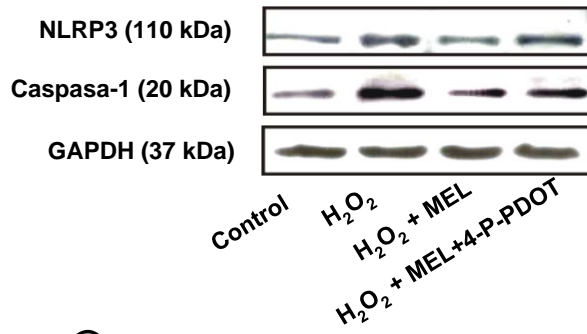
En el caso de los análisis de la subunidad p20 de la proteína caspasa-1 activa se obtuvieron también niveles más elevados al exponer las células HLE-B3 a estrés oxidativo mediante la adición de H₂O₂ (Figura 32C). Concretamente, el

incremento detectado fue de 1.56 veces en comparación con el control ($p < 0.01$) y de nuevo se redujo por el efecto del pretratamiento con melatonina, si bien, no se llegaron a alcanzar diferencias estadísticamente significativas (Figura 32C). La incubación con 4-P-PDOT también revirtió parcialmente el efecto de la neurohormona (Figura 32C).

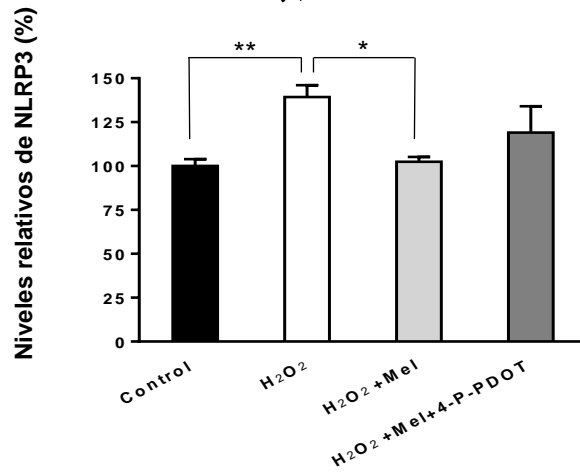
Además, dado que el inflammasoma NLRP3 desencadena la activación de la caspasa-1 y que ésta, a su vez, media la maduración de IL-1 β , se evaluaron también mediante ELISA los niveles proteicos de IL-1 β en las muestras celulares (Figura 33).

Al igual que subieron los niveles de proteína de NLRP3 y caspasa-1 en condiciones de estrés oxidativo, también se observó esta misma tendencia en el caso de la IL-1 β al añadir H₂O₂ a las células HLE-B3, aumentando la concentración de IL-1 β 1.66 veces respecto al control ($p < 0.01$) (Figura 33). De nuevo se visualizaron diferencias significativas entre las muestras procedentes de las células HLE-B3 únicamente expuestas a H₂O₂ y las células HLE-B3 pretratadas con melatonina 24 horas antes de estresar a las células con H₂O₂, las cuales presentaron una significativa reducción en la concentración proteica de IL-1 β ($p < 0.01$) (Figura 33). La adición del antagonista de los receptores de melatonina (4-P-PDOT) bloqueó parcialmente el efecto de la melatonina, lo que se tradujo en un incremento de la proteína IL-1 β (Figura 33).

A)



B)



C)

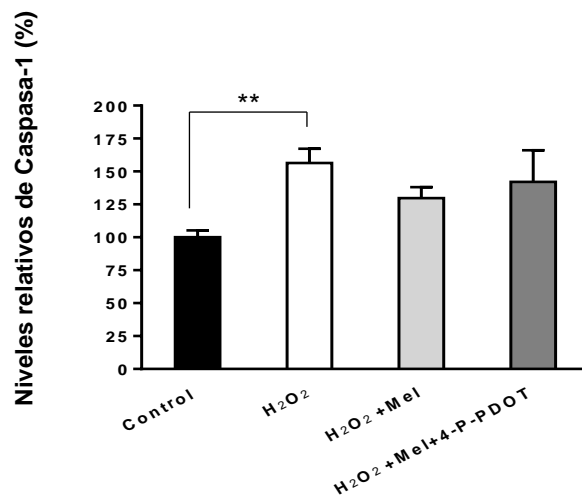


Figura 32. Niveles proteicos de NLRP3 y caspasa-1 en células HLE-B3 estresadas con H₂O₂ en ausencia o en presencia de melatonina.

Las células del epitelio del cristalino humano fueron expuestas a H₂O₂ (350 μM). Adicionalmente se pretrataron con melatonina (100 μM) durante 24 horas y a algunas placas de células se les añadió 30 minutos antes un antagonista de los receptores de melatonina (4-P-PDOT, 100 μM). A) Se muestran imágenes representativas de las bandas de los western blots obtenidas con los anticuerpos para NLRP3, caspasa-1, así como para GAPDH (control de carga). Se representan los niveles relativos de la proteína NLRP3 (B) y caspasa-1 (C) en los diferentes histogramas. Los datos se indican como la media ± SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 (n=3).

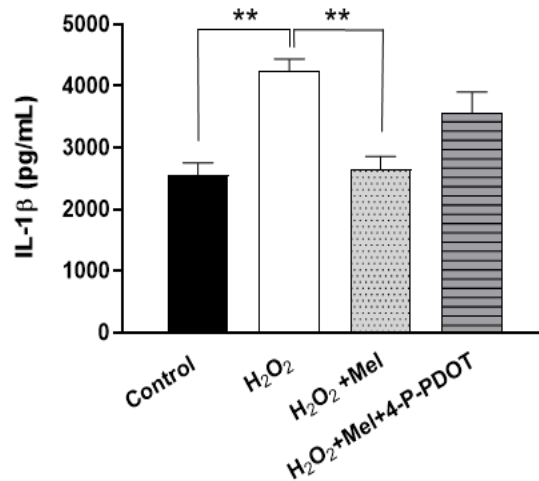


Figura 33. Concentración de la proteína IL-1β en células HLE-B3 expuestas a H₂O₂ en ausencia o presencia de melatonina.

Mediante ELISA se analizó la concentración de la proteína IL-1β (pg/mL) en los lisados celulares de células expuestas a H₂O₂ (350 μM), a H₂O₂ con melatonina (100 μM) y a H₂O₂ con melatonina y 4-P-PDOT (100 μM), además de su respectivo control. La gráfica refleja los valores de la media ± SD. ** p < 0.01, (n = 3).

9.2. REGULACIÓN POR MELATONINA DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LAS CÉLULAS HLE-B3 TRATADAS CON LUZ LED BLANCA

De la misma manera que en las células expuestas a estrés oxidativo con H₂O₂, se estudió la expresión de la proteína NLRP3, así como los niveles proteicos de caspasa-1 en células estresadas con la radiación lumínica (Figura 34).

En el caso de las células expuestas exclusivamente a la luz LED blanca, se observó una subida estadísticamente significativa de los niveles de la proteína NLRP3 respecto a las muestras en oscuridad (control) (p < 0.05) (Figura 34B), los cuales disminuyeron significativamente al pretratar las células HLE-B3 con melatonina exógena, hasta llegar a valores similares a los del control (p < 0.05) (Figura 34B). La incubación con el antagonista de los receptores de melatonina 4-P-PDOT, 30 minutos antes de la adición de la melatonina, bloqueó el efecto de esta neurohormona apreciándose de nuevo un aumento de la proteína NLRP3 en estas condiciones (Figura 34B).

Se analizaron también los niveles proteicos de la subunidad p20 de la proteína caspasa-1, los cuales aumentaron en condiciones de estrés, en este caso provocado por exposición a luz LED blanca durante dos horas (Figura 34C). El

pretratamiento con melatonina antes de estresar a las células con luz LED blanca impidió el incremento en la expresión proteica de caspasa-1 activa, efecto que fue nuevamente revertido por 4-P-PDOT (Figura 34C). Las tendencias en los cambios son similares a las que se observaron en los experimentos con H_2O_2 , pero en este caso no llega a haber diferencias estadísticamente significativas.

Con respecto a la concentración proteica de IL-1 β , al igual que ocurría con el tratamiento con H_2O_2 , la concentración de esta citoquina proinflamatoria se incrementó 1.86 veces tras la exposición a luz LED blanca con respecto al control ($p < 0.05$) (Figura 35). Asimismo, el pretratamiento con melatonina evitó este incremento ($p < 0.05$) (Figura 35) y este efecto de la melatonina sobre la concentración de IL-1 β fue revertido por el antagonista 4-P-PDOT (Figura 35).

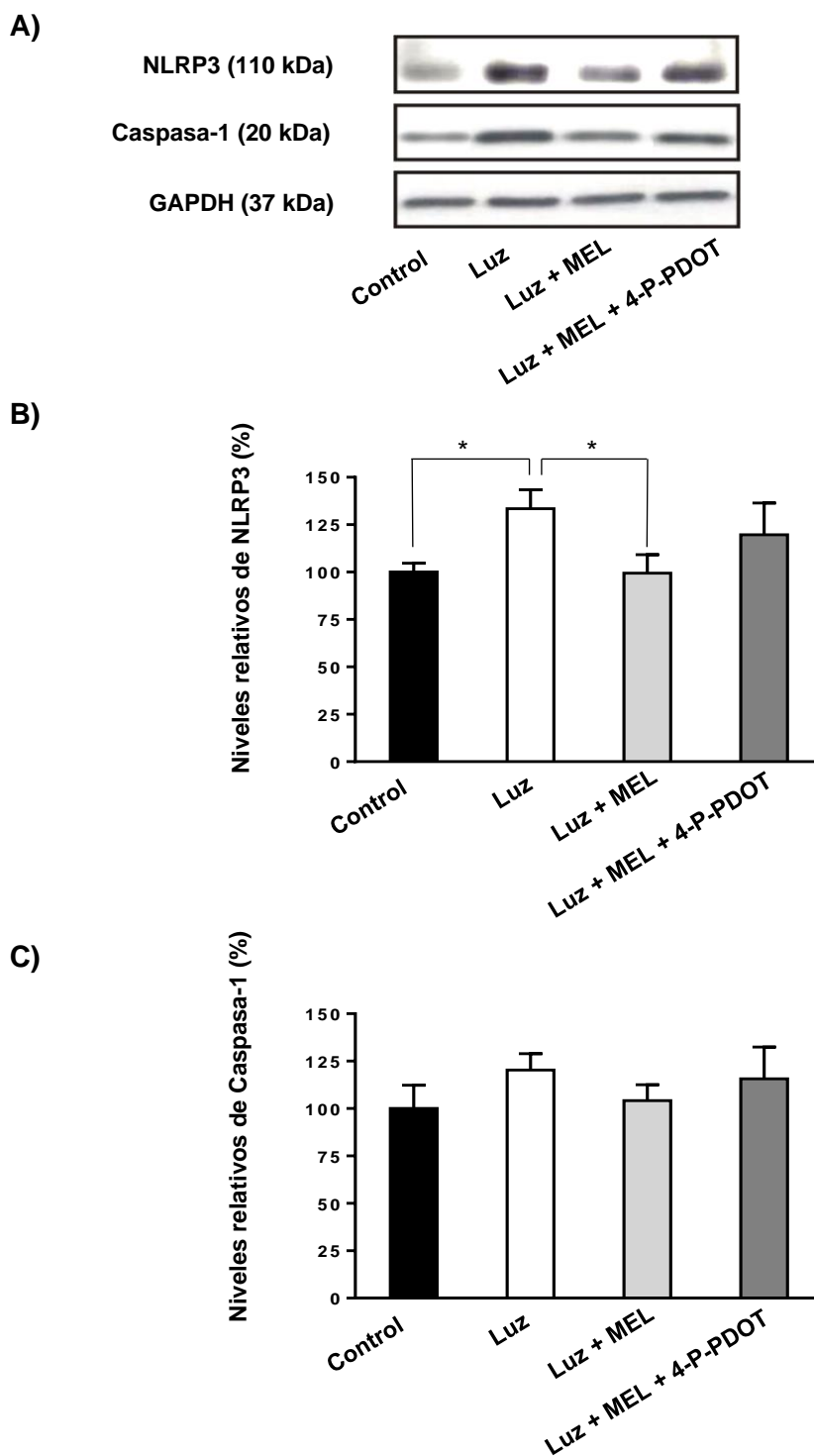


Figura 34. Niveles de NLRP3 y caspasa-1 en células HLE-B3 estresadas con luz en ausencia o presencia de melatonina.

Las células del epitelio del cristalino humano fueron expuestas a diferentes condiciones lumínicas: luz LED blanca sin otro tratamiento y luz LED blanca con un pretratamiento de melatonina (100 μ M) durante 24 horas sin y con la adición de un antagonista de los receptores de melatonina (4-P-PDOT, 100 μ M) 30 minutos antes de la adición de melatonina. A) Se muestran imágenes representativas de las bandas de los western blots obtenidas con los anticuerpos para NLRP3, caspasa-1, así como para GAPDH (control de carga). Se representan los niveles relativos de la proteína NLRP3 (B) y caspasa-1 (C) en los diferentes histogramas. Los datos mostrados se expresan según su media \pm SD. * $p < 0.05$, (n=3).

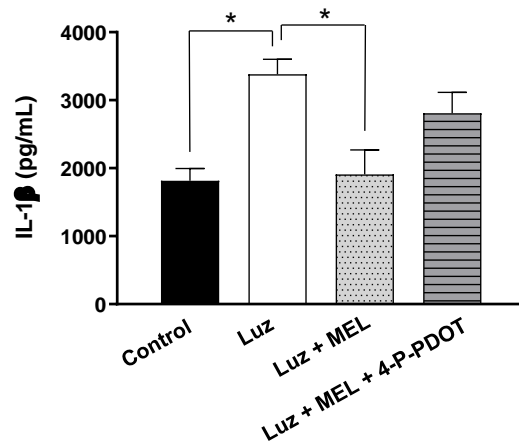


Figura 35. Concentración de la proteína IL-1 β en células HLE-B3 expuestas a luz en ausencia o presencia de melatonina.

Mediante ELISA se analizó la concentración de la proteína IL-1 β (pg/mL) en los lisados celulares de células expuestas a luz LED blanca, a la misma luz con melatonina (100 μ M) y a la luz con melatonina y 4-P-PDOT (100 μ M), además de su respectivo control. La gráfica refleja los valores de la media \pm SD. * $p < 0.05$, ($n = 3$).

10. MODULACIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA POR LA ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS HLE-B3 TRATADAS CON H₂O₂

Estudios recientes han evidenciado que el estrés oxidativo inducido por la exposición a H₂O₂ induce el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Y. Li et al., 2019). Como se describió en la introducción, este proceso está implicado en la formación de cataratas fibróticas como las que se originan al producirse opacificación capsular posterior (PCO). Dada la importancia de la EMT en el desarrollo de la catarata fibrótica, se analizó si el tratamiento con melatonina podría modular el proceso de transición epitelio-mesénquima inducido por la exposición a H₂O₂. Con este fin, se examinó mediante estudios de western blot la expresión de marcadores de tipo epitelial tales como E-cadherina, ZO-1, y ocludina, así como marcadores mesenquimales como Snail y N-cadherina en células HLE-B3 expuestas a H₂O₂ sin y con pretratamiento previo de 24 horas con melatonina (Figura 36).

La exposición a H₂O₂ ocasionó una disminución de los niveles relativos de las proteínas que son marcadores epiteliales, concretamente la reducción observada para E-cadherina, ZO-1 y ocludina fue del 51%, 61% y 67% respectivamente, respecto al control (* p < 0.05, ** p < 0.01) (Figura 36B, C y D). Los marcadores mesenquimales Snail y N-cadherina mostraron una tendencia opuesta (Figura 36E y F), aumentando sus niveles con la exposición a H₂O₂, siendo 3.52 veces mayor respecto al control en el caso de la proteína Snail (p < 0.01) y 1.32 veces para N-cadherina, no alcanzando este último cambio con significancia estadística. El pretratamiento de melatonina exógena, durante las 24 horas previas a la adición de peróxido de hidrógeno, permitió el retorno hacia niveles proteicos similares a los que presentaban las células control no expuestas a estrés oxidativo, recuperándose los niveles proteicos de los marcadores de tipo epitelial (E-cadherina, ZO-1 y ocludina) (Figura 36B, C y D) y descendiendo la expresión proteica de Snail y N-cadherina (Figura 36E y F).

Se ha demostrado en estudios previos que la ruta de señalización celular JNK está implicada en la inducción de EMT por H₂O₂ (Y. Li et al., 2019), por lo que se

investigó si la acción de la melatonina sobre el proceso de EMT estaba relacionada con la modulación de dicha ruta (Figura 36G y H). La exposición a H_2O_2 incrementó 1.72 veces los niveles de fosforilación de JNK1/2 con respecto al control ($p < 0.01$) mientras que el tratamiento con melatonina redujo la activación de JNK detectándose unos niveles fosforilados de JNK1/2 semejantes a los del control ($p < 0.05$ respecto a H_2O_2) (Figura 36H).

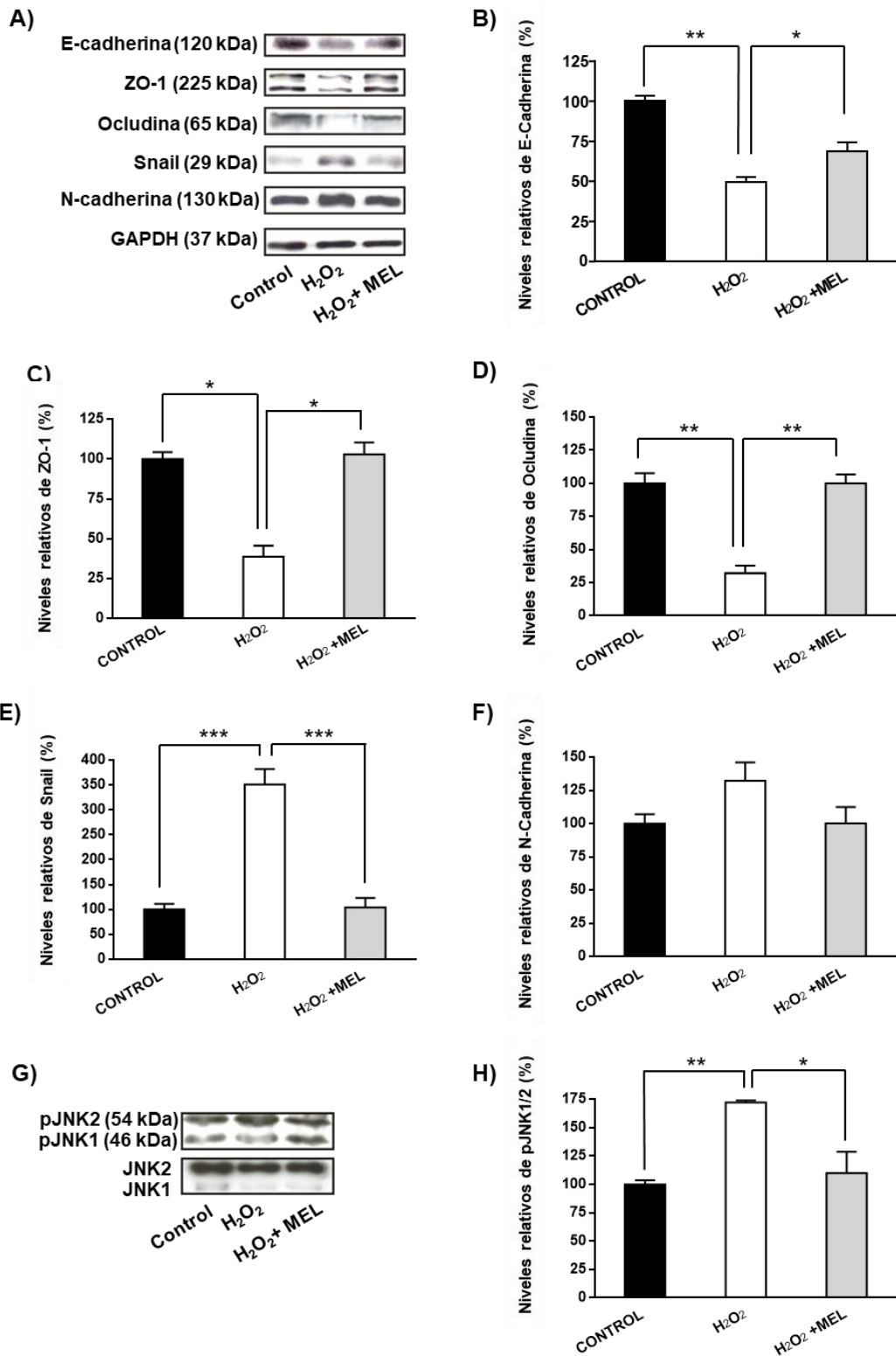


Figura 36 Análisis de la expresión proteica de marcadores epiteliales y mesenquimales y cascada de señalización JNK en las células del epitelio de cristalino humano expuestas a H₂O₂ sin y con melatonina. A) Imágenes representativas de las bandas de los western blots empleando anticuerpos frente a marcadores epiteliales y mesenquimales usando como control de carga GAPDH. B-F) Histogramas representando los niveles de relativos de cada proteína examinada. G-H) Bandas proteicas del western blot con anticuerpos frente a pJNK1/2 y JNK1/2 (control de carga) y su respectivo histograma. Todos los datos están normalizados y representados en porcentaje en función de las células control consideradas como el 100%. Los valores corresponden a la media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ($n = 3$).

11. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA Y 6-HIDROXIMELATONINA EN EL HUMOR ACUOSO DE PACIENTES CON CATARATAS

A pesar de la importancia que puede tener la melatonina en patologías oculares donde el estrés oxidativo tiene un papel relevante tales como las cataratas, no existen apenas estudios sobre los posibles cambios en la concentración ocular de esta neurohormona y de su principal producto degradativo, la 6-hidroximelatonina. Para evaluar estos posibles cambios, se midieron los niveles de melatonina y 6-hidroximelatonina en los humores acuosos de pacientes sin y con cataratas mediante ELISA. Los pacientes control fueron pacientes operados de cirugía refractiva cuyo cristalino permanecía transparente. Por otra parte, se dividió el grupo de pacientes operados de cataratas en pacientes no diabéticos y los que presentaban diabetes mellitus. En la Tabla 12 se detallan las características demográficas de todos los pacientes incluidos en el estudio así como un resumen de los valores de concentración obtenidos, los cuales se detallan y comentan a continuación (Figuras 37 y 38).

Parámetros	Total	Control	Cataratas	Cataratas diabéticas
N.º de pacientes	36	12	12	12
Media (años) ± SD	60.89 ± 16.43	49.3 ± 11.84	62.5 ± 13.53	74.67 ± 8.184
Rango de edad (años)	[24, 91]	[24, 51]	[41, 89]	[62, 91]
Género (Masculino/femenino)	[21, 15]	[4, 8]	[8, 4]	[9, 3]
Niveles de melatonina [ng/mL]	2.901 ± 2.116	4.437 ± 2.470	2.601 ± 1.767	1.665 ± 0.8246
Niveles de 6-hidroximelatonina [pg/mL]	37.426 ± 10.729	50.740 ± 12.312	38.757 ± 10.762	22.781 ± 9.114

Tabla 11. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio y valores de concentración obtenidos para melatonina y 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de los mismos.

Como podemos apreciar en la Figura 37, la concentración de melatonina en el humor acuoso de los pacientes con opacificaciones en el cristalino fue estadísticamente menor que en los pacientes control ($p < 0.05$), existiendo una disminución de alrededor del 40% pasando de valores de melatonina de 4.437 ± 2.470 ng/mL en sujetos control a una concentración de 2.601 ± 1.767 ng/mL en pacientes con catarata no diabética (Figura 37). En los pacientes con catarata

diabética se observaron niveles de melatonina aún más inferiores (1.665 ± 0.825 ng/mL) ($p < 0.01$) en comparación con los valores mostrados por los sujetos con el cristalino transparente (4.437 ± 2.470 ng/mL), implicando una reducción en la concentración de melatonina de hasta el 60% en este caso (Figura 37).

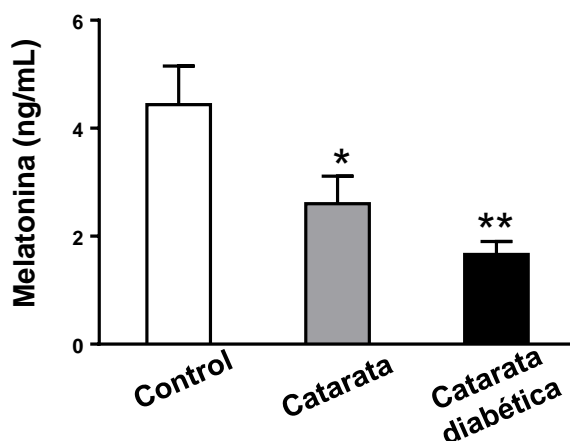


Figura 37. Concentración de melatonina en el humor acuoso de sujetos control y pacientes con cataratas. Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ambos en comparación al control ($n = 12$).

Se examinó también la concentración del producto degradativo de la melatonina (6-hidroximelatonina) en los humores acuosos de los mismos pacientes (Figura 38). Al igual que ocurría con la concentración de melatonina, los pacientes del grupo control cuyos cristalinicos permanecían transparentes fueron los que dieron valores más altos para la 6-hidroximelatonina (50.740 ± 12.312 pg/mL). Los dos grupos de pacientes con cataratas mostraron, por tanto, niveles más bajos de 6-hidroximelatonina, aunque los pacientes con catarata no diabética no presentaron diferencias significativas (38.757 ± 10.762 pg/mL) a diferencia del grupo con *diabetes mellitus* (22.781 ± 9.114 pg/mL), donde si encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

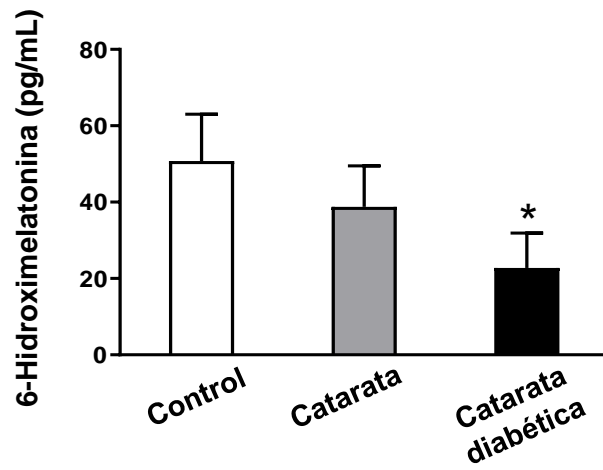


Figura 38. Concentración de 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de sujetos control y pacientes con cataratas.

Los sujetos de estudios se dividieron en tres grupos: pacientes con el cristalino transparente (control), pacientes con catarata no diabética y pacientes diabéticos con cataratas. Se muestran los datos como la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$; en comparación con el grupo control ($n = 12$).

12. ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO DEL CRISTALINO HUMANO

Considerando el efecto protector observado para la melatonina aplicada de manera exógena, nos planteamos el uso de un filtro amarillo para inducir la liberación endógena de melatonina y analizar su potencial efecto protector sobre las células HLE-B3 expuestas a estrés oxidativo inducido por luz LED blanca. El filtro amarillo empleado se caracteriza por presentar absorbancia entre 400-500 nm, exhibiendo un pico máximo a 440 nm, por lo que absorbe fundamentalmente luz de longitud de onda corta (luz azul) lo que debería permitir antagonizar el efecto inhibitorio de la melanopsina (identificada en el cristalino) sobre la regulación de la secreción de melatonina.

12.1. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA Y 6-HIDROXIMELATONINA EN LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA CON UN FILTRO AMARILLO

Se analizó la concentración de melatonina en los medios condicionados de las células expuestas a diferentes condiciones de luz (Figura 39). Los resultados obtenidos mediante ELISA revelaron unos niveles de melatonina inferiores en las células expuestas a luz LED blanca durante dos horas en comparación con el control que se mantuvo en oscuridad durante el mismo tiempo, concretamente se produjo una reducción del 57% en la producción de melatonina durante ese período con diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$) (Figura 39). Por el contrario, al interponer un filtro amarillo, que bloquea las longitudes de onda corta, a las células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca, se detectó un aumento de 1.7 veces en la liberación de melatonina en el medio respecto a las células expuestas a la luz LED sin filtro (Figura 39).

Con el fin de determinar, si el descenso en la liberación de melatonina era debido a una disminución en su síntesis, a un incremento en su degradación, o incluso era resultado de la combinación de ambos procesos, se analizó el producto degradativo de la melatonina, 6-hidroximelatonina, en los medios condicionados de las células epiteliales del cristalino humano sometidas a

diferentes condiciones de luz. Las células HLE-B3 estuvieron bajo condiciones de oscuridad, luz LED blanca o cubiertas con un filtro amarillo con la misma iluminación, durante dos horas. El resultado de estos experimentos se muestra en la Figura 40.

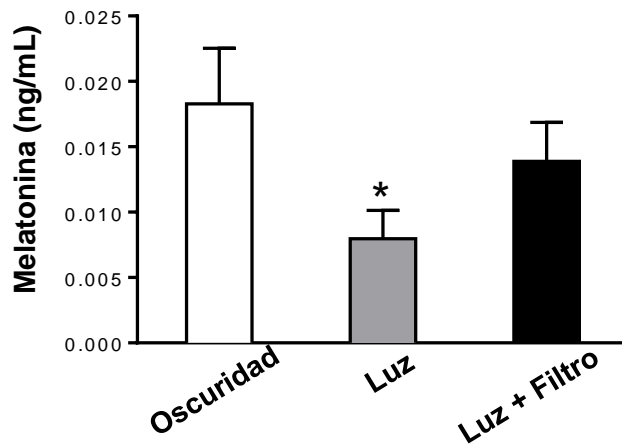


Figura 39. Concentración de melatonina en los medios condicionados de las células HLE-B3 expuestas a las diferentes condiciones lumínicas

El medio celular fue recogido tras exponer a las células a diferentes condiciones de luz durante 2 horas (en oscuridad, luz LED blanca, y con la misma luz interponiendo un filtro amarillo). Posteriormente se realizó un ensayo de ELISA para valorar la concentración de melatonina. Datos expresados como la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ en comparación con el control. ($n = 3$).

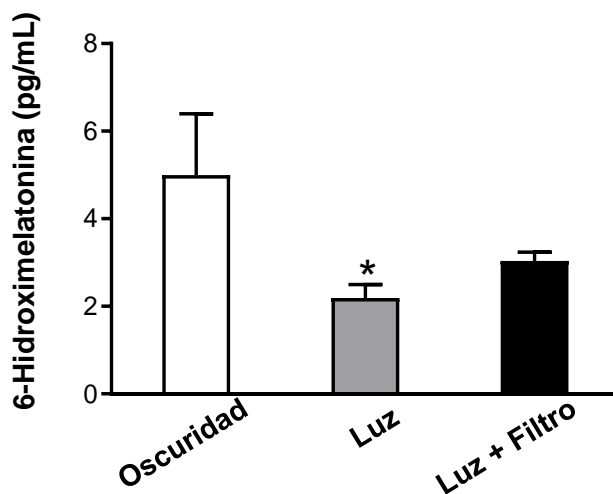


Figura 40. Concentración de 6-hidroximelatonina en los medios condicionados de las células del epitelio del cristalino humano expuestas a las diferentes condiciones lumínicas.

Las células fueron expuestas durante 2 horas a oscuridad y luz LED blanca con y sin filtro amarillo. La concentración de 6-hidroximelatonina se examinó mediante ELISA. Datos expresados como la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ en comparación con el control en oscuridad. ($n = 3$).

En el histograma de la Figura 40 se aprecia una disminución estadísticamente significativa de los niveles de la 6-hidroximelatonina en condiciones de luz sin filtro (2.193 ± 0.302 pg/mL) en comparación con las muestras control mantenidas en oscuridad donde se obtuvieron valores más altos (4.994 ± 1.404 pg/mL) ($p < 0.05$). En el caso de los medios condicionados de las células que habían estado bajo la luz LED blanca en presencia del filtro amarillo también se observó una reducción de la concentración del producto oxidativo de la melatonina, pero en esta ocasión sin llegar a alcanzar significancia estadística (3.037 ± 0.199 pg/mL) (Figura 40).

12.2. MODULACIÓN DE LAS ENZIMAS BIOSINTÉTICAS DE LA MELATONINA MEDIANTE UN FILTRO AMARILLO EN LAS CÉLULAS HEL-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Los resultados obtenidos al medir la concentración de melatonina y 6-hidroximelatonina en los medios condicionados celulares sugerían que el descenso en la secreción de melatonina estaba principalmente relacionado con una posible supresión de su síntesis por la luz. Por ello, se evaluó si la exposición a luz LED blanca modificaba la expresión proteica de enzimas claves en la biosíntesis de esta neurohormona. Para ello, las células HLE-B3 fueron expuestas durante 2 horas a oscuridad, a luz LED blanca o a la misma luz interponiendo un filtro amarillo y se procedió a realizar estudios de inmunotransferencia para cuantificar los niveles proteicos de las enzimas biosintéticas AANAT (basal y fosforilada) y HIOMT (Figura 41).

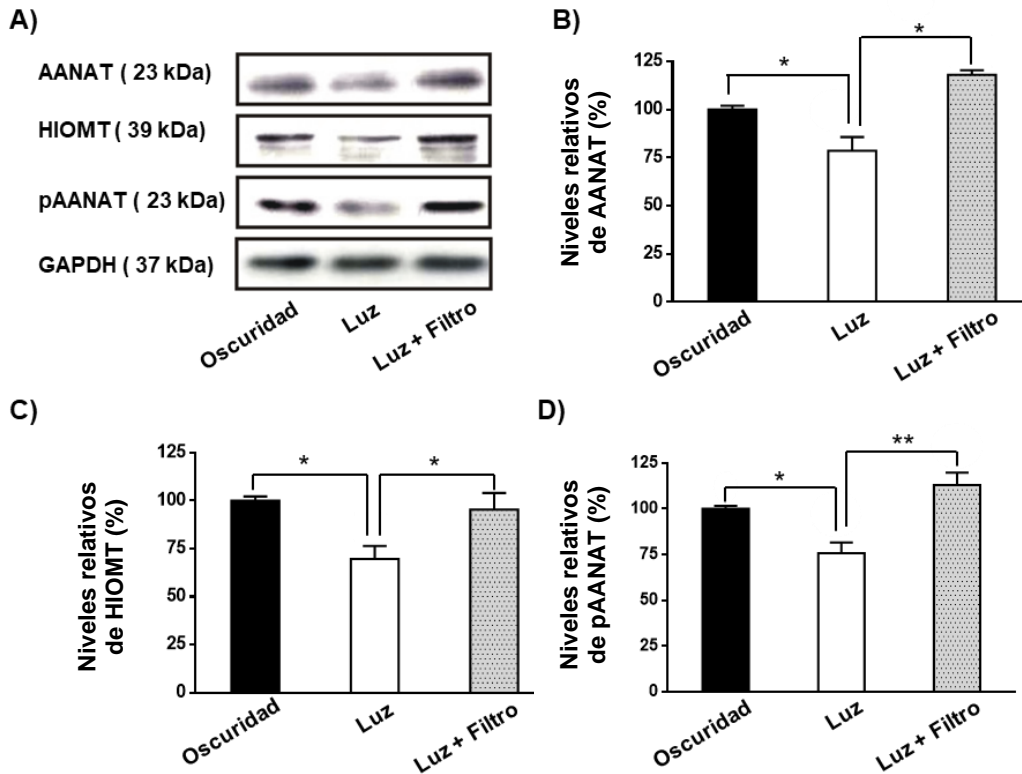


Figura 41. Expresión proteica de AANAT, HIOMT y pAANAT en las células del epitelio humano del cristalino expuestas a las distintas condiciones lumínicas.

Se cuantificaron los niveles de las enzimas biosintéticas de la melatonina mediante western blot utilizando GAPDH como control de carga. A) Bandas representativas de los western blots realizados a partir de las muestras celulares en oscuridad, luz LED blanca y la misma luz con filtro amarillo. Los niveles de proteínas están normalizados y representados en porcentaje en función de las células control (en oscuridad). B) AANAT. C) HIOMT. D) pAANAT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ($n = 3$).

Los niveles de las enzimas involucradas en la síntesis de melatonina se vieron reducidos en un 22% (AANAT), 31% (HIMOT) y 25% (pAANAT) al exponer a las células a la luz LED blanca en comparación a las células control ($p < 0.05$) (Figura 41). El filtro amarillo, por el contrario, previno la disminución de la expresión proteica de las enzimas responsables de la síntesis de melatonina inducida por la luz LED blanca dando unos resultados sin diferencias estadísticamente significativas frente a las células mantenidas en oscuridad (Figura 41). Estos resultados confirmaron que el descenso en la liberación de melatonina tras la exposición a luz LED blanca era debido a la reducción en la expresión proteica de las enzimas que biosintetizan la neurohormona. Dicha reducción pudo ser impedida con el uso del filtro amarillo.

12.3.EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA PRODUCCIÓN DE ROS EN CÉLULAS HEL-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

La producción de especies reactivas de oxígeno fue evaluada mediante ensayos fluorimétricos en células del epitelio del cristalino humano expuestas durante 2 horas a diferentes condiciones de luz LED blanca (Figura 42).

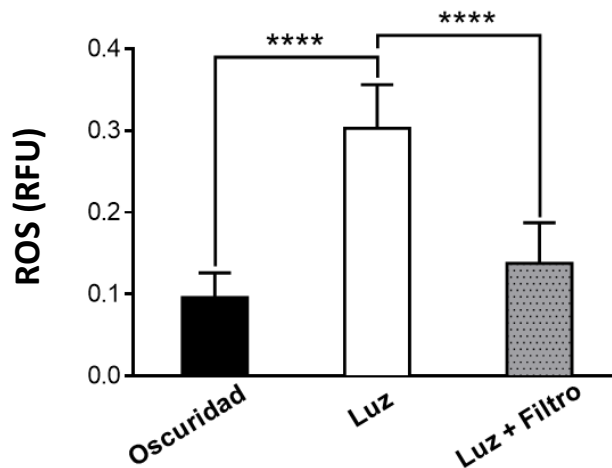


Figura 42. Niveles de ROS en las células HLE-B3 bajo diferentes condiciones lumínicas. Análisis fluorimétrico en células HLE-B3 de los niveles de ROS en condiciones de oscuridad y luz LED blanca (sin y con filtro amarillo). Histograma representado los valores de ROS como la media \pm su desviación estándar. **** $p < 0.0001$, ($n = 6$).

Los niveles de ROS se triplicaron al exponer a las células HLE-B3 a la luz LED blanca en comparación con el control en oscuridad ($p < 0.0001$) (Figura 42). Al interponer el filtro amarillo éste impidió el aumento en la generación de ROS dando diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$) frente a los experimentos con luz LED blanca sin filtro. En cambio, entre las células en condiciones de oscuridad y luz LED blanca con filtro no hubo diferencias significativas (Figura 42).

12.4.EFECTO PROTECTOR DEL FILTRO AMARILLO EN LA VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS HEL-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Se evaluó la viabilidad celular de las células del epitelio de cristalino humano sometidas a estrés oxidativo provocado por la exposición a luz LED blanca en comparación con su control en oscuridad y la utilización de un filtro amarillo durante la exposición a la luz. Para ello se realizaron ensayos de MTT (Figura 43).

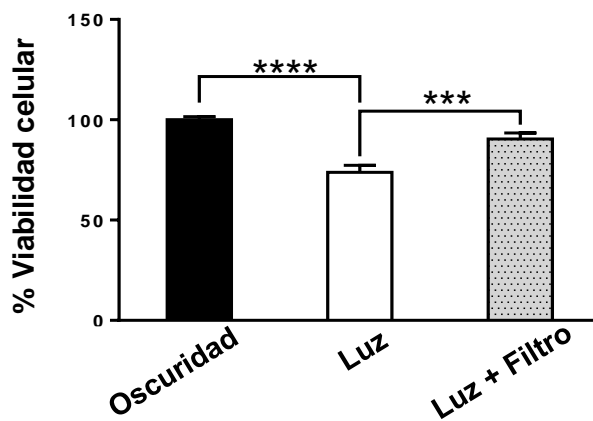


Figura 43. Efecto de las diferentes condiciones de luz en la viabilidad celular de las células HLE-B3. Se determinó mediante ensayos de MTT la viabilidad de las células HLE-B3 bajo diferentes condiciones de luz (oscuridad, luz LED blanca o luz LED blanca con filtro amarillo). Los datos mostrados corresponden a los porcentajes considerando el control en oscuridad como el 100%. Se muestra la media \pm SD. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, (n=9).

Como se muestra en la Figura 43, la viabilidad celular decreció en un 30% al inducir fototoxicidad en las células HLE-B3 mediante la exposición a luz LED blanca (**** $p < 0.0001$). La inclusión de un filtro amarillo sirvió como protección ante los efectos citotóxicos de la luz, impidiendo la muerte celular y aumentando por tanto la viabilidad de las células HLE-B3 respecto a las condiciones de tratamiento con luz LED blanca, obteniéndose diferencias estadísticamente muy significativas entre ambas (***) $p < 0.001$ (Figura 43).

12.5. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA NRF2 MEDIANTE EL USO DEL FILTRO AMARILLO EN LAS CÉLULAS HEL-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Los cambios proteicos en el sistema antioxidante inducible Nrf2 también se analizaron en células HLE-B3 en condiciones de oscuridad y luz (sin y con filtro amarillo), así como en ausencia o en presencia de antagonistas de los receptores de melatonina (Figura 44).

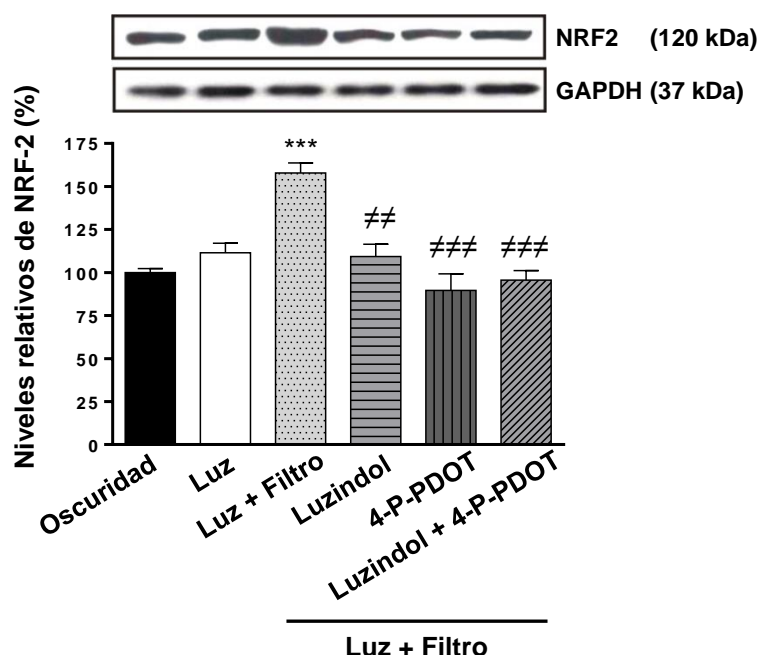


Figura 44. Niveles de la proteína Nrf2 en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz. Las células fueron expuestas a oscuridad, luz LED blanca y a la misma luz bajo un filtro amarillo sin y con la adición de antagonistas de los receptores de melatonina (luzindol, 4-P-PDOT y una mezcla de ambos, a 100 μ M). Se realizaron western blots con el anticuerpo anti-Nrf2, siendo utilizado GAPDH como control de carga. La gráfica representa la media \pm desviación estándar de los niveles relativos de la proteína Nrf2 expresados en porcentajes normalizados considerando el 100% la muestra en oscuridad. *** $p < 0.001$ frente a la luz LED blanca y a la oscuridad. # $p < 0.01$ y ## $p < 0.001$ comparado con la luz LED blanca con filtro amarillo, ($n=3$).

Los resultados obtenidos revelaron que los niveles de la proteína Nrf2 eran ligeramente más altos en las células mantenidas durante 2 horas en luz LED blanca respecto a las que permanecieron en oscuridad, pero no hubo diferencias estadísticamente significantes entre ambos tratamientos (Figura 44). En cambio, se observó un aumento del 46% en los niveles de Nrf2 en las células expuestas a la luz LED blanca junto con el filtro amarillo respecto a las muestras sin filtro y con la luz LED ($p < 0.001$). Además, la adición de los antagonistas de los receptores de melatonina evitó el aumento en la expresión proteica de Nrf2

provocado por el filtro amarillo. El pretratamiento con un antagonista específico de MT_2 (4-P-PDOT) contrarrestó en mayor medida el efecto del filtro amarillo sobre los niveles proteicos de Nrf2 usado tanto solo como en combinación con el luzindol ($p < 0.001$) en comparación con la bajada en los niveles de Nrf2 que se produjo al tratar a las células únicamente con el antagonista no selectivo de los receptores de melatonina (luzindol) ($p < 0.01$) (Figura 44). Estos hallazgos sugirieron que el aumento de la secreción de melatonina provocado por el filtro amarillo puede favorecer la expresión proteica de Nrf2, principalmente a través de la activación del receptor de melatonina MT_2 .

12.6. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA ACTIVIDAD DE LA SOD DE LAS CÉLULAS HLE-B3 EXPUESTAS A LUZ LED BLANCA

Dado que la proteína Nrf2 puede promover la expresión de la enzima antioxidante SOD, se estudió la actividad de dicha enzima en las células HLE-B3 sometidas a las distintas condiciones de iluminación (Figura 45).

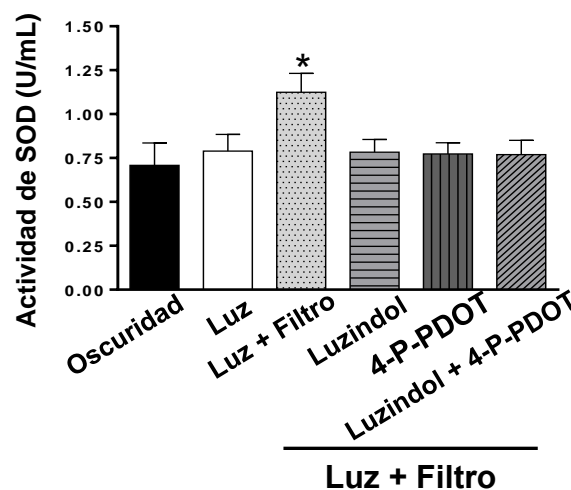



Figura 45. Actividad de la SOD en células HLE-B3 expuestas a diferentes condiciones de luz. Histograma representando la actividad de la enzima SOD (U/mL) en los lisados de las células expuestas a dos horas de oscuridad, luz LED blanca o luz LED blanca con filtro amarillo sin y con antagonistas de los receptores de melatonina (luzindol y 4-P-PDOT, ambos $100 \mu M$). Los datos muestran la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ frente a las condiciones de oscuridad, ($n=3$).



En consonancia con los resultados de los valores proteicos de Nrf2, previamente comentados, se determinó un incremento estadísticamente significativo de la actividad de la SOD ($p < 0.05$) en presencia del filtro amarillo (Figura 45). Los antagonistas de los receptores de la melatonina (luzindol y 4-P-PDOT) impidieron la subida de la actividad de la SOD (Figura 45). Por tanto, la liberación de melatonina debida al filtro amarillo está involucrada tanto en la regulación de la expresión proteica del factor de transcripción Nrf2 como en la activación de enzimas antioxidantes como la SOD.

13. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN UN MODELO ANIMAL DE CATARATA DIABÉTICA

13.1. DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL DE CATARATA DIABÉTICA

13.1.1. Determinación de los Niveles de Glucosa en el Modelo Animal Diabético

Como ya mencionamos en el apartado de Material y Métodos, se midieron los niveles de glucosa de los conejos una vez a la semana en los animales cuya diabetes había sido inducida mediante una inyección de aloxano. También se registró la glucosa de los conejos del grupo control el primer día de toma de las medidas. Concretamente, se comenzó a medir con un glucómetro la concentración de glucosa en sangre tras la primera semana desde la inyección del inductor de la diabetes, justo al observar unos altos niveles de glucosa en la orina de los animales diabéticos (evaluados mediante tiras colorimétricas). Los valores medios obtenidos se muestran en la Figura 46. Mientras los conejos control presentaron valores de 117 ± 11.84 de glucosa, la concentración de ésta se elevó hasta 482.80 ± 72.06 en los conejos diabéticos.

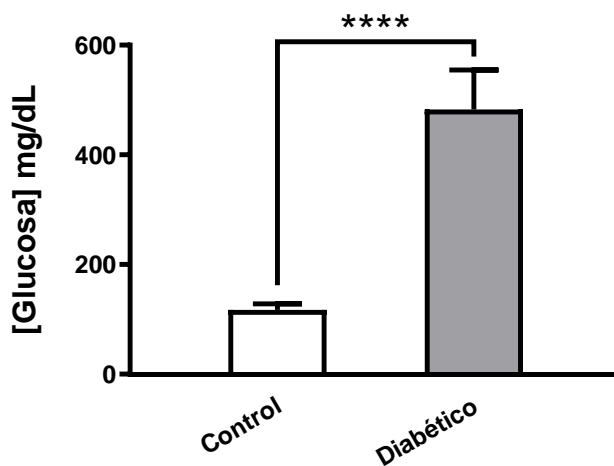


Figura 46. Comparación de los niveles de glucosa en sangre entre conejos control y conejos con diabetes inducida experimentalmente por inyección de aloxano.

Los valores se muestran como la media \pm la desviación estándar. **** $p < 0.0001$.

13.1.2. Evaluación del Desarrollo de Cataratas en el Modelo Animal Diabético

Los cristalinos de los conejos fueron evaluados mediante observación a través de la lámpara de hendidura o biomicroscopio. Se realizó una primera toma de imágenes a la semana de la inyección con aloxano (indicado como “antes” en la Figura 47) y las fotografías adicionales tras 13 semanas (indicado como “después” en la Figura 47). Asimismo, transcurridas 15 semanas, se fotografiaron los cristalinos enucleados sobre un papel milimetrado (Figura 47).

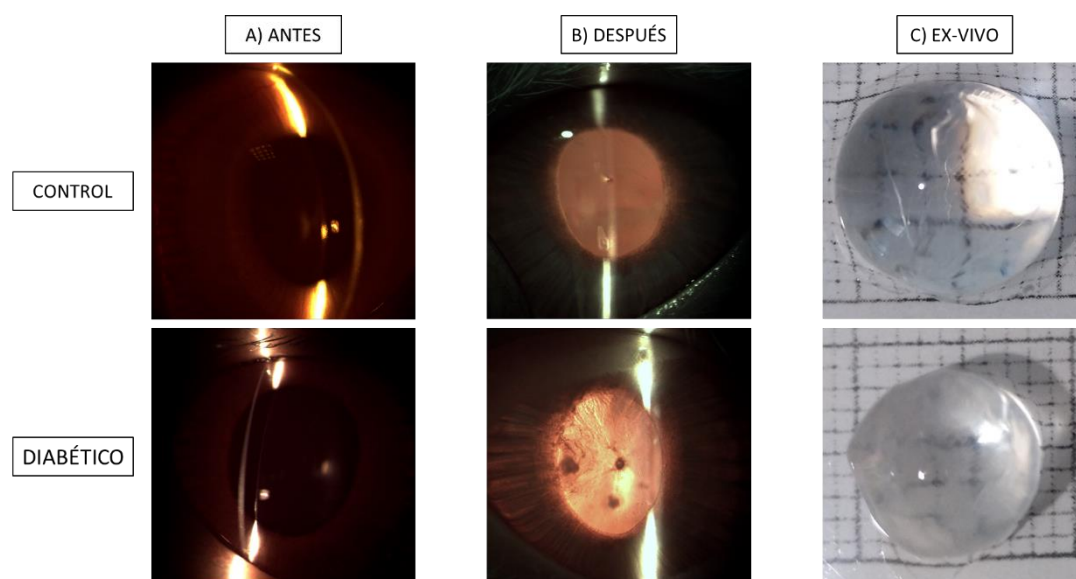


Figura 47. Fotografías del cristalino de los conejos control y diabéticos. Se muestran imágenes representativas del cristalino de los conejos control y diabéticos transcurridas 1 semana desde la inyección de aloxano (“antes”) y 13 semanas (“después”). A) Sección óptica del cristalino tomada mediante iluminación directa. B) Imágenes de las opacidades del cristalino captadas mediante retroiluminación indirecta. C) Fotografías del cristalino enucleado post-mortem.

En las primeras imágenes (Figura 47A) se enfocó el epitelio del cristalino de los conejos a través de una sección óptica con iluminación directa, observando la nitidez y transparencia de la lente tanto en los conejos control como en los animales con diabetes inducida tras una semana desde la inyección de aloxano. En las fotografías tomadas con el biomicroscopio en la Figura 47B se apreció un gran cambio entre los cristalinos de ambos conejos. Las dos imágenes fueron captadas en condiciones de retroiluminación ya que permitía observar mejor la totalidad del estado del cristalino, distinguiendo claramente opacidades en el

cristalino de los conejos diabéticos a diferencia de aquellos sin la patología. Finalmente, en la Figura 47C se pudo observar que el cristalino de los conejos control mantiene una mayor transparencia y tamaño en comparación con el cristalino del conejo diabético, confirmando el proceso de cataratogénesis provocado por la hiperglucemia inducida.

13.1.3. Medida del Peso en el Modelo Animal Diabético

Se analizó el peso de los conejos a lo largo de las semanas de experimentación (Figura 48), incluyéndose en el seguimiento a los conejos control, conejos diabéticos así como los conejos diabéticos que permanecían en presencia de un filtro amarillo. Su peso fue en aumento a lo largo del tiempo a medida que crecían. Se encontraron cambios estadísticamente significativos al comparar el grupo control con el grupo con diabetes inducida mediante inyección de aloxano ($p < 0.01$), detectándose una disminución del peso en éstos últimos (Figura 48).

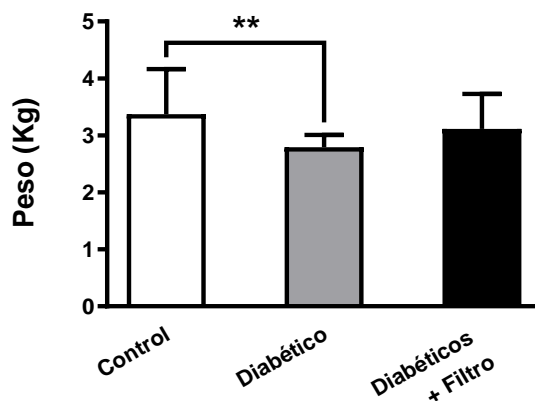


Figura 48. *Determinación del peso en los animales de experimentación.* Histograma representando el peso medio de los conejos registrado durante el desarrollo del modelo animal diabético. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo diabético, cuyos conejos perdieron peso. ** $p < 0.01$, ($n = 24$).

13.1.4. Efecto del Filtro Amarillo en la Refracción del Modelo Animal con Catarata Diabética

Se les realizó un examen refractivo objetivo a los conejos usados como modelo experimental (Figura 49). Se estudiaron el grupo control, el grupo con diabetes inducida y el grupo con diabetes inducida que permanecía en presencia de un filtro amarillo. Se buscó neutralizar el movimiento de las sombras pupilares con las reglas de esquiascopía tras iluminar los ojos mediante el retinoscopio, se anotaron los resultados teniendo en cuenta la distancia del brazo del examinador (0.66 cm).

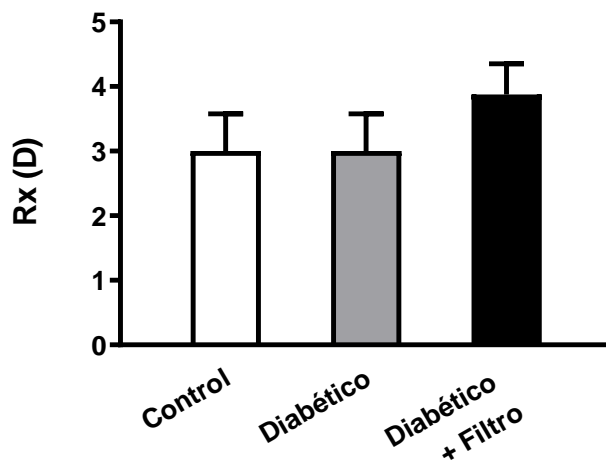


Figura 49. Refracción de los animales experimentales. Se realizó retinoscopía con reglas de esquiascopía en los diferentes grupos de animales. Se muestra la media \pm la desviación típica, (n = 4).

El resultado del defecto refractivo obtenido se recoge en el histograma de la Figura 49. Todos los conejos dieron valores hipertrópicos y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, si bien los animales con valores de glucosa alterados y tratados con filtro amarillo presentaron valores algo más altos de hipermetropía.

13.2. NIVELES DE MELATONINA EN UN MODELO ANIMAL DE CATARATA DIABÉTICA

Se analizó la concentración de melatonina en el humor acuoso del modelo animal con diabetes inducida comparándolo con animales no tratados (control) así como con conejos diabéticos ubicados en una caja con un filtro amarillo que recubría las jaulas, todos ellos expuestos a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Figura 50).

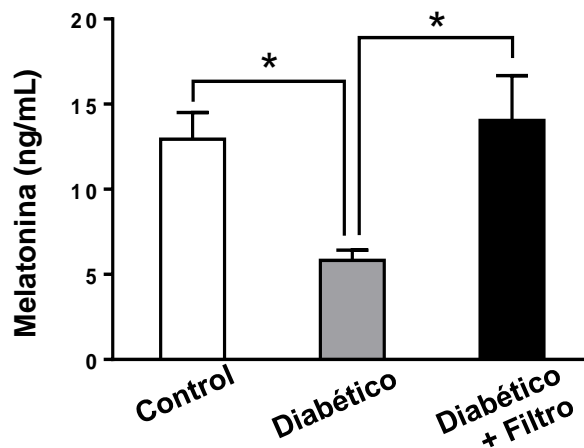


Figura 50. Concentración de melatonina en el humor acuoso del modelo animal de catarata diabética. Mediante ELISA se midió la concentración de melatonina en el humor acuoso de conejos control y con diabetes inducida sin y con filtro amarillo. Los valores se expresan como la media \pm SD. * $p < 0.05$, ($n = 12$).

Como se puede observar en la Figura 50, la concentración de melatonina fue significativamente menor en los conejos diabéticos (5.817 ± 3.05 ng/mL), tanto al compararlo con el grupo de animales control (12.94 ± 9.17 ng/mL) como con el grupo que habían permanecido bajo el filtro amarillo (14.04 ± 10.21 ng/mL) ($p < 0.05$). Estos resultados señalan la importancia del filtro amarillo en la modulación de la concentración ocular de melatonina.

13.3. MODULACIÓN DE LAS ENZIMAS BIOSINTÉTICAS DE LA MELATONINA MEDIANTE EL FILTRO AMARILLO EN LOS CRISTALINOS DEL MODELO ANIMAL CON CATARATA DIABÉTICA

Teniendo en cuenta el incremento detectado en la concentración de melatonina en los humores acuosos de los conejos diabéticos expuestos al filtro amarillo, se cuantificó la expresión proteica de las enzimas involucradas en la síntesis de la melatonina en los cristalinicos de los conejos previamente lisados tras la enucleación y extracción de la lente. Las muestras analizadas correspondían a animales control, diabéticos (ambos expuestos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y animales que además de haberles provocado la diabetes estuvieron expuestos a la luz en una caja con un filtro amarillo. Los niveles proteicos de AANAT, HIOMT y pAANAT fueron evaluados mediante western blot (Figura 51).

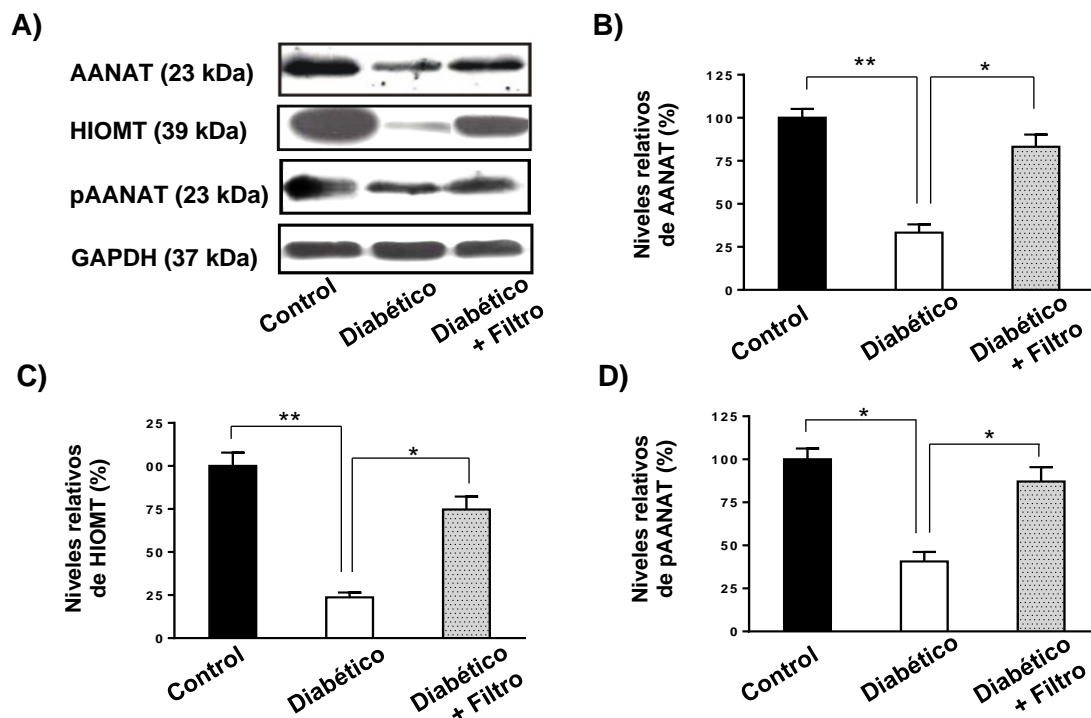


Figura 51. Expresión proteica de las enzimas AANAT, HIOMT y pAANAT en los cristalinicos de los conejos. Análisis de inmunotransferencia de los cristalinicos de los conejos control y conejos con diabetes inducida sin y con la interposición de un filtro amarillo. Se utilizó el GAPDH como control de carga. A) Imágenes representativas de las bandas proteicas obtenidas tras el revelado fotográfico. B) Representación de los niveles proteicos relativos de AANAT. C) Histograma de los niveles proteicos relativos de HIOMT. D) Gráfica de los valores proteicos relativos de la forma fosforilada de AANAT. Se ha representado la media \pm desviación estándar de los porcentajes normalizados considerando como el 100% los valores obtenidos de los cristalinicos control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se observó una disminución en los niveles proteicos de las enzimas involucradas en la síntesis de melatonina en el caso de los cristalinos de los conejos con diabetes inducida experimentalmente (Figura 51). Concretamente, en el caso de AANAT y HIOMT se produjo una reducción del 67% y 76% ($p < 0.01$), respectivamente, y para AANAT fosforilado se encontró una expresión proteica un 59% menor ($p < 0.05$) en comparación con sus correspondientes controles (Figura 51). En cambio, en los conejos diabéticos expuestos al filtro amarillo, la disminución en la expresión proteica de estas enzimas fue claramente inferior: 17% para AANAT, 25% para HIOMT y en el caso de pAANAT la reducción detectada fue del 13%. Estos hallazgos corroboraron la relación entre el descenso en la expresión proteica de las enzimas responsables de la síntesis de melatonina y los inferiores niveles de esta neurohormona hallados en los conejos diabéticos y pusieron de manifiesto la capacidad del filtro amarillo de mantener los niveles proteicos de estas enzimas en valores más próximos al control.

13.4. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS NRF2 Y SOD MEDIANTE EL FILTRO AMARILLO EN LOS CRISTALINOS DEL MODELO ANIMAL DE CATARATA DIABÉTICA

Se evaluó también la expresión de la proteína Nrf2 mediante western blot en los lisados de los cristalinos de los animales de los grupos control, diabético (inducidos con una inyección de aloxano) y animales diabéticos que permanecieron bajo una caja con un filtro amarillo (Figura 52).

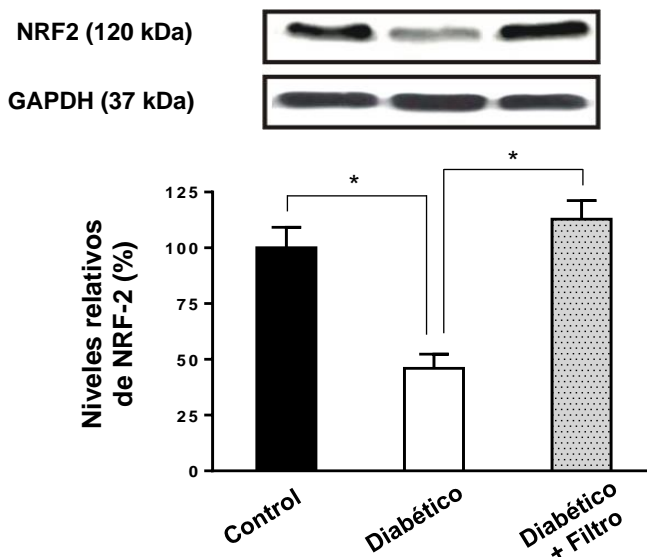


Figura 52. Niveles de la proteína Nrf2 en los cristalinios de los conejos.

Se realizaron estudios de inmunotransferencia con el anticuerpo anti-Nrf2 de las muestras de cristalinios lisados de conejos control, diabéticos y diabéticos bajo un filtro amarillo. Como control de carga se usó GAPDH. La gráfica representa la media \pm SD de los niveles relativos de la proteína Nrf2 expresados en porcentajes normalizados considerando el 100% los valores proteicos de los animales control. * $p < 0.05$, ($n = 3$).

Se determinó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de la proteína Nrf2 en los cristalinios de los conejos con diabetes inducida en comparación con los animales control, concretamente se produjo una disminución del 54% ($p < 0.05$) (Figura 52). En el caso de las muestras de los animales diabéticos bajo el filtro amarillo, se mantuvieron unos niveles proteicos de Nrf2 similares a los del control siendo ligeramente superiores a éstos y significativamente superiores a los niveles presentes en los conejos con diabetes inducida experimentalmente ($p < 0.05$) (Figura 52). Por tanto, el uso del filtro amarillo evitó la reducción de la expresión proteica de Nrf2 en los cristalinios de los conejos diabéticos.

La expresión proteica de la enzima antioxidante SOD también se analizó mediante estudios de inmunotransferencia en las mismas muestras de los cristalinios de conejo (Figura 53).

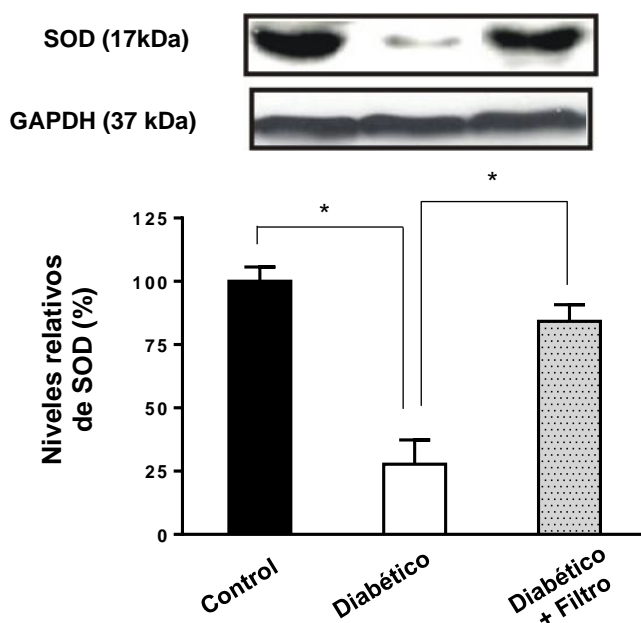


Figura 53. Niveles de la proteína SOD en los cristalinos del modelo animal de experimentación.

Bandas representativas resultantes de los estudios de western blot de los lisados de cristalinos de conejos control, diabéticos y diabéticos con filtro amarillo. Se utilizó el GAPDH como control de carga. El histograma representa la media \pm SD de los niveles relativos de la proteína SOD expresados en porcentajes normalizados considerando el 100% los valores proteicos de los animales control. * $p < 0.05$, ($n = 3$).

Al igual que para la expresión de la proteína Nrf2, al estudiar los niveles proteicos de SOD se observó una disminución en sus niveles en el grupo de conejos diabéticos. Así, los cristalinos de los conejos diabéticos experimentaron una reducción significativa de alrededor del 72% de la expresión proteica de SOD en comparación con el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 53). Nuevamente, se observó también la misma tendencia que para Nrf2 en el grupo que estuvo expuesto al filtro amarillo, manteniéndose una expresión proteica de SOD bastante semejante al control, siendo solo algo ligeramente inferior a éste. Existió en cambio una diferencia estadísticamente significativa en los niveles proteicos de SOD entre los animales con diabetes inducida sin y con exposición al filtro amarillo ($p < 0.05$) (Figura 53).

13.5. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA ACTIVIDAD DE LA SOD DE LOS CRISTALINOS DEL MODELO ANIMAL CON CATARATA DIABÉTICA

Además de medir los niveles de la proteína SOD en los cristalinios lisados, se estudió también el nivel de su actividad en esas muestras (Figura 54). Se observó la misma tendencia que en el ensayo de western blot, reduciéndose la actividad de SOD en los conejos con diabetes inducida mediante la inyección de aloxano en comparación con los conejos control ($p < 0.05$) (Figura 54). De nuevo, al interponer un filtro amarillo esta actividad permaneció en valores cercanos a los de los conejos control, confirmando que el uso del filtro amarillo evitó la disminución de la expresión y actividad de la superóxido dismutasa hallada en los animales diabéticos.

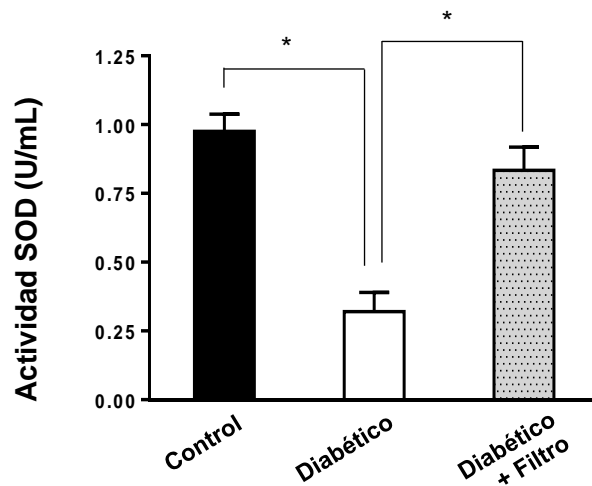


Figura 54. Actividad de la superóxido dismutasa en los cristalinios del modelo animal de experimentación. Histograma representando la actividad de la enzima SOD (U/mL) en los cristalinios lisados de conejos control y conejos con diabetes inducida sin y con filtro amarillo. Los datos muestran la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$, ($n=3$).

14. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA PRESIÓN INTRAOCULAR

14.1. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN UN MODELO ANIMAL

Además de analizar el efecto protector del filtro amarillo sobre el cristalino tanto *in vitro* como *in vivo*, también se estudió el efecto del filtro amarillo sobre la presión intraocular en un modelo de conejo normotenso.

Se detectó una significativa reducción de la IOP en los conejos que permanecieron bajo el filtro amarillo, que fue más acusada transcurridas tres semanas respecto a los conejos control (Figura 55). En ese momento, la presión intraocular disminuyó hasta un $43.8 \pm 7.8\%$ ($p < 0.0001$) comparado con el control (Figura 55). Después de cuatro semanas, se retiró el filtro amarillo, dejando a los conejos con filtro en las mismas condiciones que los conejos control, bajo ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Se observó entonces una recuperación progresiva de los valores de la IOP alcanzando valores similares al control tras cuatro semanas de recuperación (Figura 55).

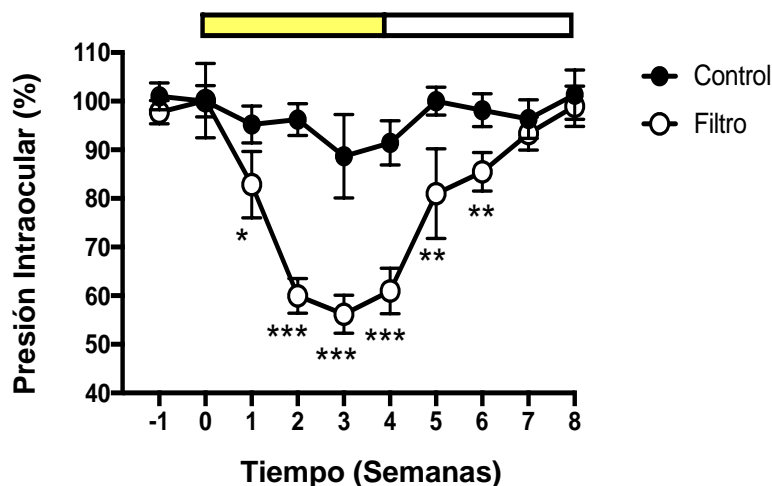


Figura 55. Efecto del filtro amarillo en la presión intraocular de los conejos.

Evolución semanal de la IOP en conejos bajo un filtro amarillo durante 4 semanas seguido de un tiempo de recuperación de otras 4 semanas en las condiciones control con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se normalizaron las medidas tomando como el 100% de presión intraocular los valores obtenidos antes de empezar los experimentos siendo estos 8.70 ± 1.30 mm Hg. Los datos están representados como medias \pm SEM (***) $p < 0.0001$, $n = 6$.

El efecto reductor del filtro amarillo sobre la IOP se revirtió 30 minutos después de la aplicación tópica de una mezcla de 4-P-PDOT y luzindol, antagonistas de los receptores de melatonina selectivo de MT₂ y no selectivo, respectivamente (Figura 56). Este resultado indica la implicación de los receptores de melatonina en el efecto hipotensor observado con el uso del filtro amarillo.

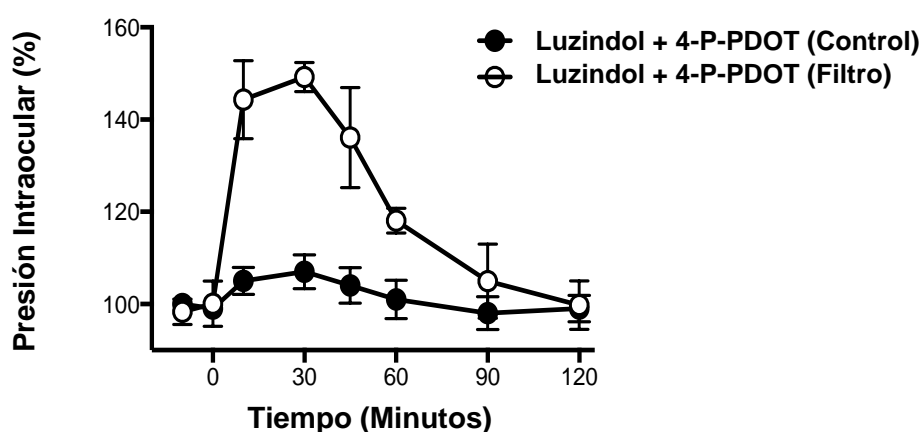


Figura 56. Efecto de la instilación de los antagonistas de receptores de melatonina (luzindol + 4-P-PDOT) en conejos cubiertos con un filtro amarillo durante tres semanas comparados con el control. La reducción de IOP producida por el filtro amarillo se revirtió completamente a los 30 minutos de haber aplicado tópicamente los antagonistas de los receptores de melatonina.

Además, se utilizó un antagonista selectivo de la melanopsina (AA92593) en los conejos control, con el fin de mimetizar farmacológicamente el bloqueo que puede ejercer el filtro amarillo sobre la activación de este fotopigmento (Figura 57). Transcurridas dos horas desde la aplicación de una única dosis del antagonista de la melanopsina, se apreció una disminución de la presión intraocular del $32.7 \pm 15.0\%$ (Figura 57), detectándose por tanto una tendencia análoga a la observada en los conejos con filtro amarillo después de tres semanas.

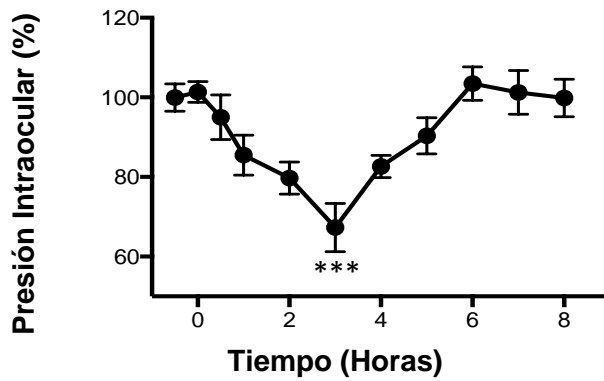


Figura 57. Efecto del antagonista de la melanopsina AA92593 sobre la presión intraocular de los conejos. El antagonista de la melanopsina, AA92593 (100 μ M), redujo la IOP tras 2 horas de su instilación tópica. *** $p < 0.0001$, ($n = 6$).

14.2. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LOS NIVELES DE MELATONINA EN UN MODELO

ANIMAL NORMOTENSO

Considerando nuestros hallazgos previos en los estudios con el filtro amarillo aplicado a animales diabéticos, así como los resultados anteriormente descritos para los antagonistas de receptores de melatonina y el antagonista de la melanopsina, los cambios en la presión intraocular de los conejos producidos por el filtro amarillo debían ser consecuencia del aumento en la concentración de melatonina endógena inducido por la exposición al filtro amarillo. Para confirmar este punto, se cuantificaron los niveles de esta neurohormona en el humor acuoso de los conejos mediante HPLC (Figura 58).

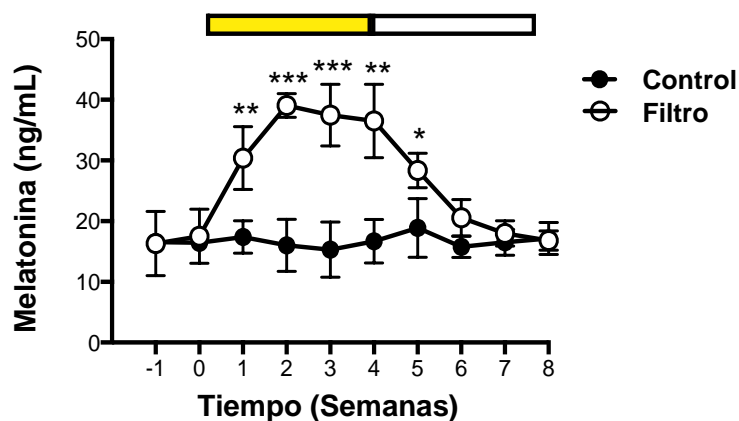



Figura 58. Concentración de melatonina en el humor acuoso de conejos control y expuestos a filtro amarillo.

Determinación por HPLC de los niveles de melatonina en el humor acuoso de los animales control y aquellos que estuvieron bajo un filtro amarillo durante las cuatro primeras semanas. Se muestran los valores como la media \pm SEM (** $p < 0.001$, $n=6$).



Los animales del grupo control mostraron inicialmente valores de melatonina de 16.50 ± 2.50 ng/mL, los cuáles se mantuvieron muy estables durante las ocho semanas de experimentación y cuyo valor más alto fue de 17.14 ± 5.30 ng/mL durante la última semana (Figura 58). En cambio, en los conejos que permanecieron durante las cuatro primeras semanas bajo un filtro amarillo, aumentaron drásticamente los niveles de la neurohormona, apreciándose diferencias estadísticamente significativas desde la primera semana. Así, la concentración de melatonina pasó de ser inicialmente de 16.33 ± 4.50 ng/mL a aumentar hasta un valor de 39.04 ± 5.56 ng/mL durante la tercera semana en presencia del filtro ($p < 0.001$) (Figura 58).

Estos valores disminuyeron progresivamente cuando se les quitó el filtro amarillo a los conejos después de cuatro semanas con él, retornado a la octava semana a un valor de 16.80 ± 4.55 ng/mL, concentración de melatonina similar a la medida inicialmente en ambos grupos de conejos (Figura 58).

En conjunto, los resultados obtenidos revelaron la capacidad del filtro amarillo de antagonizar la acción de la melanopsina, incrementando la concentración endógena de melatonina, la cual ejerce un efecto hipotensor a través de la estimulación de receptores de melatonina.

DISCUSIÓN



1. EFECTO DE LA MELATONINA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CRISTALINO

En la presente tesis doctoral se analizaron los mecanismos que acontecen tras la exposición a estrés oxidativo en las células epiteliales del cristalino, al ser dicho estrés un factor clave para la formación de cataratas implicado en la degeneración de las células del cristalino.

Se utilizaron dos modelos de inducción de estrés oxidativo, uno más clásico generado mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno y otro más novedoso basado en la exposición a luz LED blanca. En nuestro actual estilo de vida la luz blanca de tipo LED ha ido adquiriendo una importancia creciente siendo ampliamente empleada en diversos dispositivos electrónicos y también, cada vez más frecuentemente, para la iluminación general a nivel doméstico. Diversas investigaciones previas sugirieron que esta luz LED blanca, caracterizada por un intenso componente de luz azul (longitudes de onda corta en el visible), podría inducir reacciones de fotosensibilización favoreciendo el daño fotooxidativo en el cristalino y el desarrollo de cataratas (Song et al., 2020; Wang et al., 2020; Xie et al., 2014). Por tanto, con el fin de verificar estos hallazgos previos, y profundizar en los mecanismos patológicos implicados se seleccionó la exposición a luz LED blanca como potencial agente inductor de estrés oxidativo.

En consonancia con un trabajo previo de Bai y colaboradores (Bai et al., 2013) analizando el efecto del H_2O_2 como inductor de estrés oxidativo en células del cristalino, en nuestros estudios detectamos una reducción de la viabilidad celular en células del epitelio del cristalino humano sometidas a tratamiento con H_2O_2 . Asimismo, observamos un significativo incremento en la producción de ROS junto con un descenso en viabilidad celular en las células HLE-B3 expuestas a luz LED blanca. Como era esperable, el incremento en la concentración de ROS inducida por la luz LED blanca parece ser principalmente debido a la contribución de la luz azul (luz de longitud de onda corta). El incremento en la producción de ROS tras la exposición a luz LED blanca es probablemente resultado de reacciones de fotosensibilización. En el cristalino se han identificado varios cromóforos endógenos que pueden funcionar como fotosensibilizadores

produciendo cambios químicos en otras moléculas. La transferencia de energía del estado excitado de un fotosensibilizador al oxígeno genera oxígeno singlete (fotorreacciones tipo II), o el estado excitado de un fotosensibilizador reacciona con otras biomoléculas generando especies de radicales libres que luego pueden reaccionar con oxígeno para formar otros ROS (fotorreacciones de tipo I). Los fotosensibilizadores en el cristalino incluyen riboflavina, cromóforos derivados del triptófano no unidos o unidos a proteínas, productos finales de glicación avanzada (AGE), así como productos de degradación de la glucosa (Anbaraki et al., 2016; Avila et al., 2015).

Las especies reactivas de oxígeno generadas en reacciones fotosensibilizadoras pueden resultar letales para las células del cristalino al inducir efectos como la inactivación de enzimas y proteínas, peroxidación de lípidos o daño del ADN (Behar-Cohen et al., 2011; Cadet et al., 2010). Particularmente, en las células epiteliales del cristalino, se ha establecido una relación directa entre la producción de ROS inducida por la radiación de luz LED blanca y la muerte celular de tipo apoptosis, encontrándose una mayor expresión de la proteína proapoptótica Bax y niveles más bajos de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Song et al., 2020).

Nuestros estudios sobre los efectos de la luz LED blanca están en concordancia con otro estudio realizado empleando una línea celular epitelial de cristalino humano diferente (células SRA01 / 04) donde también se determinó una mayor generación de ROS intracelular y una disminución de la viabilidad celular (Song et al., 2020; Xie et al., 2014).

Estos resultados sugieren la importancia de considerar el exceso de exposición a la luz LED blanca como un factor que podría incrementar la vulnerabilidad del cristalino y su susceptibilidad al desarrollo de cataratas, especialmente en personas diabéticas o con una edad más avanzada cuya predisposición a la aparición de las cataratas es mayor.

A continuación, centramos nuestros estudios en la potencial acción protectora de la melatonina frente al estrés oxidativo inducido. Por ello, en primer lugar,

evaluamos la ausencia de efectos citotóxicos derivados de la exposición a melatonina sola en las células HLE-B3. En este mismo sentido, la seguridad de la aplicación exógena de esta neurohormona ha sido documentada en distintos artículos de investigación (Almond et al., 2021; Mantle et al., 2020).

El pretratamiento con melatonina confirió una significativa protección frente al daño celular inducido por ROS tras el tratamiento con H₂O₂ o la exposición a luz LED blanca. En esta misma línea, existen diferentes modelos experimentales de cataratas (catarata inducida por selenito, por radiación y catarata inducida por luz ultravioleta) en los que se ha comprobado la capacidad de la melatonina de mitigar el estrés oxidativo observado (Bardak et al., 2000; Shirazi et al., 2011; Yağci et al., 2006).

El mecanismo de acción molecular de la melatonina es complejo. La melatonina puede funcionar como un eliminador (“scavenger”) directo de radicales libres y también de manera indirecta mediante la modulación de la expresión de elementos de respuesta al estrés oxidativo. Teniendo en cuenta que el pretratamiento con melatonina fue necesario para observar su acción protectora, estas otras actividades antioxidantes indirectas parecen ser cruciales para explicar su mecanismo de acción. Entre estas otras acciones indirectas, fundamentales para atenuar la producción de ROS y preservar la viabilidad celular de las células HLE-B3, podría estar la regulación del sistema celular de defensa antioxidante inducible Nrf2.

Nrf2 actúa como factor de transcripción regulando la expresión de múltiples genes de enzimas antioxidantes y es considerado como un importante mecanismo compensatorio capaz de afrontar el estrés oxidativo en diferentes tipos celulares. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Nrf2 en células epiteliales de cristalino contrarresta el acúmulo de ROS celular, suprime el estrés del retículo endoplásmico y evita la pérdida de viabilidad celular inducida por H₂O₂ (Ma et al., 2018). En las células del cristalino no se ha confirmado el efecto protector directo que tiene el Nrf2 ante el estrés fotooxidativo provocado por la luz LED, pero, sí que se ha confirmado en células de la retina, como los fotorreceptores o las células del epitelio pigmentario de la retina (Catanzaro et

al., 2020; Chen et al., 2017; Inoue et al., 2017; Nagar et al., 2017; Takayama et al., 2016). Además, ratones *knockout* para Nrf2 son extremadamente vulnerables al daño oxidativo inducido por luz y el empleo de radiación lumínica en estos ratones durante tres horas permitió el establecimiento de un modelo murino de degeneración macular atrófica asociada a la edad (Wang et al., 2019).

Nuestros resultados mostraron como el pretratamiento con melatonina en las células epiteliales del cristalino humano expuestas a estrés oxidativo indujo un incremento en la producción de la proteína Nrf2 así como en la actividad de la enzima antioxidante SOD. De modo análogo, un aumento en la actividad de SOD fue detectado en los cristalinos de ratas a las que se les habían inducido cataratas mediante selenito y luz ultravioleta tratadas con melatonina (Anwar & Moustafa, 2001; Yağci et al., 2006). La adición del antagonista específico de los receptores de melatonina MT₂ (4-P-PDOT) disminuyó el aumento en los niveles de Nrf2 y la actividad de SOD desencadenada por la melatonina. Estos resultados apuntan a que la estimulación de los receptores de melatonina participa en la regulación de la expresión proteica de Nrf2.

Dado el interés de Nrf2 como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo, existe una atención creciente en la identificación de nuevos enfoques terapéuticos capaces de inducir la activación de Nrf2 en el cristalino con el fin de retrasar la progresión de la catarata. En este sentido, nuestros resultados revelaron que la aplicación de melatonina exógena podría representar un fármaco útil a considerar.

Por otra parte, dentro de otras posibles acciones indirectas mediadas por la melatonina que pueden tener efectos beneficiosos para proteger a las células del epitelio del cristalino humano del daño oxidativo, previniendo la aparición de cataratas, podría estar la modulación de la activación del inflamasoma NLRP3.

La activación del inflamasoma NLRP3 ha sido considerada como un mecanismo implicado en el desarrollo de cataratas en modelos murinos (Marneros, 2016; Wang et al., 2020) y se ha demostrado que la producción de ROS, inducida por distintos agentes oxidantes, puede estimular la activación del

inflammasoma NLRP3 (Kelley et al., 2019; Rubartelli et al., 2011; Zheng et al., 2015). Tras su activación, el inflammasoma NLRP3 promueve la activación de la caspasa-1 y ésta a su vez induce el procesamiento de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , dando lugar a la aparición de eventos inflamatorios incluyendo muerte celular de tipo inflamatorio (piroptosis).

En nuestros experimentos, tras la exposición a los agentes estresores H₂O₂ y luz LED blanca se detectó un aumento de los niveles de la proteína NLRP3 así como niveles más altos de caspasa-1 e IL-1 β con respecto a las células control no tratadas. Otros estudios encontraron también un incremento en la expresión de NLRP3 en células epiteliales de cristalino expuestas H₂O₂ (Zou et al., 2020) así como una regulación al alza de los niveles proteicos de caspasa-1 en cristalinos de rata y en células del cristalino humano irradiados con luz azul de longitud de onda corta y luz UVB respectivamente, relacionándose el aumento de caspasa-1 con fenómenos de piroptosis (Sun et al., 2020; Wang et al., 2020). Esta muerte celular de tipo inflamatorio o piroptosis, diferente a los procesos apoptóticos antes mencionados, se ha propuesto como un nuevo mecanismo implicado en la formación de cataratas (Jin et al., 2018).

El pretratamiento con melatonina aminoró la activación del inflammasoma NLRP3 originada por los agentes estresores, H₂O₂ y luz LED blanca, reduciendo los niveles proteicos de los distintos componentes del inflammasoma (NLRP3, caspasa-1 e IL-1 β) en las células epiteliales del cristalino. Por tanto, resulta plausible pensar que esta neurohormona podría mitigar el fenómeno de piroptosis contribuyendo a preservar la supervivencia de las células del cristalino.

Como ya se comentó en la introducción, las cataratas son la principal causa de ceguera reversible en el mundo y su prevalencia se sitúa en un 47.8% entre la población de más de 50 años. En el futuro, es de esperar que el aumento de la esperanza de vida y el consiguiente mayor envejecimiento de la población mundial repercutirá directamente en el aumento de la tasa de personas afectadas con opacidades en el cristalino. Además, el uso excesivo de nuevas tecnologías, que exponen al cristalino a una cantidad de luz LED superior, lleva a plantear si esta radiación influirá en un posible incremento en la incidencia de las

cataratas, particularmente, en sujetos con un cristalino ya comprometido como personas de edad avanzada o pacientes diabéticos. La cirugía de cataratas, principal tratamiento para esta patología, no está exenta de la aparición de posibles complicaciones como la opacificación de la cápsula posterior, el edema corneal o el aumento de la presión intraocular, entre otros.

En este contexto, la identificación de nuevos enfoques terapéuticos para esta patología es de vital interés. Nuestros resultados sobre la aplicación exógena de melatonina sugieren que ésta neurohormona podría constituir una estrategia prometedora para la prevención y el tratamiento de las cataratas, ya que combina su capacidad para activar la vía Nrf2, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes, junto con su acción inhibitoria sobre la activación del inflammasoma NLRP3. Estas propiedades de la melatonina permitirían contrarrestar el estrés oxidativo así como la inflamación y la muerte celular asociada al progreso y formación de las cataratas.

Por otro lado, analizamos también el efecto de la aplicación exógena de melatonina en la EMT desencadenada por estrés oxidativo inducido por H₂O₂ la cual está involucrada en el desarrollo de cataratas fibróticas como las que (J. Li et al., 2019) resultan al producirse opacificación capsular posterior (Joseph et al., 2019; Mamuya et al., 2014). Este proceso de EMT también ha sido evidenciado en cataratas diabéticas (Wu et al., 2020; Zhang et al., 2017).

De acuerdo con los hallazgos previos, en nuestros experimentos con las células HLE-B3 también se observó como el H₂O₂ promovió la transición epitelio mesénquima al disminuir la expresión proteica de marcadores epiteliales tales como E-cadherina, ZO-1 y ocludina e incrementar los niveles proteicos de marcadores mesenquimales (Snail y N-cadherina). La aplicación de melatonina exógena previno el proceso de EMT, preservando los niveles de proteicos de los marcadores epiteliales y evitando el aumento de la expresión proteica de Snail y N-cadherina. Este efecto de la melatonina estaba relacionado con la capacidad de esta neurohormona de bloquear la activación de la cascada de señalización de JNK, cuya implicación en la inducción de EMT por H₂O₂ ha sido demostrada (J. Li et al., 2019).

Estos resultados sugieren el potencial farmacológico de la melatonina en la prevención/tratamiento de cataratas fibróticas debido a su efecto preventivo frente a la transición epitelio mesénquima. No obstante, sería necesario realizar más experimentos con modelos animales para comprobar la eficacia de la melatonina como terapia alternativa en el manejo de la catarata fibrótica.

2. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN EL CRISTALINO MEDIANTE LA MODULACIÓN DE MELATONINA ENDÓGENA Y ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MELATONINA OCULAR EN CATARATAS

Considerando el efecto protector observado con la melatonina aplicada de manera exógena, se evaluó el uso de filtros amarillos para inducir la liberación endógena de melatonina al bloquear las longitudes de onda corta y se analizó el posible efecto antioxidante y citoprotector del filtro tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* empleando un modelo experimental de catarata diabética. Asimismo se evaluó la concentración de melatonina en el humor acuoso de pacientes con cataratas (no diabética y diabética) y en animales de experimentación con catarata diabética.

Investigaciones previas ya habían demostrado la importancia del efecto protector del filtro amarillo ante el estrés oxidativo provocado por la luz blanca en las células de la retina (Kurihara et al., 2009; Narimatsu et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento no se había evaluado el efecto del filtro amarillo sobre las células del cristalino. En nuestros experimentos *in vitro* comprobamos como la secreción de la melatonina al igual que los niveles proteicos de las enzimas involucradas en su síntesis (AANAT, pAANAT y HIOMT) fueron modulados mediante la interposición de un filtro amarillo. La exposición a luz LED blanca provocó una reducción en la expresión proteica de las enzimas responsables de la síntesis de la melatonina, así como una disminución en la concentración de melatonina y 6-hidroximelatonina en las células HLE-B3, que fue claramente menos acusada en las células expuestas al filtro amarillo.

Además, el tratamiento con el filtro amarillo evitó la acumulación de ROS así como el descenso en viabilidad celular inducido por la exposición a luz LED blanca. Dos factores pueden ser los responsables de estos efectos. Por una parte, el filtro amarillo puede bloquear las longitudes de onda corta (componente azul) el cual ha sido asociado a daño oxidativo en diferentes células oculares (Narimatsu et al., 2015; Núñez-Álvarez & Osborne, 2019; Xie et al., 2014). Por otro lado, teniendo en cuenta que el filtro amarillo fue capaz de aumentar los niveles de melatonina endógena a través de la regulación de la expresión

proteica de las enzimas biosintéticas de melatonina, esta melatonina endógena generada también podría contribuir de manera determinante a la defensa antioxidante y la citoprotección observadas. En este sentido, se analizaron los cambios proteicos en Nrf2, al ser la inducción de su expresión una de las acciones antioxidantes indirectas que detectamos en el caso de la aplicación de melatonina exógena.

Un ligero incremento en Nrf2 fue detectado tras la exposición a luz LED blanca (resultado ya observado en nuestros experimentos previos), si bien éste no fue estadísticamente significativo. Este aumento en la expresión de Nrf2 ha sido también documentado tras estresar las células del cristalino durante tiempos cortos de exposición con inductores cataratogénicos como el selenito de sodio y la homocisteína, (Elanchezhian et al., 2012; Palsamy, Bidasee, et al., 2014a), así como en distintas células del ojo expuestas a luz (Chen et al., 2017; Suárez-Barrio et al., 2020). Por el contrario, al exponer a las células del cristalino a tiempos de exposición más largos con agentes cataratogénicos los niveles de la proteína Nrf2 disminuyeron (Elanchezhian et al., 2012; Palsamy, Bidasee, Ayaki, et al., 2014; Palsamy, Bidasee, et al., 2014a, 2014b).

Al igual que con la aplicación de melatonina exógena, se observó un significativo aumento en los niveles de la proteína Nrf2, así como de la enzima antioxidante SOD, en las células HLE-B3 expuestas a filtro amarillo. Este efecto fue bloqueado al añadir el antagonista selectivo de los receptores de melatonina MT_2 (4-P-PDOT), indicando que la regulación de la expresión de Nrf2 es mediada por la estimulación de estos receptores por parte de la melatonina endógena liberada.

Dado que un funcionamiento deficiente del sistema antioxidante Nrf2 puede promover la formación de cataratas, la identificación de agentes inductores de Nrf2 suscita gran interés. Entre estos agentes podría incluirse no solo la melatonina exógena, como ya comentamos, sino también el empleo de filtros amarillos.

Con respecto a nuestros estudios analizando la concentración de melatonina y 6-hidroximelatonina en el humor acuoso de pacientes con cataratas, se determinó un significativo descenso en la concentración de melatonina y de 6-hidroximelatonina en los humores de pacientes con cataratas tanto diabéticas como no diabéticas frente a sujetos control con cristalino transparente. Asimismo, se detectó también este descenso en la concentración de melatonina en el humor acuoso del modelo animal de catarata diabética frente al control.

En base a la búsqueda bibliográfica podemos decir que se trata de la primera vez que se analiza la concentración de melatonina existente en el humor acuoso de pacientes con cataratas. En otro estudio se examinaron los niveles de melatonina existentes en la saliva de pacientes antes y después de ser operados de cataratas, observándose un incremento de la neurohormona tras la cirugía (Shenshen et al., 2016). Akdogan y colaboradores (Akdogan et al., 2013) analizaron la orina de pacientes con cataratas seniles frente a pacientes control, midiendo los niveles de un metabolito de la melatonina llamado 6-sulfatoximelatonina utilizado como sustituto fiable para conocer los niveles de melatonina en sangre. El resultado de ese estudio no fue estadísticamente significativo pero sí mostraba una tendencia común con nuestros hallazgos, detectándose una disminución de melatonina en el caso de los pacientes con cataratas (Akdogan et al., 2013). No obstante, nuestros resultados no son completamente comparables a los de este estudio, ya que es conocido que la melatonina presente en la sangre es producida por la glándula pineal (Lewy et al., 1980) mientras que en nuestro estudio se examinó la producción ocular local de melatonina.

Con la edad, la liberación de melatonina por la glándula pineal tiende a disminuir (Kunz et al., 1999; Reiter, 1994), aunque la influencia de la edad en la producción de melatonina genera cierta controversia. En un estudio con 253 sujetos de edad entre 21 y 82 años se concluyó que la producción de melatonina era menor en gente de más edad comparado con el grupo más joven (constituido por individuos de 20-35 años) mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los 35 y los 80 años (Kennaway et al., 1999). Por otra parte,

Waldhauser y colaboradores (Waldhauser et al., 1988) analizaron muestras de plasma de 367 sujetos, los cuales dividieron en 4 grupos en función de la edad (20-35, 35-50, 50-70, y 70-90 años) y encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el grupo de personas de edad más avanzada (70-90 años) y los otros grupos más jóvenes. Sin embargo, Kennaway y colaboradores (Kennaway et al., 1999) en un análisis posterior con esos mismos datos agrupándolos de diferente manera, manteniendo un rango de edad de 15 años igual para todos los grupos, no observaron cambios significativos en los niveles de melatonina entre el grupo más joven (20-35 años) y el formado por individuos entre 80-95 años, así como tampoco entre los grupos de 35-50 años y 65-80 años (Kennaway et al., 1999).

Esta potencial dependencia con la edad podría darse también en la producción extrapineal de melatonina. En nuestro caso no había diferencias estadísticamente significativas entre las edades del grupo control respecto al grupo con cataratas no diabéticas, por lo que los cambios en la concentración de melatonina parecen estar directamente relacionados con la patología. Tampoco existían diferencias significativas entre los pacientes con catarata no diabética y catarata diabética (aunque estos últimos presentan una reducción mayor en los niveles de melatonina), mientras que sí se encontraron diferencias significativas entre pacientes diabéticos y sujetos control. No obstante, la menor concentración de melatonina encontrada en el humor acuoso del modelo animal de catarata diabética sugiere la existencia de una correlación directa entre la deficiencia de melatonina y la patología de catarata diabética.

En consonancia con el descenso en los niveles de melatonina hallado en el humor acuoso de los animales y pacientes con catarata diabética, existen diversos estudios que demuestran la existencia de concentraciones anormales de melatonina plasmática en modelos experimentales de diabetes y en pacientes diabéticos. Así, Frese y colaboradores (Frese et al., 2009), en ensayos realizados con ratas diabéticas Goto-Kakizaki, encontraron una reducción en la síntesis de melatonina nocturna debido a una disminución en la concentración de todos sus precursores en la glándula pineal (Frese et al., 2009). Sakimura y colaboradores (Sakimura et al., 2018) llevaron a cabo un estudio con un nuevo modelo animal

de diabetes mellitus de tipo 2, ratas obesas Torii que desarrollan espontáneamente diabetes, y observaron que los ritmos circadianos relacionados con la secreción de melatonina en plasma eran anormales (Sakimura et al., 2018). Este descenso en melatonina plasmática también ha sido detectado en pacientes con diabetes de tipo 2, específicamente se encontró una disminución diurna de melatonina en el plasma (Peschke et al., 2006). Asimismo, se han identificado niveles más bajos de melatonina plasmática nocturna en sujetos con retinopatía diabética proliferativa en comparación con sujetos sanos, mientras que los diabéticos sin retinopatía proliferativa no presentaron diferencias significativas con sujetos sanos (Hikichi et al., 2011). Por el contrario, se detectaron niveles aumentados de melatonina en el humor acuoso de pacientes con retinopatía diabética proliferativa, pero no en sujetos con retinopatía no proliferativa (Aydin & Sahin, 2016). Esto podría explicarse en base a los resultados de otro artículo de investigación en el que observaron que en los estadios más graves de la retinopatía diabética se producía el daño a las células ganglionares de la retina que expresan melanopsina, justificando de esta forma el aumento de melatonina en esos pacientes (Obara et al., 2017).


Por lo que respecta al producto de degradación oxidativa de la melatonina, 6-hidroxi-melatonina, también se encontraron niveles más bajos de éste en pacientes con cataratas no diabéticas y con cataratas diabéticas, lo que sugiere la determinante contribución de la supresión de la biosíntesis de melatonina para explicar la disminución de la concentración de melatonina en el humor acuoso. En este sentido, la disminución de los niveles de melatonina encontrada en los animales diabéticos con cataratas se asoció con un deterioro en el mecanismo de síntesis de melatonina, ya que se observó una reducción en los niveles de las enzimas AANAT, HIOMT y pAANAT en el cristalino de estos animales diabéticos en comparación con el control. La reducción de la síntesis de melatonina identificada en el cristalino de los animales diabéticos se ha observado también en la retina de ratas donde la diabetes se indujo por inyección de estreptozotocina (do Carmo Buonfiglio et al., 2011). Junto con la disminución de la síntesis de melatonina se encontró una menor actividad de AANAT, siendo

ambos procesos revertidos por tratamiento con insulina (do Carmo Buonfiglio et al., 2011).

Un resultado fundamental de nuestros estudios fue el hallazgo sobre la capacidad del filtro amarillo de restablecer los niveles de melatonina en el humor acuoso de conejos diabéticos, los cuales permanecieron en valores similares al control. Los ensayos de western blot revelaron que esta recuperación de los niveles de melatonina estaba mediada por la capacidad del filtro amarillo de evitar el drástico descenso en los niveles proteicos de las enzimas biosintéticas de la melatonina (AANAT, pAANAT y HIOMT) observado en los cristalinos de los conejos con catarata diabética. Dada la relevante función antioxidante de la melatonina en el cristalino, el mantenimiento de sus niveles endógenos puede ser de gran importancia para atenuar procesos de estrés oxidativo asociados a la progresión de la catarata diabética.

En este sentido, se observó una reducción de la expresión proteica de Nrf2 y en la expresión y actividad de SOD en el cristalino de los conejos con catarata diabética. Como ya hemos indicado, la disminución de la expresión proteica de Nrf2 es observable en células tratadas durante tiempos largos de incubación con agentes cataratogénicos. Asimismo, ha sido descrito un comportamiento idéntico en la expresión proteica de Nrf2 en cristalinos humanos envejecidos (Gao et al., 2015) y en cristalinos con cataratas diabéticas (Palsamy et al., 2012). Estos resultados son similares a los encontrados en nuestros experimentos. Resulta de gran interés el hecho de que el filtro amarillo contrarrestó las bajadas de la expresión proteica de Nrf2 y de la expresión proteica y actividad de SOD, manteniéndose sus niveles en valores cercanos a los correspondientes a las muestras control.

El progreso de la opacificación del cristalino se relaciona con un déficit en su capacidad antioxidante. El mantenimiento de la actividad de los factores y enzimas antioxidantes contribuiría a retrasar la cataratogénesis. La modulación de la secreción ocular de melatonina mediante el bloqueo de la luz por el filtro amarillo, en lugar de aplicar esta neurohormona de forma exógena, puede representar un enfoque interesante para inducir la síntesis de melatonina



intraocular. Ello podría permitir restaurar la disminución detectada en el humor acuoso de los pacientes con cataratas, de forma inocua y no invasiva, mejorando el sistema de defensa antioxidante intracelular para proteger al cristalino del daño oxidativo y retrasar la formación de cataratas.


En sujetos con un mayor riesgo de desarrollo de cataratas, como personas de edad avanzada o pacientes diabéticos, la exposición acumulativa a luz LED blanca, caracterizada por un alto contenido de luz de longitud de onda corta relacionado con el daño ocular y cada vez más extendida en nuestro actual estilo de vida, podría contribuir a la opacificación prematura del cristalino. El uso de un filtro amarillo y la consiguiente producción de melatonina intraocular podrían ser especialmente interesantes en estos sujetos para prevenir la formación temprana de cataratas.

En definitiva, el filtro amarillo podría representar una interesante estrategia terapéutica para la prevención de cataratas debido a su capacidad de modular la secreción de melatonina endógena y sus efectos antioxidantes en el ojo.

3. EFECTO DEL FILTRO AMARILLO EN LA PRESIÓN INTRAOCULAR

En esta tesis doctoral se analizó por primera vez el efecto que tiene el bloqueo de las longitudes de onda corta de la luz visible, mediante la interposición de un filtro amarillo, sobre la presión intraocular en conejos de Nueva Zelanda. A partir de las dos semanas bajo el filtro amarillo ya se pudo observar cambios significativos en la IOP de los conejos, detectándose una significativa reducción de la IOP. Además, al instilar en los conejos con filtro amarillo una mezcla de antagonistas de los receptores de melatonina, luzindol y 4-P-PDOT, se revirtió el efecto hipotensor, indicando la implicación de los receptores de melatonina en el descenso de la IOP observado. También se comprobó que mediante la instilación de un antagonista selectivo de la melanopsina era posible disminuir la IOP llegando a niveles similares a los medidos en los conejos expuestos durante tres semanas al filtro amarillo. Estos hallazgos indicaban que los cambios en la presión intraocular de los conejos producidos por el filtro amarillo debían ser consecuencia del aumento en la concentración de melatonina endógena inducido por la exposición al filtro amarillo, hecho que se confirmó al analizar la concentración de melatonina endógena presente en el humor acuoso de los conejos. En los conejos con filtro amarillo se determinó un drástico incremento en la concentración de melatonina a las dos semanas de exposición al filtro amarillo. Por tanto, estos resultados confirmaron la capacidad del filtro amarillo de bloquear la activación de la melanopsina presente en el cristalino e incrementar de esta forma la secreción de la melatonina, probablemente a través de la activación de las enzimas biosintéticas de la melatonina (AANAT y HIOMT).

No existen estudios previos evaluando la posibilidad de modular la IOP mediante la regulación de las condiciones lumínicas. Los estudios más relacionados con el efecto hipotensor del uso de filtros amarillos corresponden a Ichikawa y colaboradores (Ichikawa, 2014) donde se evaluaron los cambios en la presión arterial y la duración del sueño en pacientes sometidos a una cirugía de cataratas con la implantación de lentes intraoculares tintadas de amarillo. Tras



analizar los resultados, encontraron una disminución significativa de la presión arterial sistólica y diastólica un mes después de la operación en aquellos pacientes a los que se le había implantado la lente intraocular tintada de amarillo (Ichikawa, 2014).

Los antagonistas de los receptores de melatonina bloquearon la bajada de IOP inducida por el filtro amarillo, lo que subraya que el efecto hipotensivo era el reflejo de la interacción de la melatonina con sus receptores de membrana. El efecto hipotensor de la melatonina ha sido demostrado en diferentes modelos animales, normotensos e hipertensos (Martínez-Águila et al., 2013; Martínez-Águila et al., 2016), y también en pacientes glaucomatosos (Pescosolido et al., 2015). La acción hipotensora de esta neurohormona es mediada por la estimulación de receptores de melatonina localizados en las células epiteliales no pigmentadas del cuerpo ciliar produciéndose un incremento de AMP cíclico y una reducción del flujo de cloro. La reducción del flujo de este ion lleva finalmente a la reducción de la producción de humor acuoso y la consiguiente disminución de la IOP (Huete-Toral et al., 2015). Además, se ha demostrado que compuestos análogos de la melatonina proporcionan una bajada sostenida de la IOP mediante la regulación de la expresión génica de las células epiteliales ciliares no pigmentadas y potencian la acción hipotensora de fármacos antiglaucomatosos clásicos como el timolol y la brimonidina (Crooke et al., 2011; Crooke et al., 2012, 2013).

La reducción de la presión intraocular mediada por la melatonina endógena, liberada gracias a la aplicación del filtro amarillo, abre la puerta a considerar una vía alternativa de intervención terapéutica sin fármacos convencionales, pero induciendo la secreción de compuestos hipotensores mediante la regulación de las condiciones lumínicas. No obstante, se requieren más estudios empleando modelos animales hipertensos para reforzar la utilidad de nuestros hallazgos.

Por otra parte, la melatonina endógena liberada podría no solo ejercer un beneficioso efecto hipotensor sino que además su actividad antioxidante sería igualmente ventajosa en el tratamiento del glaucoma. En este sentido, el estrés oxidativo está involucrado en la aparición y desarrollo del glaucoma. Los

pacientes con glaucoma de ángulo primario presentan una inferior capacidad antioxidante (60-70% de reducción) con respecto a sujetos control (Ferreira et al., 2004). Asimismo, una inferior capacidad antioxidante se ha asociado con una pérdida del campo visual más severa en pacientes con glaucoma de ángulo abierto (Tanito et al., 2016). El estrés oxidativo puede causar daño a la malla trabecular (Zhao et al., 2016) y, en consecuencia, provocar el aumento de la presión intraocular, cuyos niveles patológicamente altos desencadenan la disfunción y muerte de las células ganglionares contribuyendo a la pérdida de visión asociada al glaucoma. Se ha observado que las células de la malla trabecular sometidas a estrés oxidativo muestran cambios característicos del glaucoma primario de ángulo abierto. Estos cambios incluyen la acumulación de matriz extracelular, apoptosis y necrosis celular, cambios en la estructura y función del citoplasma y lisosomas (Gabelt & Kaufman, 2005) y disrupción citoesquelética (Babizhayev & Yegorov, 2011).

Además, existe una menor expresión de Nrf2 en células de la malla trabecular glaucomatosas frente a los niveles presentes en células de la malla trabecular normales y en ambos tipos celulares la sobreexpresión de Nrf2 protegió la viabilidad celular reduciendo la apoptosis (Cheng et al., 2017). Es posible especular que, al igual que a nivel del cristalino, la melatonina endógena presente en el humor acuoso pudiera también aumentar la expresión del factor antioxidante Nrf2 en la malla trabecular. Futuros estudios son necesarios para analizar el efecto antioxidante que podría desarrollar la melatonina endógena en la patología glaucomatosa.

Por tanto, aunque son requeridos más estudios experimentales adicionales, el uso de filtros amarillos como alternativa terapéutica para regular la liberación de melatonina endógena puede representar una novedosa aproximación farmacológica para la prevención de la progresión del glaucoma.



CONCLUSIONES



1. El pretratamiento con melatonina de las células epiteliales del cristalino humano reduce eficazmente el daño oxidativo inducido tanto por la adición de H_2O_2 como por la exposición a luz LED blanca. La muerte celular provocada por los agentes estresores es evitada, estimulando la capacidad antioxidante de las células mediante el aumento de los niveles proteicos de Nrf2 y de la actividad de la SOD. La melatonina también impide la activación del inflammasoma NLRP3 producida por la exposición a estrés oxidativo así como la inducción de la transición epitelio-mesénquima por H_2O_2 .
2. Los niveles de melatonina en el humor acuoso de pacientes con catarata se encuentran alterados, presentando una menor concentración de esta neurohormona en comparación con pacientes control sin opacidades en el cristalino. Además, esta disminución es más acusada en los pacientes con catarata diabética.
3. El filtro amarillo inhibe la activación de la melanopsina en el cristalino, estimulando la biosíntesis de la melatonina y el consiguiente incremento de sus niveles endógenos. El aumento en la concentración de melatonina inducido por el filtro amarillo permite reestablecer la concentración normal de melatonina en el humor acuoso de los conejos diabéticos.
4. El filtro amarillo protege a las células epiteliales del cristalino humano frente al daño oxidativo provocado por la luz, disminuyendo los niveles de ROS, aumentando la viabilidad celular, y favoreciendo el incremento de los niveles proteicos de Nrf2 y de la actividad de la SOD.

5. El uso del filtro amarillo previene el descenso en la expresión proteica de Nrf2 y en la actividad de SOD detectado en los conejos diabéticos, preservando la capacidad antioxidante del cristalino.

6. Conjuntamente, nuestros hallazgos indican que la aplicación exógena de melatonina o alternativamente la modulación de su concentración endógena mediante el uso de filtros amarillos podrían constituir una estrategia terapéutica prometedora para la prevención y tratamiento de las cataratas.

7. El filtro amarillo ejerce un efecto hipotensor, disminuyendo la presión intraocular en el modelo animal de conejo, por lo que podría ser una nueva alternativa terapéutica a considerar en el tratamiento de la patología glaucomatosa.

REFERENCIAS



- Abe, M., Itoh, M. T., Miyata, M., Ishikawa, S., & Sumi, Y. (1999). Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Exp Eye Res*, 68(2), 255-262. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0601>
- Abe, M., Itoh, M. T., Miyata, M., Shimizu, K., & Sumi, Y. (2000). Circadian rhythm of serotonin N - acetyltransferase activity in rat lens. *Exp Eye Res*, 70(6), 805-808. <https://doi.org/10.1006/exer.2000.0845>
- Ahmad, A., & Ahsan, H. (2020). Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders. *J Immunoassay Immunochem*, 41(3), 257-271. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1726774>
- Ahmadi, Z., & Ashrafizadeh, M. (2020). Melatonin as a potential modulator of Nrf2. *Fundam Clin Pharmacol*, 34(1), 11-19. <https://doi.org/10.1111/fcp.12498>
- Aimoto, T., Rohde, B. H., Chiou, G. C., & Lauber, J. K. (1985). N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol*, 1(2), 149-160. <https://doi.org/10.1089/jop.1985.1.149>
- Akdogan, M., Budak, Y. U., & Huysal, K. (2013). Urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with senile cataracts. *BMC Ophthalmol*, 13, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-13-46>
- Alarma-Estrany, P., & Pintor, J. (2007). Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther*, 113(3), 507-522. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.003>
- Alkozi, H. A. (2019). Melatonin and melanopsin in the eye: friends or foes? , 85(01), 49-59.
- Alkozi, H. A., Navarro, G., Franco, R., & Pintor, J. (2020). Melatonin and the control of intraocular pressure. *Prog Retin Eye Res*, 75, 100798. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100798>
- Alkozi, H. A., Perez de Lara, M. J., & Pintor, J. (2017). Melatonin synthesis in the human ciliary body triggered by TRPV4 activation: Involvement of AANAT phosphorylation. *Exp Eye Res*, 162, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.06.018>
- Alkozi, H. A., Sánchez-Naves, J., de Lara, M. J., Carracedo, G., Fonseca, B., Martínez-Aguila, A., & Pintor, J. (2017). Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour. *Acta Ophthalmol*, 95(3), e185-e189. <https://doi.org/10.1111/aos.13253>
- Alkozi, H. A., Wang, X., Perez de Lara, M. J., & Pintor, J. (2017). Presence of melanopsin in human crystalline lens epithelial cells and its role in melatonin synthesis. *Experimental Eye Research*, 154, 168-176. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.019>
- Almond, S. M., Warren, M. J., Shealy, K. M., Threatt, T. B., & Ward, E. D.

- (2021). A Systematic Review of the Efficacy and Safety of Over-the-Counter Medications Used in Older People for the Treatment of Primary insomnia. *Sr Care Pharm*, 36(2), 83-92. <https://doi.org/10.4140/TCP.n.2021.83>
- Anbaraki, A., Khoshaman, K., Ghasemi, Y., & Yousefi, R. (2016). Preventive role of lens antioxidant defense mechanism against riboflavin-mediated sunlight damaging of lens crystallins. *Int J Biol Macromol*, 91, 895-904. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.047>
- Andley, U. P. (2008). The lens epithelium: focus on the expression and function of the alpha-crystallin chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(3), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.034>
- Anwar, M. M., & Moustafa, M. A. (2001). The effect of melatonin on eye lens of rats exposed to ultraviolet radiation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 129(1), 57-63. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00180-6](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00180-6)
- Arendt, J., Bojkowski, C., Franey, C., Wright, J., & Marks, V. (1985). Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. *J Clin Endocrinol Metab*, 60(6), 1166-1173. <https://doi.org/10.1210/jcem-60-6-1166>
- Asbell, P. A., Dualan, I., Mindel, J., Brocks, D., Ahmad, M., & Epstein, S. (2005). Age-related cataract. *Lancet*, 365(9459), 599-609. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)17911-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)17911-2)
- Asejczyk-Widlicka, M., & Pierscionek, B. K. (2008). The elasticity and rigidity of the outer coats of the eye. *Br J Ophthalmol*, 92(10), 1415-1418. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.140178>
- Avila, F., Friguet, B., & Silva, E. (2015). Photosensitizing Activity of Endogenous Eye Lens Chromophores: An Attempt to Unravel Their Contributions to Photo-Aging and Cataract Disease. *Photochem Photobiol*, 91(4), 767-779. <https://doi.org/10.1111/php.12443>
- Axelrod, J. (1974). Neurotransmitters. *Sci Am*, 230(6), 59-71.
- Aydin, E., & Sahin, S. (2016). Increased melatonin levels in aqueous humor of patients with proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol*, 9(5), 721-724. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.05.15>
- Babizhayev, M. A. (2016). Generation of reactive oxygen species in the anterior eye segment. Synergistic codrugs of N-acetylcarnosine lubricant eye drops and mitochondria-targeted antioxidant act as a powerful therapeutic platform for the treatment of cataracts and primary open-angle glaucoma. *BBA Clin*, 6, 49-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.04.004>

- Babizhayev, M. A., Deyev, A. I., Yermakova, V. N., Brikman, I. V., & Bours, J. (2004). Lipid peroxidation and cataracts: N-acetylcarnosine as a therapeutic tool to manage age-related cataracts in human and in canine eyes. *Drugs R D*, 5(3), 125-139. <https://doi.org/10.2165/00126839-200405030-00001>
- Babizhayev, M. A., & Yegorov, Y. E. (2011). Senescent phenotype of trabecular meshwork cells displays biomarkers in primary open-angle glaucoma. *Curr Mol Med*, 11(7), 528-552. <https://doi.org/10.2174/156652411800615126>
- Bai, J., Dong, L., Song, Z., Ge, H., Cai, X., Wang, G., & Liu, P. (2013). The role of melatonin as an antioxidant in human lens epithelial cells. *Free Radic Res*, 47(8), 635-642. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.808743>
- Bardak, Y., Ozertürk, Y., Ozgüner, F., Durmuş, M., & Delibaş, N. (2000). Effect of melatonin against oxidative stress in ultraviolet-B exposed rat lens. *Curr Eye Res*, 20(3), 225-230.
- Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Viénot, F., Zisis, G., Barlier-Salsi, A., Cesarini, J. P., . . . Attia, D. (2011). Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res*, 30(4), 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.04.002>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557), 1070-1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Besharse, J. C., & Dunis, D. A. (1983). Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science*, 219(4590), 1341-1343. <https://doi.org/10.1126/science.6828862>
- Biswas, S., Harris, F., Dennison, S., Singh, J., & Phoenix, D. A. (2004). Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol Med*, 10(2), 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.12.007>
- Biswas, S., Harris, F., Dennison, S., Singh, J. P., & Phoenix, D. (2005). Calpains: enzymes of vision? *Med Sci Monit*, 11(9), Ra301-310.
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., & Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*, 86(3), 407-485. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012>
- Bova, L. M., Sweeney, M. H., Jamie, J. F., & Truscott, R. J. (2001). Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(1), 200-205.
- Bozkurt, N. B., & Pekiner, C. (2006). Impairment of endothelium- and nerve-mediated relaxation responses in the cavernosal smooth muscle of experimentally diabetic rabbits: role of weight loss and duration of diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 373(1), 71-78.

- <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0038-5>
- Brennan, L. A., & Kantorow, M. (2009). Mitochondrial function and redox control in the aging eye: role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations. *Exp Eye Res*, 88(2), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.05.018>
- Brubaker, R. F. (1991). Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32(13), 3145-3166.
- Bubenik, G. A., Brown, G. M., Uhler, I., & Grota, L. J. (1974). Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res*, 81(2), 233-242. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90938-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90938-x)
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med*, 49(1), 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.025>
- Caixinha, M., Amaro, J., Santos, M., Perdigao, F., Gomes, M., & Santos, J. (2016). In-Vivo Automatic Nuclear Cataract Detection and Classification in an Animal Model by Ultrasounds. *IEEE Trans Biomed Eng*, 63(11), 2326-2335. <https://doi.org/10.1109/tbme.2016.2527787>
- Catanzaro, M., Lanni, C., Basagni, F., Rosini, M., Govoni, S., & Amadio, M. (2020). Eye-Light on Age-Related Macular Degeneration: Targeting Nrf2-Pathway as a Novel Therapeutic Strategy for Retinal Pigment Epithelium. *Front Pharmacol*, 11, 844. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00844>
- Chen, J., Callis, P. R., & King, J. (2009). Mechanism of the very efficient quenching of tryptophan fluorescence in human gamma D- and gamma S-crystallins: the gamma-crystallin fold may have evolved to protect tryptophan residues from ultraviolet photodamage. *Biochemistry*, 48(17), 3708-3716. <https://doi.org/10.1021/bi802177g>
- Chen, W. J., Wu, C., Xu, Z., Kuse, Y., Hara, H., & Duh, E. J. (2017). Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Exp Eye Res*, 154, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.001>
- Cheng, J., Liang, J., & Qi, J. (2017). Role of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 in the age-resistant properties of the glaucoma trabecular meshwork. *Exp Ther Med*, 14(1), 791-796. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4543>
- Choudhary, D., Jansson, I., Rezaul, K., Han, D. K., Sarfarazi, M., & Schenkman, J. B. (2007). Cyp1b1 protein in the mouse eye during development: an immunohistochemical study. *Drug Metab Dispos*, 35(6), 987-994. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.014282>
- Civan, M. M. (1998). *The eye's aqueous humor : from secretion to glaucoma*. Academic Press.

- Crooke, A., Guzman-Aranguez, A., Mediero, A., Alarma-Estrany, P., Carracedo, G., Pelaez, T., . . . Pintor, J. (2015). Effect of Melatonin and Analogues on Corneal Wound Healing: Involvement of Mt(2) Melatonin Receptor. *Current Eye Research*, 40(1), 56-65. <https://doi.org/10.3109/02713683.2014.914540>
- Crooke, A., Huete-Toral, F., Martínez-Águila, A., Alarma-Estrany, P., & Pintor, J. (2011). Regulation of ocular adrenoceptor genes expression by 5-MCA-NAT: implications for glaucoma treatment. *Pharmacogenet Genomics*, 21(9), 587-589. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834910d1>
- Crooke, A., Huete-Toral, F., Martínez-Águila, A., Martín-Gil, A., & Pintor, J. (2012). Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue 5-MCA-NAT. *J Pineal Res*, 52(3), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00938.x>
- Crooke, A., Huete-Toral, F., Martínez-Águila, A., Martín-Gil, A., & Pintor, J. (2013). Melatonin and its analog 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: significance for combination therapy in glaucoma. *J Pharmacol Exp Ther*, 346(1), 138-145. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.202036>
- Davis-Silberman, N., & Ashery-Padan, R. (2008). Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. *Brain Res*, 1192, 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.043>
- de Jongh, R. U., Wederell, E., Lovicu, F. J., & McAvoy, J. W. (2005). Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs*, 179(1-2), 43-55. <https://doi.org/10.1159/000084508>
- De Stefano, I., Giardullo, P., Tanno, B., Leonardi, S., Pasquali, E., Babini, G., . . . Mancuso, M. (2016). Nonlinear Radiation-Induced Cataract Using the Radiosensitive Ptch1(+/-) Mouse Model. *Radiat Res*, 186(3), 315-321. <https://doi.org/10.1667/rr14440.1>
- Del Buey Sayas, M. A. n., & Peris Martinez, C. (2014). *Biomecánica y arquitectura corneal*. Elsevier.
- Delamere, N. A., & Tamiya, S. (2009). Lens ion transport: from basic concepts to regulation of Na,K-ATPase activity. *Exp Eye Res*, 88(2), 140-143. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.05.005>
- Dietze, J., Blair, K., & Havens, S. J. (2020). Glaucoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- do Carmo Buonfiglio, D., Peliciari-Garcia, R. A., do Amaral, F. G., Peres, R., Nogueira, T. C., Afeche, S. C., & Cipolla-Neto, J. (2011). Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,

- 52(10), 7416-7422.
<https://doi.org/10.1167/iovs.10-6756>
- Drance, S., Anderson, D. R., & Schulzer, M. (2001). Risk factors for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 131(6), 699-708.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(01\)00964-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(01)00964-3)
- Dubocovich, M. L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*, 306(5945), 782-784.
<https://doi.org/10.1038/306782a0>
- Duncan, G., & Jacob, T. J. (1984). Calcium and the physiology of cataract. *Ciba Found Symp*, 106, 132-152.
<https://doi.org/10.1002/9780470720875.ch8>
- Dunn, J. S., Duffy, E., Gilmour, M. K., Kirkpatrick, J., & McLetchie, N. G. (1944). Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol*, 103(2), 233-243.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1944.sp004072>
- Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., Ling, Z., Welsh, N., Hellerström, C., & Andersson, A. (1994). Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20), 9253-9256.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9253>
- Elanchezhian, R., Palsamy, P., Madson, C. J., Lynch, D. W., & Shinohara, T. (2012). Age-related cataracts: homocysteine coupled endoplasmic reticulum stress and suppression of Nrf2-dependent antioxidant protection [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Chem Biol Interact*, 200(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.017>
- Facciolá, G., Hidestrand, M., von Bahr, C., & Tybring, G. (2001). Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol*, 56(12), 881-888.
<https://doi.org/10.1007/s002280000245>
- Fan, X., Monnier, V. M., & Whitson, J. (2017). Lens glutathione homeostasis: Discrepancies and gaps in knowledge standing in the way of novel therapeutic approaches. *Exp Eye Res*, 156, 103-111.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.018>
- Ferreira, S. M., Lerner, S. F., Brunzini, R., Evelson, P. A., & Llesuy, S. F. (2004). Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*, 137(1), 62-69.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(03\)00788-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(03)00788-8)
- Ferrer Fernández, Y., Martínez Sánchez, G., Leroy Wright, D., & Thndiwe Chellah, N. (2009). El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. *Revista Cubana de Farmacia*, 43, 0-0.
- Finley, E. L., Dillon, J., Crouch, R. K., & Schey, K. L. (1998). Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin. *Protein Sci*, 7(11), 2391-2397.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560071116>

- Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenemy, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016a). Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit. In J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMenemy, F. Roberts, & E. Pearlman (Eds.), *The Eye (Fourth Edition)* (pp. 1-102.e102). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5554-6.00001-0>
- Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenemy, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016b). Chapter 2 - Embryology and early development of the eye and adnexa. In J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMenemy, F. Roberts, & E. Pearlman (Eds.), *The Eye (Fourth Edition)* (pp. 103-129.e108). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5554-6.00002-2>
- Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenemy, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016c). Chapter 4 - Biochemistry and cell biology. In J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMenemy, F. Roberts, & E. Pearlman (Eds.), *The Eye (Fourth Edition)* (pp. 157-268.e154). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5554-6.00004-6>
- Freel, C. D., Gilliland, K. O., Mekeel, H. E., Giblin, F. J., & Costello, M. J. (2003). Ultrastructural characterization and Fourier analysis of fiber cell cytoplasm in the hyperbaric oxygen treated guinea pig lens opacification model. *Exp Eye Res*, 76(4), 405-415.
[https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00004-6)
- Frese, T., Bach, A. G., Mühlbauer, E., Pönicke, K., Brömme, H. J., Welp, A., & Peschke, E. (2009). Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci*, 85(13-14), 526-533.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.004>
- Gabelt, B. T., & Kaufman, P. L. (2005). Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 24(5), 612-637.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.10.003>
- Gao, Y., Yan, Y., & Huang, T. (2015). Human age-related cataracts: epigenetic suppression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant system. *Mol Med Rep*, 11(2), 1442-1447.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2849>
- Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2021). Western Blot. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Giblin, F. J., Padgaonkar, V. A., Leverenz, V. R., Lin, L. R., Lou, M. F., Unakar, N. J., . . . Reddy, V. N. (1995). Nuclear light scattering, disulfide formation and membrane damage in lenses of older guinea pigs treated with hyperbaric oxygen. *Exp Eye Res*, 60(3), 219-235.
[https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(05\)80105-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(05)80105-8)
- Giblin, F. J., Schrimsher, L., Chakrapani, B., & Reddy, V. N. (1988). Exposure of rabbit lens to hyperbaric oxygen in vitro: regional effects on GSH level. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29(8), 1312-1319.

- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmol J*, 4, 52-59.
<https://doi.org/10.2174/1874364101004010052>
- Goodman, D. F., Stark, W. J., & Gottsch, J. D. (1989). Complications of cataract extraction with intraocular lens implantation. *Ophthalmic Surg*, 20(2), 132-140.
- Gupta, P. D., Johar, K., & Vasavada, A. (2004). Causative and preventive action of calcium in cataractogenesis. *Acta Pharmacol Sin*, 25(10), 1250-1256.
- Guzman-Aranguéz, A., Loma, P., & Pintor, J. (2013). Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy. *Br J Pharmacol*, 170(4), 730-747.
<https://doi.org/10.1111/bph.12330>
- Hardeland, R., Madrid, J. A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*, 52(2), 139-166.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x>
- Hejtmancik, J. F., Riazuddin, S. A., McGreal, R., Liu, W., Cvekl, A., & Shiels, A. (2015). Lens Biology and Biochemistry. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134, 169-201.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.007>
- Herse, P., & Hooker, B. (1994). Corneal edema recovery dynamics in diabetes: is the alloxan induced diabetic rabbit a useful model? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(1), 310-313.
- Hikichi, T., Tateda, N., & Miura, T. (2011). Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol*, 5, 655-660.
<https://doi.org/10.2147/oph.s19559>
- Hsu, Y. W., Yeh, S. M., Chen, Y. Y., Chen, Y. C., Lin, S. L., & Tseng, J. K. (2012). Protective effects of taurine against alloxan-induced diabetic cataracts and refraction changes in New Zealand White rabbits. *Exp Eye Res*, 103, 71-77.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.08.001>
- Hu, Z., Riquelme, M. A., Gu, S., & Jiang, J. X. (2020). Regulation of Connexin Gap Junctions and Hemichannels by Calcium and Calcium Binding Protein Calmodulin. *Int J Mol Sci*, 21(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms21218194>
- Huang, A. S., Francis, B. A., & Weinreb, R. N. (2018). Structural and functional imaging of aqueous humour outflow: a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 46(2), 158-168.
<https://doi.org/10.1111/ceo.13064>
- Huete-Toral, F., Crooke, A., Martínez-Águila, A., & Pintor, J. (2015). Melatonin receptors trigger cAMP production and inhibit chloride movements in nonpigmented ciliary epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 352(1), 119-128.
<https://doi.org/10.1124/jpet.114.218263>

- Ichikawa, K. (2014). Changes in blood pressure and sleep duration in patients with blue light-blocking/yellow-tinted intraocular lens (CHUKYO study). *Hypertens Res*, 37(7), 659-664. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.50>
- Inoue, Y., Shimazawa, M., Nagano, R., Kuse, Y., Takahashi, K., Tsuruma, K., . . . Hara, H. (2017). Astaxanthin analogs, adonixanthin and lycopene, activate Nrf2 to prevent light-induced photoreceptor degeneration. *J Pharmacol Sci*, 134(3), 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.011>
- Inés, B., & Niradiz, R. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*, 28(4). <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a07>
- Izquierdo, N. J., Traboulsi, E. I., Enger, C., & Maumenee, I. H. (1992). Glaucoma in the Marfan syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 90, 111-117; discussion 118-122.
- Jin, X., Jin, H., Shi, Y., Guo, Y., & Zhang, H. (2018). Pyroptosis, a novel mechanism implicated in cataracts. *Mol Med Rep*, 18(2), 2277-2285. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9188>
- Johnson, E. C., Guo, Y., Cepurna, W. O., & Morrison, J. C. (2009). Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res*, 88(4), 808-815. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.02.004>
- Jonas, J. B., Aung, T., Bourne, R. R., Bron, A. M., Ritch, R., & Panda-Jonas, S. (2017). Glaucoma. *Lancet*, 390(10108), 2183-2193. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31469-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31469-1)
- Joseph, R., Bales, K., Srivastava, K., & Srivastava, O. (2019). Lens epithelial cells-induced pluripotent stem cells as a model to study epithelial-mesenchymal transition during posterior capsular opacification. *Biochem Biophys Rep*, 20, 100696. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100696>
- Kador, P. F., Wyman, M., & Oates, P. J. (2016). Aldose reductase, ocular diabetic complications and the development of topical Kinostat®. *Prog Retin Eye Res*, 54, 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.04.006>
- Kaminski-Hartenthaler, A., Nussbaumer, B., Forneris, C. A., Morgan, L. C., Gaynes, B. N., Sonis, J. H., . . . Gartlehner, G. (2015). Melatonin and agomelatine for preventing seasonal affective disorder. *Cochrane Database Syst Rev*(11), Cd011271. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011271.pub2>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kennaway, D. J., Lushington, K., Dawson, D., Lack, L., van den Heuvel, C., & Rogers, N. (1999). Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and aging: new results and a critical review of the literature. *J*

- Pineal Res*, 27(4), 210-220.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1999.tb00617.x>
- Kernt, M., Hirneiss, C., Neubauer, A. S., Ulbig, M. W., & Kampik, A. (2010). Coenzyme Q10 prevents human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX / Bcl-2 ratio. *Acta Ophthalmol*, 88(3), e78-86.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.01875.x>
- Khorsand, M., Akmal, M., Sharzad, S., & Beheshtitabar, M. (2016). Melatonin Reduces Cataract Formation and Aldose Reductase Activity in Lenses of Streptozotocin-induced Diabetic Rat. *Iran J Med Sci*, 41(4), 305-313.
- Kim, Y. C., Chiang, B., Wu, X., & Prausnitz, M. R. (2014). Ocular delivery of macromolecules. *J Control Release*, 190, 172-181.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.043>
- Kiuchi, Y., Kanamoto, T., & Nakamura, T. (2009). Double hump sign in indentation gonioscopy is correlated with presence of plateau iris configuration regardless of patent iridotomy. *J Glaucoma*, 18(2), 161-164.
<https://doi.org/10.1097/IJG.0b013e31817d23b5>
- Kiziltoprak, H., Tekin, K., Inanc, M., & Goker, Y. S. (2019). Cataract in diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 10(3), 140-153.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i3.140>
- Krause, U., & Raunio, V. (1969). Proteins of the normal human aqueous humour. *Ophthalmologica*, 159(1), 178-185.
<https://doi.org/10.1159/000305901>
- Kruk, J., Kubasik-Kladna, K., & Aboul-Enein, H. Y. (2015). The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini Rev Med Chem*, 16(3), 241-257.
<https://doi.org/10.2174/1389557516666151120114605>
- Kuck, J. F., Kuwabara, T., & Kuck, K. D. (1981). The Emory mouse cataract: an animal model for human senile cataract. *Curr Eye Res*, 1(11), 643-649.
<https://doi.org/10.3109/02713688109001868>
- Kunz, D., Schmitz, S., Mahlberg, R., Mohr, A., Stöter, C., Wolf, K. J., & Herrmann, W. M. (1999). A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. *Neuropsychopharmacology*, 21(6), 765-772.
[https://doi.org/10.1016/s0893-133x\(99\)00069-x](https://doi.org/10.1016/s0893-133x(99)00069-x)
- Kurihara, T., Omoto, M., Noda, K., Ebinuma, M., Kubota, S., Koizumi, H., . . . Tsubota, K. (2009). Retinal phototoxicity in a novel murine model of intraocular lens implantation [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Vis*, 15, 2751-2761.
- Königsberg, F. M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. In (Vol. 26, pp. 18-25): Rev Educ Bioquímica.
- Laganowski, H. C., Kerr Muir, M. G., & Hitchings, R. A. (1992). Glaucoma and the iridocorneal endothelial syndrome. *Arch*

- Ophthalmol*, 110(3), 346-350.
<https://doi.org/10.1001/archophth.1992.01080150044025>
- Lee, C. M., & Afshari, N. A. (2017). The global state of cataract blindness. *Curr Opin Ophthalmol*, 28(1), 98-103.
<https://doi.org/10.1097/icu.0000000000000340>
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226.
<https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Lerner, A. B., Case, J. D., & Takahashi, Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*, 235, 1992-1997.
- Levin, L. A., Nilsson, S. F. E., Ver Hoeve, J., Wu, S., Kaufman, P. L., & Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye : Expert Consult* (11th ed. ed.). Elsevier Health Sciences.
- Lewy, A. J., Tetsuo, M., Markey, S. P., Goodwin, F. K., & Kopin, I. J. (1980). Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab*, 50(1), 204-205.
<https://doi.org/10.1210/jcem-50-1-204>
- Li, D. Y., Smith, D. G., Hardeland, R., Yang, M. Y., Xu, H. L., Zhang, L., . . . Zhu, Q. (2013). Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci*, 14(6), 11208-11223.
<https://doi.org/10.3390/ijms140611208>
- Li, J., Chen, Y., Han, C., Huang, S., Chen, S., Luo, L., & Liu, Y. (2019). JNK1/ β -catenin axis regulates H₂O₂-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 511(2), 336-342.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.049>
- Li, Y., Zhao, Y., & Wang, Y. (2019). 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase contributes to epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through the notch signalling pathway. *Cell Prolif*, 52(6), e12707.
<https://doi.org/10.1111/cpr.12707>
- Liang, F. Q., Green, L., Wang, C., Alssadi, R., & Godley, B. F. (2004). Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Exp Eye Res*, 78(6), 1069-1075.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.02.003>
- Lim, J. C., Umapathy, A., & Donaldson, P. J. (2016). Tools to fight the cataract epidemic: A review of experimental animal models that mimic age related nuclear cataract. *Exp Eye Res*, 145, 432-443.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.09.007>
- Liu, X. F., Hao, J. L., Xie, T., Malik, T. H., Lu, C. B., Liu, C., . . . Zhou, D. D. (2017). Nrf2 as a target for prevention of age-related and diabetic cataracts by against oxidative stress. *Aging Cell*, 16(5), 934-942.
<https://doi.org/10.1111/acer.12645>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126.

- <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., . . . Galli, F. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *Faseb j*, 24(10), 3603-3624. <https://doi.org/10.1096/fj.10-154450>
- Ma, T. J., Lan, D. H., He, S. Z., Ye, Z., Li, P., Zhai, W., . . . Li, Z. H. (2018). Nrf2 protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative and ER stress: The ATF4 may be involved. *Exp Eye Res*, 169, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.01.018>
- Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. (2005). Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*, 33(4), 489-494. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002410>
- Macknight, A. D., McLaughlin, C. W., Peart, D., Purves, R. D., Carré, D. A., & Civan, M. M. (2000). Formation of the aqueous humor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27(1-2), 100-106. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03208.x>
- Mafee, M. F., Karimi, A., Shah, J., Rapoport, M., & Ansari, S. A. (2005). Anatomy and pathology of the eye: role of MR imaging and CT. *Neuroimaging Clin N Am*, 15(1), 23-47. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2005.02.005>
- Maharaj, D. S., Anoopkumar-Dukie, S., Glass, B. D., Antunes, E. M., Lack, B., Walker, R. B., & Daya, S. (2002). The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *J Pineal Res*, 32(4), 257-261. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.01866.x>
- Mamuya, F. A., Wang, Y., Roop, V. H., Scheiblin, D. A., Zajac, J. C., & Duncan, M. K. (2014). The roles of α V integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J Cell Mol Med*, 18(4), 656-670. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12213>
- Mantle, D., Smits, M., Boss, M., Miedema, I., & van Geijlswijk, I. (2020). Efficacy and safety of supplemental melatonin for delayed sleep-wake phase disorder in children: an overview. *Sleep Med X*, 2, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.sleepx.2020.100022>
- Marcantonio, J. M., Duncan, G., & Rink, H. (1986). Calcium-induced opacification and loss of protein in the organ-cultured bovine lens. *Exp Eye Res*, 42(6), 617-630. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(86\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0014-4835(86)90051-5)
- Markwell, E. L., Feigl, B., & Zele, A. J. (2010). Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. *Clin Exp Optom*, 93(3), 137-149. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00479.x>
- Marneros, A. G. (2016). Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms. *EMBO Mol Med*, 8(3), 208-231.

- <https://doi.org/10.15252/emmm.201505613>
- Martin, X. D., Malina, H. Z., Brennan, M. C., Hendrickson, P. H., & Lichter, P. R. (1992). The ciliary body--the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur J Ophthalmol*, 2(2), 67-72.
- Martínez-Morales, J. R., Rodrigo, I., & Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*, 26(7), 766-777. <https://doi.org/10.1002/bies.20064>
- Martínez-Águila, A., Fonseca, B., Bergua, A., & Pintor, J. (2013). Melatonin analogue agomelatine reduces rabbit's intraocular pressure in normotensive and hypertensive conditions. *Eur J Pharmacol*, 701(1-3), 213-217. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.12.009>
- Martínez-Águila, A., Fonseca, B., Pérez de Lara, M. J., & Pintor, J. (2016). Effect of Melatonin and 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 357(2), 293-299. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.231456>
- Mathias, R. T., Kistler, J., & Donaldson, P. (2007). The lens circulation. *J Membr Biol*, 216(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9019-y>
- McMenamin, P. G., & Steptoe, R. J. (1991). Normal anatomy of the aqueous humour outflow system in the domestic pig eye. *J Anat*, 178, 65-77.
- Meek, K. M., & Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res*, 49, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.001>
- Mhatre, M. C., van Jaarsveld, A. S., & Reiter, R. J. (1988). Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153(3), 1186-1192. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)81353-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)81353-6)
- Miric, D. J., Kistic, B. B., Zoric, L. D., Mitic, R. V., Miric, B. M., & Dragojevic, I. M. (2013). Xanthine oxidase and lens oxidative stress markers in diabetic and senile cataract patients. *J Diabetes Complications*, 27(2), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.09.005>
- Mizdrak, J., Hains, P. G., Truscott, R. J., Jamie, J. F., & Davies, M. J. (2008). Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 44(6), 1108-1119. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.003>
- Moreau, K. L., & King, J. A. (2012). Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med*, 18(5), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.005>
- Morgan, P. E., Dean, R. T., & Davies, M. J. (2002). Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Arch Biochem Biophys*, 403(2), 259-269.

- [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00222-9](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00222-9)
- Mårtensson, J., & Meister, A. (1991). Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(11), 4656-4660. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4656>
- Nagar, S., Noveral, S. M., Trudler, D., Lopez, K. M., McKercher, S. R., Han, X., . . . Lipton, S. A. (2017). MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(20), E4048-e4056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613067114>
- Nagaraj, R. H., Linetsky, M., & Stitt, A. W. (2012). The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino Acids*, *42*(4), 1205-1220. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0778-x>
- Narimatsu, T., Negishi, K., Miyake, S., Hirasawa, M., Osada, H., Kurihara, T., . . . Ozawa, Y. (2015). Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Exp Eye Res*, *132*, 48-51. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.01.003>
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., . . . Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, *404*(6779), 787-790. <https://doi.org/10.1038/35008121>
- Núñez-Álvarez, C., & Osborne, N. N. (2019). Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells in situ and R28 cells in vitro. *Neurochem Int*, *125*, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.018>
- Obara, E. A., Hannibal, J., Heegaard, S., & Fahrenkrug, J. (2017). Loss of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in Patients With Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *58*(4), 2187-2192. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21168>
- Obrosova, I. G., Chung, S. S., & Kador, P. F. (2010). Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes Metab Res Rev*, *26*(3), 172-180. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1075>
- Olcese, J., & Møller, M. (1989). Characterization of serotonin N-acetyltransferase activity in the retina of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Neurosci Lett*, *102*(2-3), 235-240. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90084-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90084-0)
- Olver, J., Cassidy, L., Jutley, G., & Crawley, L. (2014). *Ophthalmology at a Glance*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Osborne, N. N., & Chidlow, G. (1994). The presence of functional

- melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp Eye Res*, 59(1), 3-9. <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1076>
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- Palsamy, P., Ayaki, M., Elanchezhian, R., & Shinohara, T. (2012). Promoter demethylation of Keap1 gene in human diabetic cataractous lenses. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(3), 542-548. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.164>
- Palsamy, P., Bidasee, K. R., Ayaki, M., Augusteyn, R. C., Chan, J. Y., & Shinohara, T. (2014). Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts. *Free Radic Biol Med*, 72, 134-148. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.010>
- Palsamy, P., Bidasee, K. R., & Shinohara, T. (2014a). Selenite cataracts: activation of endoplasmic reticulum stress and loss of Nrf2/Keap1-dependent stress protection. *Biochim Biophys Acta*, 1842(9), 1794-1805. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.028>
- Palsamy, P., Bidasee, K. R., & Shinohara, T. (2014b). Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*, 121, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.021>
- Patel, D. V., Gandhi, T. R., Patel, K. V., Patil, D. B., & Parikh, P. V. (2010). Targeting CYP450 modulation to decrease the risk of induced cataract in the experimental model. *Indian J Ophthalmol*, 58(6), 471-475. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.71676>
- Perez, R. N., Phelps, C. D., & Burton, T. C. (1976). Angel-closure glaucoma following scleral buckling operations. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 81(2), 247-252.
- Peschke, E., Frese, T., Chankiewitz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., . . . Mühlbauer, E. (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res*, 40(2), 135-143. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00287.x>
- Pescosolido, N., Barbato, A., Giannotti, R., Komaiha, C., & Lenarduzzi, F. (2016). Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *Int J Ophthalmol*, 9(10), 1506-1517. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.10.23>
- Pescosolido, N., Gatto, V., Stefanucci, A., & Rusciano, D. (2015). Oral treatment with the melatonin agonist agomelatine lowers the intraocular pressure of glaucoma

- patients. *Ophthalmic Physiol Opt*, 35(2), 201-205. <https://doi.org/10.1111/opo.12189>
- Pierce, M. E., & Besharse, J. C. (1985). Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J Gen Physiol*, 86(5), 671-689. <https://doi.org/10.1085/jgp.86.5.671>
- Pollreisz, A., & Schmidt-Erfurth, U. (2010). Diabetic cataract-pathogenesis, epidemiology and treatment. *J Ophthalmol*, 2010, 608751. <https://doi.org/10.1155/2010/608751>
- Pozo, D., García-Mauriño, S., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2004). mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res*, 37(1), 48-54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00135.x>
- Prokofyeva, E., Wegener, A., & Zrenner, E. (2013). Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review. *Acta Ophthalmol*, 91(5), 395-405. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02444.x>
- Quay, W. B. (1984). Increases in volume, fluid content, and lens weight of eyes following systemic administration of melatonin. *J Pineal Res*, 1(1), 3-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1984.tb00190.x>
- Quigley, H. A. (2011). Glaucoma. *Lancet*, 377(9774), 1367-1377. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61423-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61423-7)
- Rada, J. A., & Wiechmann, A. F. (2006). Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(1), 25-33. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0195>
- Reddy, V. N. (1990). Glutathione and its function in the lens--an overview. *Exp Eye Res*, 50(6), 771-778. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(90\)90127-g](https://doi.org/10.1016/0014-4835(90)90127-g)
- Reddy, V. N., Giblin, F. J., Lin, L. R., & Chakrapani, B. (1998). The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(2), 344-350.
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8), 654-664. <https://doi.org/10.1007/bf01923947>
- Reiter, R. J. (1994). Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 54 Suppl, 31-39.
- Reiter, R. J., Richardson, B. A., Matthews, S. A., Lane, S. J., & Ferguson, B. N. (1983). Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian gland of rats: persistence after pinealectomy. *Life Sci*, 32(11), 1229-1236.

- [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(83\)90192-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(83)90192-3)
- Remington, L. A. (2012a). Chapter 5 - Crystalline Lens. In L. A. Remington (Ed.), *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)* (pp. 93-108). Butterworth-Heinemann.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1926-0.10005-0>
- Remington, L. A. (2012b). Chapter 6 - Aqueous and Vitreous Humors. In L. A. Remington (Ed.), *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)* (pp. 109-122). Butterworth-Heinemann.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1926-0.10006-2>
- Rhodes, J. D., & Sanderson, J. (2009). The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. *Exp Eye Res*, 88(2), 226-234.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.025>
- Roberts, J. E., Finley, E. L., Patat, S. A., & Schey, K. L. (2001). Photooxidation of lens proteins with xanthurenic acid: a putative chromophore for cataractogenesis. *Photochem Photobiol*, 74(5), 740-744.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0740:polpwx>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0740:polpwx>2.0.co;2)
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36(1), 1-9.
- <https://doi.org/10.1046/j.1600-079x.2003.00092.x>
- Rubartelli, A., Gattorno, M., Netea, M. G., & Dinarello, C. A. (2011). Interplay between redox status and inflammasome activation. *Trends Immunol*, 32(12), 559-566.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.08.005>
- Sakimura, K., Maekawa, T., Kume, S. I., & Ohta, T. (2018). Spontaneously Diabetic Torii (SDT) Fatty Rat, a Novel Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus, Shows Blunted Circadian Rhythms and Melatonin Secretion. *Int J Endocrinol*, 2018, 9065690.
<https://doi.org/10.1155/2018/9065690>
- Savage, R. A., Zafar, N., Yohannan, S., & Miller, J. M. M. (2020). Melatonin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- Schmidt, T. M., Do, M. T., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011). Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci*, 31(45), 16094-16101.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.4132-11.2011>
- Shearer, T. R., Ma, H., Fukiage, C., & Azuma, M. (1997). Selenite nuclear cataract: review of the model. *Mol Vis*, 3, 8.
- Shearer, T. R., Ma, H., Shih, M., Fukiage, C., & Azuma, M. (2000). Calpains in the lens and cataractogenesis. *Methods Mol Biol*, 144, 277-285.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-050-0:277>

- Shenshen, Y., Minshu, W., Qing, Y., Yang, L., Suodi, Z., & Wei, W. (2016). The effect of cataract surgery on salivary melatonin and sleep quality in aging people. *Chronobiol Int*, 33(8), 1064-1072. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1197234>
- Shillcutt, S. D., Gobbi, G., Srinivasan, V., & Suzen, S. (2014). *Melatonin: Therapeutic Value and Neuroprotection* (C. Press, Ed. 1st Edition ed.). <https://doi.org/10.1201/b17448>
- Shirazi, A., Haddadi, G. H., Asadi-Amoli, F., Sakhaee, S., Ghazi-Khansari, M., & Avand, A. (2011). Radioprotective effect of melatonin in reducing oxidative stress in rat lenses. *Cell J*, 13(2), 79-82.
- Simko, F., & Pechanova, O. (2009). Potential roles of melatonin and chronotherapy among the new trends in hypertension treatment. *J Pineal Res*, 47(2), 127-133. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00697.x>
- Simpanya, M. F., Ansari, R. R., Leverenz, V., & Giblin, F. J. (2008). Measurement of lens protein aggregation in vivo using dynamic light scattering in a guinea pig/UVA model for nuclear cataract. *Photochem Photobiol*, 84(6), 1589-1595. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00390.x>
- Sivak-Callcott, J. A., O'Day, D. M., Gass, J. D., & Tsai, J. C. (2001). Evidence-based recommendations for the diagnosis and treatment of neovascular glaucoma. *Ophthalmology*, 108(10), 1767-1776; quiz1777, 1800. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(01\)00775-8](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(01)00775-8)
- Solov'eva, N. A., Kandaurov, V. A., Zaidman, A. M., & Salganik, R. I. (1982). [Hereditary galactosemia in rats: biochemical mechanisms of the disease]. *Vopr Med Khim*, 28(3), 15-21. (Nasledstvennaia galaktozemiiia u krys: biokhimicheskie mekhanizmy razvitiia zabolevaniia.)
- Song, J., Li, D., Shan, Z., Kurskaya, O., Sharshov, K., Gao, T., & Bi, H. (2020). Photocytotoxicity of white light-emitting diode irradiation on human lens epithelium and retinal pigment epithelium via the JNK and p38 MAPK signaling pathways. *J Photochem Photobiol B*, 213, 112058. <https://doi.org/10.1016/j.jphoto.2020.112058>
- Spector, A. (1995). Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *Faseb j*, 9(12), 1173-1182.
- Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*, 66(2), 190-194. <https://doi.org/10.4103/ijo.IJO.64617>
- Stefulj, J., Hörtner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., . . . Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, 30(4), 243-247. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.300408.x>
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), 845-881.

- <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Sun, Y., Rong, X., Li, D., Jiang, Y., Lu, Y., & Ji, Y. (2020). Down-regulation of CRTAC1 attenuates UVB-induced pyroptosis in HLECs through inhibiting ROS production. *Biochem Biophys Res Commun*, 532(1), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.028>
- Suárez-Barrio, C., Del Olmo-Aguado, S., García-Pérez, E., de la Fuente, M., Muruzabal, F., Anitua, E., . . . Merayo-Llodes, J. (2020). Antioxidant Role of PRGF on RPE Cells after Blue Light Insult as a Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031021>
- Sweeney, M. H., & Truscott, R. J. (1998). An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract. *Exp Eye Res*, 67(5), 587-595. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0549>
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50(6), 537-546.
- Takayama, K., Kaneko, H., Kataoka, K., Kimoto, R., Hwang, S. J., Ye, F., . . . Terasaki, H. (2016). Nuclear Factor (Erythroid-Derived)-Related Factor 2-Associated Retinal Pigment Epithelial Cell Protection under Blue Light-Induced Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8694641. <https://doi.org/10.1155/2016/8694641>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*, 20(10), 18886-18906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>
- Tang, W., Martin, K., & Hwa, J. (2012). Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus [10.3389/fphar.2012.00087]. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 87.
- Tang, Y., Ji, Y., Ye, X., Wang, X., Cai, L., Xu, J., & Lu, Y. (2015). The Association of Outdoor Activity and Age-Related Cataract in a Rural Population of Taizhou Eye Study: Phase 1 Report. *PLoS One*, 10(8), e0135870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135870>
- Tanito, M., Kaidzu, S., Takai, Y., & Ohira, A. (2016). Association between systemic oxidative stress and visual field damage in open-angle glaucoma. *Sci Rep*, 6, 25792. <https://doi.org/10.1038/srep25792>
- Taylor, A., Jacques, P. F., Nadler, D., Morrow, F., Sulsky, S. I., & Shepard, D. (1991). Relationship in humans between ascorbic acid consumption and levels of total and reduced ascorbic acid in lens, aqueous humor, and plasma. *Curr Eye Res*, 10(8), 751-759. <https://doi.org/10.3109/02713689109013869>
- Thale, A., & Tillmann, B. (1993). The collagen architecture of the sclera--SEM and immunohistochemical studies. *Ann Anat*, 175(3), 215-220.

- [https://doi.org/10.1016/s0940-9602\(11\)80004-x](https://doi.org/10.1016/s0940-9602(11)80004-x)
- Thompson, J., & Lakhani, N. (2015). Cataracts. *Prim Care*, 42(3), 409-423.
<https://doi.org/10.1016/j.pop.2015.05.012>
- Timsina, R., & Mainali, L. (2021). Association of Alpha-Crystallin with Fiber Cell Plasma Membrane of the Eye Lens Accompanied by Light Scattering and Cataract Formation. *Membranes (Basel)*, 11(6).
<https://doi.org/10.3390/membranes11060447>
- Turalba, A. V., & Chen, T. C. (2008). Clinical and genetic characteristics of primary juvenile-onset open-angle glaucoma (JOAG). *Semin Ophthalmol*, 23(1), 19-25.
<https://doi.org/10.1080/08820530701745199>
- Tyrberg, B., Andersson, A., & Borg, L. A. (2001). Species differences in susceptibility of transplanted and cultured pancreatic islets to the beta-cell toxin alloxan. *Gen Comp Endocrinol*, 122(3), 238-251.
<https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7638>
- Vartanian, G. V., Li, B. Y., Chervenak, A. P., Walch, O. J., Pack, W., Ala-Laurila, P., & Wong, K. Y. (2015). Melatonin Suppression by Light in Humans Is More Sensitive Than Previously Reported. In *J Biol Rhythms* (Vol. 30, pp. 351-354). © 2015 The Author(s).
<https://doi.org/10.1177/0748730415585413>
- Vashist, P., Tandon, R., Murthy, G. V. S., Barua, C. K., Deka, D., Singh, S., . . . Vishwanath, K. (2020). Association of cataract and sun exposure in geographically diverse populations of India: The CASE study. First Report of the ICMR-EYE SEE Study Group. *PLoS One*, 15(1), e0227868.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227868>
- Vavvas, D., Azar, N. F., & Azar, D. T. (2002). Mechanisms of disease: cataracts. *Ophthalmol Clin North Am*, 15(1), 49-60.
[https://doi.org/10.1016/s0896-1549\(01\)00015-3](https://doi.org/10.1016/s0896-1549(01)00015-3)
- Vieira, R., Souto, S. B., Sánchez-López, E., Machado, A. L., Severino, P., Jose, S., . . . Souto, E. B. (2019). Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome-Strategies for In Vivo Administration: Part-II. *J Clin Med*, 8(9).
<https://doi.org/10.3390/jcm8091332>
- Vrensen, G. F. (2009). Early cortical lens opacities: a short overview. *Acta Ophthalmol*, 87(6), 602-610.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01674.x>
- Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., & Frisch, H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 66(3), 648-652.
<https://doi.org/10.1210/jcem-66-3-648>
- Wang, K., Zheng, M., Lester, K. L., & Han, Z. (2019). Light-induced Nrf2(-/-) mice as atrophic age-related macular degeneration model and treatment with nanoceria laden injectable hydrogel [Research Support, N.I.H., Extramural

- Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Sci Rep*, 9(1), 14573. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51151-7>
- Wang, W., Yan, W., Fotis, K., Prasad, N. M., Lansingh, V. C., Taylor, H. R., . . . He, M. (2016). Cataract Surgical Rate and Socioeconomics: A Global Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57(14), 5872-5881. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19894>
- Wang, Y., Zhang, M., Sun, Y., Wang, X., Song, Z., Li, H., . . . Li, Z. (2020). Role of short-wavelength blue light in the formation of cataracts and the expression of caspase-1, caspase-11, Gasdermin D in rat lens epithelial cells: insights into a novel pathogenic mechanism of cataracts. *BMC Ophthalmol*, 20(1), 289. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01565-z>
- Weinreb, R. N., & Khaw, P. T. (2004). Primary open-angle glaucoma. *Lancet*, 363(9422), 1711-1720. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16257-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16257-0)
- Wiechmann, A. F., & Rada, J. A. (2003). Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res*, 77(2), 219-225. [https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(03\)00126-x](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(03)00126-x)
- Wiechmann, A. F., & Sherry, D. M. (2013). Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. *Int Rev Cell Mol Biol*, 300, 211-242. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405210-9.00006-0>
- Wiechmann, A. F., Udin, S. B., & Summers Rada, J. A. (2004). Localization of Mel1b melatonin receptor-like immunoreactivity in ocular tissues of *Xenopus laevis*. *Exp Eye Res*, 79(4), 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.07.004>
- Wiechmann, A. F., & Wirsig-Wiechmann, C. R. (2001). Melatonin receptor mRNA and protein expression in *Xenopus laevis* nonpigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res*, 73(5), 617-623. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1073>
- Wiechmann, A. F., Yang, X. L., Wu, S. M., & Hollyfield, J. G. (1988). Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res*, 453(1-2), 377-380. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90182-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90182-5)
- Wolff, S. P., & Dean, R. T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*, 245(1), 243-250. <https://doi.org/10.1042/bj2450243>
- Wormstone, I. M., Wormstone, Y. M., Smith, A. J. O., & Eldred, J. A. (2021). Posterior capsule opacification: What's in the bag? *Prog Retin Eye Res*, 82, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100905>
- Wu, H., Yu, Y., David, L., Ho, Y. S., & Lou, M. F. (2014). Glutaredoxin 2 (Grx2) gene deletion induces early onset of age-dependent cataracts in mice. *J Biol Chem*, 289(52), 36125-36139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620047>

- Wu, T. T., Chen, Y. Y., Chang, H. Y., Kung, Y. H., Tseng, C. J., & Cheng, P. W. (2020). AKR1B1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Mediated by RAGE-Oxidative Stress in Diabetic Cataract Lens. *Antioxidants (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040273>
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Phillips, L. S. (1963). MELATONIN SYNTHESIS IN THE PINEAL GLAND: CONTROL BY LIGHT. *Science*, 142(3595), 1071-1073. <https://doi.org/10.1126/science.142.3595.1071>
- Xie, C., Li, X., Tong, J., Gu, Y., & Shen, Y. (2014). Effects of white light-emitting diode (LED) light exposure with different correlated color temperatures (CCTs) on human lens epithelial cells in culture. *Photochem Photobiol*, 90(4), 853-859. <https://doi.org/10.1111/php.12250>
- Xu, G. T., Zigler, J. S., Jr., & Lou, M. F. (1992). Establishment of a naphthalene cataract model in vitro. *Exp Eye Res*, 54(1), 73-81. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(92\)90071-y](https://doi.org/10.1016/0014-4835(92)90071-y)
- Xu, J., Fu, Q., Chen, X., & Yao, K. (2020). Advances in pharmacotherapy of cataracts. *Ann Transl Med*, 8(22), 1552. <https://doi.org/10.21037/atm-20-1960>
- Yağci, R., Aydın, B., Erdurmuş, M., Karadağ, R., Gürel, A., Durmuş, M., & Yiğitoğlu, R. (2006). Use of melatonin to prevent selenite-induced cataract formation in rat eyes. *Curr Eye Res*, 31(10), 845-850. <https://doi.org/10.1080/02713680600899663>
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119(6), 1429-1437. <https://doi.org/10.1172/jci36183>
- Zelenka, P. S., & Arpitha, P. (2008). Coordinating cell proliferation and migration in the lens and cornea. *Semin Cell Dev Biol*, 19(2), 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.10.001>
- Zhang, L., Wang, Y., Li, W., Tsonis, P. A., Li, Z., Xie, L., & Huang, Y. (2017). MicroRNA-30a Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Diabetic Cataracts Through Targeting SNAI1. *Sci Rep*, 7(1), 1117. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01320-3>
- Zhao, J., Wang, S., Zhong, W., Yang, B., Sun, L., & Zheng, Y. (2016). Oxidative stress in the trabecular meshwork (Review). *Int J Mol Med*, 38(4), 995-1002. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2714>
- Zheng, Q., Ren, Y., Reinach, P. S., Xiao, B., Lu, H., Zhu, Y., . . . Chen, W. (2015). Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Exp Eye Res*, 134, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.013>
- Zou, Y., Cui, B., Liang, P., Tian, X., Ma, Y., & Zhao, S. (2020). Inhibition of NLRP3 Protects Human Lens

Epithelial Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis by NF- κ B Signaling. *Ophthalmic Res*, 63(2), 174-181.
<https://doi.org/10.1159/000504303>



ANEXOS



2. ARTÍCULOS

2.1. PRESENCE OF MELATONIN IN HUMAN TEARS

Document downloaded from <http://www.elsevier.es>, day 26/04/2017. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Journal of Optometry (2017) 10, 3–4



Journal of
of Optometry

www.journalofoptometry.org



SCIENTIFIC LETTER

Presence of melatonin in human tears



Presencia de melatonina en lágrimas humanas

Melatonin is a neurohormone mainly considered to be produced by the pineal gland.¹ Melatonin is involved in processes such as the coordination of circadian rhythms, immunomodulation, as an antidepressant, antioxidant, regulation of sex organ maturation, in embryonic development of the eye, and as a regulator of intraocular pressure among other actions.²

Melatonin is synthesised and secreted in more tissues than just the pineal gland.³ There are several ocular structures that also produce melatonin. These include the ciliary body, lens and the retina. Melatonin acts on selective melatonin receptors located in the cornea, choroid and sclera.⁴ Melatonin is also known for its role regulating circadian rhythms.² The presence of melatonin in rabbit tears has been described in a 2014 study performed with New Zealand rabbits. A study by Crooke et al. showed the presence of melatonin in the tear film but the production of the melatonin did not follow a circadian pattern as expected.⁴ Although this neurohormone has been identified in animal's ocular surface, little is known about the effects of melatonin on human ocular surface. According to the multitude of effects of this compound in other organisms than humans, it may help to regulate tear secretion, and it may also help in the scavenging of reactive oxygen species (ROS) therefore protecting the ocular surface.^{6,7}

The presence of melatonin and its diurnal variation in human tears is still unclear. To-date the presence of melatonin has been assessed in rabbit tears and various human ocular structures and the aim of the current study is to assess the presence of melatonin in the human tear and its possible variation along the day–night period.

In this study 11 subjects (6 women/5 men) aged 24.09 ± 1.87 (22–27 years) were recruited. Subjects with any ocular pathology were excluded from the study. The study was designed and performed according to the tenets of the Declaration of Helsinki. In order to determine the concentration of melatonin in tears, the Schirmer's test was performed for 2 min as described Suphakasem et al.⁸ The tear volume was measured in human tears at different time points of the day: in the morning (8:00 am), in

the afternoon (03:00 pm) and at night (12:00 pm). Measurements were performed in one eye of each patient, selected randomly. The collected samples were placed in an aqueous solution for further individual analysis by following the procedure described by Alkozi and Pintor.⁹ Statistical data analysis was performed by the IBM SPSS programme (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.), using the non-parametric test Wilcoxon signed rank test. *P* value of 0.05 was considered statistically significant.

Melatonin was found in the tears of the subjects and the concentration appears to change throughout the day. Fig. 1 shows the amount of melatonin in human tears at different time points of the day. Differences between melatonin concentrations during the day have shown a circadian pattern. In the morning (8 h) concentrations were $0.81 [0.60, 0.99] \mu\text{M}$, while the afternoon (15 h) concentrations were $0.94 [0.69, 1.40] \mu\text{M}$ and at night (24 h) concentrations were $1.67 [1.18, 3.25] \mu\text{M}$. The differences found were statistically significant ($p < 0.05$; $p = 0.008$), being markedly higher at night (24 h) than in the morning (8 h). There were no statistical differences ($p = 0.091$) between the afternoon (15 h) and the morning measurements.

In this study it has been described, for the first time, the presence of melatonin in human tears, proving also that the production of this neurohormone follows a circadian pattern. During the morning and evening melatonin levels remain stable, but it doubles its concentration overnight. The same pattern of variation has been found in other tissues such as retina, plasma and pineal gland according to Zawilska and co-workers.¹⁰

As explained previously, melatonin and its receptors have been found in various structures of different animals eyes, signifying that it is a very important component in the eye physiology.⁴ The presence of melatonin is able to help corneal wound healing by activating melatonin MT_2 receptors,⁵ this being of great interest for potential studies in human corneas. Moreover, in experiments performed on rabbits tears, it was observed that topical administration of melatonin in combination with Ap_4A (a natural component of the tear) is able to stimulate tear secretion.⁶

It can be speculated that the activation of a TRPV4 channel, a membrane protein present in the ciliary processes, increases the secretion of extracellular melatonin to the aqueous humour, thus regulating intraocular pressure.⁹ Nevertheless, since the results show a circadian pattern, the presence of melatonin in tears might also be regulated by

<http://dx.doi.org/10.1016/j.optom.2016.03.002>

1888-4296/© 2016 Spanish General Council of Optometry. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

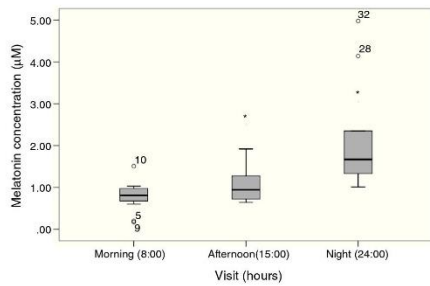


Figure 1 Melatonin amount in human tears at different moments of the day. The morning (8 h) concentrations were (0.81 [0.60, 0.99] μM (10–3 mol/L)), afternoon (15 h) concentrations were (0.94 [0.69, 1.40] μM) and night (24 h) concentrations were (1.67 [1.18, 3.25] μM) (medians and quartiles). Differences discussed in the text.

the same mechanisms as the ones that control pineal gland physiology.¹⁰

In conclusion, the present work demonstrates the existence of melatonin in the human tear film. Further analysis is warranted to understand the role of melatonin in human tears and ocular surface.

Funding

The authors do not have any financial interest on the materials and instruments used in this study.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res.* 2011;51:17–43.

2. Claustrat B, Leston J. Melatonin: physiological effects in humans. *Neuro-Chirurgie.* 2015;61:77–84.
3. Wiechmann AF, Summers JA. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27:137–160.
4. Alarma-Estrany P, Pintor J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther.* 2007;113:507–522.
5. Crooke A, Guzman-Aranguéz A, Mediero A, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt(2) melatonin receptor. *Curr Eye Res.* 2015;40:56–65.
6. Hoyle CHV, Peral A, Pintor J. Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 2006;552:159–161.
7. Karaaslan C, Suzen S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr Top Med Chem.* 2015;15:894–903.
8. Suphakasem S, Lekskul M, Rangsin R. Assessment of different wetting time and paper strip size of Schirmer test in dry eye patients. *J Med Assoc Thai.* 2012;5:S107–S110.
9. Awad Alkozi H, Pintor J. TRPV4 activation triggers the release of melatonin from human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2015;136:34–37.
10. Zawilska J. Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the goose pineal gland, retina, and plasma. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;134:296–302.

Gonzalo Carracedo^{a,b,*}, Carlos Carpena^c, Pablo Concepción^c, Víctor Díaz^c, Miguel García-García^c, Nahla Jemni^c, Victoria Eugenia Lledó^c, Marina Martín^c, Cristina Pastrana^c, Raquel Pelissier^c, Albena Veselinova^c, Xiaoyu Wang^c, Jesus Pintor^a

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology IV, Faculty of Optics and Optometry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^b Department of Optics II (Optometry and Visión) and Molecular Biology IV, Faculty of Optics and Optometry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^c Master of Optometry and Vision, Faculty of Optics and Optometry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

* Corresponding author at: Faculty of Optic and Optometry, Department Biochemistry and Molecular Biology IV, C/Arcos del Jalon 118, 28037 Madrid, Spain.
E-mail address: jgcarrac@ucm.es (G. Carracedo).

2.2. YELLOW FILTER EFFECT ON MELATONIN SECRETION IN THE EYE: ROLE IN IOP REGULATION



Current Eye Research



ISSN: 0271-3683 (Print) 1460-2202 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/icey20>

Yellow Filter Effect on Melatonin Secretion in the Eye: Role in IOP Regulation

Victoria Eugenia Lledó, Hanan Awad Alkozi & Jesús Pintor

To cite this article: Victoria Eugenia Lledó, Hanan Awad Alkozi & Jesús Pintor (2019): Yellow Filter Effect on Melatonin Secretion in the Eye: Role in IOP Regulation, Current Eye Research, DOI: 10.1080/02713683.2019.1570276

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1570276>



Accepted author version posted online: 14 Jan 2019.
Published online: 24 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 42



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=icey20>



Yellow Filter Effect on Melatonin Secretion in the Eye: Role in IOP Regulation

Victoria Eugenia Lledó, Hanan Awad Alkozi, and Jesús Pintor

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Optics and Optometry, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

ABSTRACT

Purpose: Melatonin is a neurohormone mainly synthesized in the pineal gland; however, it is also present in the aqueous humor. One of melatonin's functions in the eye is the regulation of intraocular pressure (IOP). Melatonin is known to be sensitive to light. Recently, the photopigment which controls melatonin synthesis, melanopsin, was found in the crystalline lens. Therefore, light conditions are an interesting possible way of regulating melatonin levels in the aqueous humor. The current study used yellow filters, since melanopsin is activated by short wavelength (blue light).

Methods: New Zealand white rabbits were used, divided in two groups, one under controlled 12 h light/dark cycles, while the rest had their cages encased with a yellow filter (λ 465–480). IOP measurements were taken every week at the same time before they were anesthetized for aqueous humor extraction.

Results: Keeping the rabbits under the yellow filter resulted in a decrease in IOP up to $43.8 \pm 7.8\%$ after 3 weeks. This effect was reversed after the topical application of selective and nonselective melatonin receptors antagonists, 4PPDOT and luzindole. Also, blocking melanopsin by its antagonist AA92593 under white light condition decreased IOP. Finally, melatonin levels were found significantly higher in the aqueous humor of rabbits developed under yellow filter compared to controls (37.4 ± 4.2 and 15.3 ± 3.1 ng/ml, respectively).

Conclusion: Yellow filters modulate melatonin levels in the aqueous humor due to deactivating melanopsin activity. This effect leads to a decrease in IOP mediated by melatonin receptors.

ARTICLE HISTORY

Received 19 October 2018
Revised 10 December 2018
Accepted 7 January 2019

KEYWORDS

Yellow filter; intraocular pressure; melatonin; melanopsin

Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a molecule first discovered and described in the pineal gland.¹ It was classically considered to be exclusively produced by this structure until years later when melatonin synthesizing enzymes were found in several organs and structures.² Among the huge number of organs and cells producing melatonin, the eye was one of the first organs discovered to synthesize melatonin, first starting from the retina.² Afterward, the attention was attracted to several ocular structures and melatonin now is known to be synthesized in the iris, ciliary body,³ crystalline lens,^{4,5} and the lacrimal gland.⁶



In the eye, melatonin plays numerous functions. It has the ability to accelerate corneal wound healing,⁷ it serves as an antioxidant in the eye, and it protects the eye against oxidative stress due to aging or diseases.^{8–10} Moreover, melatonin lowers intraocular pressure (IOP) and participates in the physiology of the aqueous humor, as well as the pathophysiology of glaucoma.^{11,12}

Glaucoma is a multifactorial disease which results in a progressive irreversible optic neuropathy and peripheral visual field loss.¹³ It is the second leading cause of vision loss¹⁴ and it is developed as a consequence of several risk factors, the only controllable one being IOP.¹⁵ Glaucoma can be controlled through different drugs aiming to lower IOP. Nevertheless, apart from the commercially available

compounds, more substances such as melatonin and its analogs rise as a possible therapeutic agent to lower IOP and control glaucoma.¹²

Melatonin synthesis is controlled by light–darkness cycles and this is specially relevant in the eye since it is the window of the body to the outside. Several years ago, a photo pigment named melanopsin was described in a small subclass of the retinal ganglion cells. These studies showed that it participates in a nonimage forming pathway since it was active and functional in blind subjects and, moreover, in enucleated mice.^{16–18} This photo pigment is responsible for photo-entrainment, and its activation occurs by means of short wavelength light (470–480 nm) leading to melatonin suppression.¹⁹

Evidences during the last three decades have indicated that illumination, received by the eye, has an influence in many human physiological and behavioral aspects.^{20,21} For instance, light constricts the pupil, increases heart rate, body temperature, and suppresses melatonin synthesis.^{22,23} Based on these changes in the physiology carried out by light, several therapeutic applications have been developed.²⁴ For example, light has been shown to have antidepressant properties, specially for the treatment of seasonal affective disorder,^{25,26} also, a proper timed light exposure has been developed as a therapy for circadian rhythm sleep disorders and circadian disruption due to jet lag, and finally light has been used for depression treatment.^{27,28} On the other hand, short wavelength light presents some serious harm to the

CONTACT Jesús Pintor  jpintor@ucm.es  Dpto Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, C/Arco de Jálón, 118, Madrid E-28037, Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/icey.

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

2.3. MODULATION OF AQUEOUS HUMOR MELATONIN LEVELS BY YELLOW-FILTER AND ITS PROTECTIVE EFFECT ON LENS

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 221 (2021) 112248



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol



Modulation of aqueous humor melatonin levels by yellow-filter and its protective effect on lens

Victoria Eugenia Lledó^a, Hanan Awad Alkozi^a, Juan Sánchez-Naves^b, Miguel Angel Fernandez-Torres^a, Ana Guzman-Aranguéz^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Optics and Optometry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^b Department of Ophthalmology, OPHTHALMEDIC and I.P.O. Institute of Ophthalmology, Balearic Island, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Melatonin
Cataract
Diabetes
White light-emitting diode light
Filter

ABSTRACT

Melatonin is mainly secreted by the pineal gland, and it is also produced by various ocular structures such as the lens. It has been recently demonstrated that melatonin ocular synthesis can be induced by blocking the blue component of white light by means of filters. Melatonin exhibits antioxidant properties that can be useful to face light-induced oxidative stress as well as oxidative events associated to ocular pathologies like cataracts. Moreover, as oxidative stress is a main event in cataract development, changes in melatonin levels could happen and be relevant in the progression of this pathology, a subject that remains uncertain. The goal of this work was to analyze the ability of a short wavelength light blocking (yellow) filter to modulate endogenous melatonin concentration and the antioxidant and cytoprotective actions induced by yellow filter's use in lens. Furthermore, we evaluated the potential changes in aqueous humor melatonin concentration from patients with cataracts.

In human lens epithelial cells, white light-emitting diode (LED) light challenge reduced melatonin secretion, protein levels of the enzymes involved in melatonin synthesis (hydroxyindole-O-methyltransferase and unphosphorylated and phosphorylated forms of arylalkylamine *N*-acetyltransferase) and cell viability whereas increased reactive oxygen species production. Yellow filter exposure precluded melatonin secretion reduction and protected cells from oxidative damage. Consistent with cataract patient's results, significantly lower levels of melatonin were observed in aqueous humor of alloxan-induced diabetic cataract rabbits as compared to those of control rabbits. In contrast, aqueous humor melatonin levels of diabetic cataract animals maintaining in cages covered with a yellow filter resembled control values. This recovery seems to be mediated by the induction of melatonin biosynthetic enzymes protein expression. Yellow filter also preserved Nrf2 lens protein expression and superoxide dismutase protein levels and activity in diabetic animals. Modulation of endogenous ocular melatonin concentration using blocking filters might be a promising approach to prevent premature lens opacification.

1. Introduction

Melatonin is produced by the pineal gland under the control of the biologic clock and modulated by retinal light stimulation, mostly by means of the melanopsin-containing photosensitive retinal ganglion cells [1]. Melatonin production is directed by a diurnal pattern, showing a peak 3–5 h after sleep onset in darkness, with scarce release during daylight. Melatonin is also synthesized in different locations of the eye such as retina, ciliary body and lens [2]. Recently, the presence of melanopsin has been detected in the lens and the activation of this pigment by short wavelength (blue) light abolished melatonin synthesis

in lens through arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT) protein expression reduction [3]. Moreover, it has been demonstrated that it is feasible to increase endogenous aqueous humor melatonin levels by reducing the blue component of visible light by means of filters [4], although the molecular mechanism involved in this induction has not been determined. Among the functions of melatonin in the eye, and particularly in the lens, highlight their antioxidant properties. Melatonin is a reactive oxygen species (ROS) scavenger and it also promotes the expression of antioxidant-inducible cellular defense elements such as nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) [5]. Nrf2 is a transcription factor that leads to transcriptional induction of several

* Corresponding author at: Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense Madrid, C/Arcos de Jalón 118, 28037 Madrid, Spain.

E-mail address: aguzman@opt.ucm.es (A. Guzman-Aranguéz).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112248>

Received 7 March 2021; Received in revised form 10 June 2021; Accepted 20 June 2021

Available online 23 June 2021

1011-1344/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

2.4. PROTEIN MICROARRAYS FOR OCULAR DISEASES



Chapter 17

Protein Microarrays for Ocular Diseases

Guillermo Solís-Fernández, Ana Montero-Calle, Miren Alonso-Navarro, Miguel Ángel Fernández-Torres, Victoria Eugenia Lledó, María Garranzo-Asensio, Rodrigo Barderas, and Ana Guzman-Aranguez

Abstract

The eye is a multifaceted organ organized in several compartments with particular properties that reflect their diverse functions. The prevalence of ocular diseases is increasing, mainly because of its relationship with aging and of generalized lifestyle changes. However, the pathogenic molecular mechanisms of many common eye pathologies remain poorly understood. Considering the unquestionable importance of proteins in cellular processes and disease progression, proteomic techniques, such as protein microarrays, represent a valuable approach to analyze pathophysiological protein changes in the ocular environment. This technology enables to perform multiplex high-throughput protein expression profiling with minimal sample volume requirements broadening our knowledge of ocular proteome network in eye diseases.

In this review, we present a brief summary of the main types of protein microarrays (antibody microarrays, reverse-phase protein microarrays, and protein microarrays) and their application for protein change detection in chronic ocular diseases such as dry eye, age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, and glaucoma. The validation of these specific protein changes in eye pathologies may lead to the identification of new biomarkers, depiction of ocular disease pathways, and assistance in the diagnosis, prognosis, and development of new therapeutic options for eye pathologies.

Key words Protein microarrays, Ocular pathology, Dry eye, Glaucoma, Age-related macular degeneration, Diabetic retinopathy

1 Introduction

Ocular diseases are a major topic for public health. Comprehensive approaches are required to expand eye research in order to understand molecular pathway determinants in eye pathologies' progress and improve ocular diagnosis and treatment. Most of these ocular diseases are age-related conditions and their incidence has rapidly risen consistently with the world's population aging [1, 2].

The small sample volumes available and the sensitivity of traditional immunoassays (enzyme-linked immunosorbent assay or Western blot) have hampered ocular proteomic profiling analyses.

Rodrigo Barderas, Joshua LaBaer and Sanjeeva Srivastava (eds.), *Protein Microarrays for Disease Analysis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 2344, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1562-1_17, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

2.5. MELATONIN COUNTERACTS OXIDATIVE DAMAGE IN LENS BY REGULATION OF NRF2 AND NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVITY

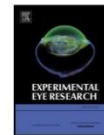
Experimental Eye Research 215 (2022) 108912



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer



Melatonin counteracts oxidative damage in lens by regulation of Nrf2 and NLRP3 inflammasome activity

Victoria Eugenia Lledó^a, Hanan Awad Alkozi^a, Juan Sánchez-Naves^b, Miguel Angel Fernandez-Torres^a, Ana Guzman-Aranguez^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Optics and Optometry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^b Department of Ophthalmology, OPTHALMEDIC and I.P.O. Institute of Ophthalmology, Balearic Island, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Lens
Oxidative stress
Melatonin
Cataract
White light-emitting diode light
NLRP3
Nrf2

ABSTRACT

Oxidative stress, generated because of an imbalance between reactive oxygen species (ROS) generation and elimination, is associated with lens damage and cataract progression. ROS generation is known to activate NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3) inflammasome, and is believed to be an important link between oxidative stress and inflammation, that is also related to cataract development. Potential oxidative hazard to the lens by white light-emitting diode (LED) light, a source of illumination commonly used nowadays, has been suggested, although available information is limited. In this work, we evaluated the cytotoxicity induced by hydrogen peroxide (an oxidative stressor agent) and white LED light in lens epithelial cells as well as melatonin ability to counteract the effects induced by them. Melatonin is a neurohormone secreted by different ocular structures that could be useful to alleviate oxidative damage induced by different oxidative stressors in lens. Particularly, the modulation of Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor)/Keap 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), an essential oxidative stress regulator, and NLRP3 activity by melatonin was evaluated in lens epithelial cells. ROS levels rose after white LED light exposure and cell viability was reduced after challenge with oxidative stressor agents. Melatonin prevented cell death triggered by hydrogen peroxide and white LED light, precluded ROS generation induced by white LED light and promoted antioxidant lens capacity through upregulation of Nrf2 protein levels and SOD activity. NLRP3, caspase-1 and IL1- β expression significantly increased in human lens cells exposed to H₂O₂ or irradiated with white LED light. Activation of NLRP3 inflammasome triggered by oxidative stressors was also abrogated by melatonin. Attenuation of inflammatory and cytotoxic effects induced by oxidative stressors provided by melatonin in lens indicate the interest of this molecule as a potential therapeutic agent for cataract prevention/management.

1. Introduction

Maintenance of integrity and survival of lens epithelial cells is pivotal for lens transparency, since these cells are responsible for metabolic activity in the lens and preserve lens homeostasis (Andley, 2008). Cataract, the leading cause of blindness in the world (Taylor, 2019), is a disease characterized by a progressive decrease in lens transparency and gradual loss of vision (Moireau and King, 2012).

Deregulation between reactive oxygen species (ROS) generation and removal leads to oxidative stress, an essential process contributing to cataract. In addition to crystallines oxidation leading to destabilization and protein aggregation, membranes lipid peroxidation, DNA damage,

and alteration in calcium homeostasis also account for oxidative stress-triggered cataract formation (Babizhayev et al., 2004; Periyasamy and Shinohara, 2017). Aging transforms the lens more inclined to oxidative damage (Babizhayev 2016; PMID: 27413694) since lens oxidation products accumulation increases, while the concentration of antioxidants factors decreases (Babizhayev, 2016; Bova et al., 2001; Brennan and Kantorow, 2009). Indeed, with the ageing of the world's population, the cataract incidence is expected to follow rising (Hashemi et al., 2020).

ROS molecules include hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and superoxide radical. Visible and UV light are relevant exogenous ROS production sources (Ivanov et al., 2018). Epidemiological studies reported a link between accumulative sun light exposure and cataract

* Corresponding author. Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense Madrid, C/Arco de Jalón 118, 28037, Madrid, Spain.

E-mail address: aguzman@opt.ucm.es (A. Guzman-Aranguez).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108912>

Received 16 October 2021; Received in revised form 19 December 2021; Accepted 22 December 2021

Available online 26 December 2021

0014-4835/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

