

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

**“ MODULACIÓN DE INDICADORES REDOX Y LA VIABILIDAD CELULAR DEL  
EXTRACTO DE *Bucida buceras* SOBRE CÉLULAS HUMANAS DEL EPITELIO  
PIGMENTARIO DE LA RETINA INDUCIDAS A UN ESTRÉS OXIDATIVO”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Daniela Fernández Angulo

Hermosillo, Sonora

Abril, 2015

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Investigaciones en Bioactivos y Alimentos Funcionales (LIBAF) de Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V., bajo la dirección del Dr. Simon Bernard Iloki Assanga y la M.C. Lidianys Maria Lewis Lujan.

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Daniela Fernández Angulo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.



---

Dr. Simon Bernard Hoki Assanga

Director de Tesis



---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Sinodal Secretario



---

M.C. Lidianys María Lewis Lujan

Sinodal



---

Dra. Nohemí Gámez Meza

Suplente

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por confiar en mi decisión y apoyarme incondicionalmente en cada una de ellas. Por estar siempre pendiente de que no me faltara nada y brindarme más de lo necesario.

A mi hermana al igual que mis padres siempre velando por mi bienestar y ofreciéndome su ayuda.

Y a Dios por permitirme llegar hasta esta meta de muchas y por elegirme la maravillosa familia con la que cuento por que todos mis pasos son gracias a ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a Dr. Iloki y a M.C. Lidianys Lewis, por todas sus enseñanzas, consejos e infinita paciencia durante tanto tiempo, por su gran inteligencia y por brindarme su amistad.

A mis compañeras del Laboratorio de Investigación de Bioactivos y Alimentos Funcionales por todo su apoyo, valiosos consejos y por aportar sugerencias y comentarios importantes para la tesis, también por compartir conmigo momentos divertidos.

Al Dr. Jose Luis Rubio, a Ernesto Rubio y al Ing. Oscar Davila Rubio por darme una valiosa oportunidad de unirme al grupo de trabajo de Rubio Pharma.

A mis sinodales de la Universidad de Sonora las doctoras Nohemi Gamez y Guadalupe Burboa, por aceptar y confiar en nuestro trabajo.

A mis compañeros y amigos cercanos durante la universidad y realización de mi tesis: Ana Karen, Berna, Celso, Chary, Elianna, Javito, Laura, Leo, Qera, al grupo de los comiditas, a los niños tesistas, a Martita, Ines, Alberto, Jorge y Miguelito a todos gracias por momentos de compañerismo y amistad.

A mi familia: Angulo, Fernández, Rentería, por estar pendiente y siempre preocupados por mis estudios y darme apoyo siempre.

## CONTENIDO

FORMATO DE APROBACIÓN .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
CONTENIDO .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	4
II.1. Desequilibrio Redox.....	4
II.1.1 Fuentes endógenas y exógenas de especies reactivas del oxígeno (EROs) .....	5
II.1.1.1. Fuentes endógenas .....	5
II.1.1.1.1. NADPH oxidasas.....	7
II.1.1.1.2. Xantina oxidasa .....	8
II.1.1.1.3. Óxido nítrico sintetasa (NOS) .....	9
II.1.1.1.4. Lipoxigenasas .....	9
II.1.1.1.5. Mieloperoxidasas .....	10
II.1.1.1.6. Monoamino oxidasa .....	10
II.1.1.1.7. Generación de ERO mediada por metales .....	11
II.1.1.2. Fuentes exógenas.....	11
II.1.1.2.1. Medicamentos.....	12
II.1.1.2.2. Radiaciones.....	12
II.1.1.2.3. Humo del cigarro .....	12
II.1.1.2.4. Ozono.....	13
II.1.1.2.5. Luz visible .....	13
II.1.2. Rol fisiológico y patológico de las EROs en las funciones celulares .....	14
II.1.2.1. Peroxidación de lípidos .....	16
II.1.2.2. Oxidación de proteínas .....	18
II.1.2.3. Oxidación del ADN.....	19
II.1.3. Mecanismos antioxidantes del sistema de defensa .....	20
II.1.3.1. Mecanismos antioxidantes enzimáticos.....	20
II.1.3.2. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.....	22
II.1.3.3. Mecanismo antioxidante según vía de entrada .....	28
II.1.4. EROs y enfermedades .....	29

II.2. Anatomofisiología Ocular .....	30
II.2.1. Estructuras anatómicas del ojo .....	30
II.2.2. Cultivo Celular ARPE-19 (ATCC 2302) .....	32
II.2.3. Patologías oculares asociadas al estrés oxidativo .....	33
II.3. Métodos de Inducción al Reto Oxidativo con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
II.3.1. Métodos de adición al medio .....	38
II.3.2. Métodos enzimáticos extracelulares de generación del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
II.3.3. Método endógeno de producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
II.4. <i>Bucida buceras</i> .....	42
III. JUSTIFICACIÓN .....	44
IV. HIPÓTESIS .....	45
V. OBJETIVOS .....	46
V.1. General .....	46
V.2. Específicos .....	46
VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	47
VI.1. Cultivo Celular .....	47
VI.2. Diseño Experimental para la Inducción del Estrés Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	47
VI.2.1. Método de Adición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al Medio de Cultivo .....	47
VI.3. Método de Generación Enzimática Continua Exógena del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por Glucosa Oxidasa (GOx) .....	49
VI.3.1. Medición de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el medio celular .....	49
VI.3.2. Ensayo de proliferación celular (MTT) .....	50
VI.3.3. Medición de Apoptosis / Ensayo Caspasa-3 .....	50
VI.4. Actividad Antioxidante del Extracto de <i>Bucida buceras</i> .....	51
VI.4.1. Capacidad de secuestro del radical DPPH .....	51
VI.4.2. Ensayo de Inhibición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	52
VI.4.3. Poder reductor del hierro férrico (FRAP) .....	52
VI.4.4. Preparación de lisados celulares de ARPE-19 .....	52
VI.5. Indicadores del Balance Redox Celular .....	53
VI.5.1. Cuantificación del glutatión reducido (GSH) .....	53
VI.5.2. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) .....	53
VI.5.3. Ensayo de actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) .....	54
VI.5.4. Determinación de la proteína total por el método de Bradford .....	54



VI.5.5. Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	54
VI.5.6. Imágenes microscópicas	55
VI.5.7. Análisis Estadístico	55
VII. RESULTADOS	57
VII.1. Evaluación Cinética y Tóxica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en un Modelo de Adición en Pulso	57
VII.1.1. Efecto del suero fetal bovino (SFB) sobre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57
VII.1.2. Efecto del tiempo sobre estabilidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en pulso	58
VII.1.3. Actividad enzimática de la catalasa (CAT)	59
VII.1.4. Velocidad de descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60
VII.1.5. Influencia del número de células (ARPE-19) sobre el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	61
VII.1.6. Citotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en pulso por MTT	65
VII.2. Evaluación Cinética y Tóxica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en un Modelo de Generación Enzimática Continúa con Glucosa oxidasa (GOx)	69
VII.2.1. Comportamiento de la GOx en el medio en ausencia y presencia de ARPE-19	69
VII.2.2. Citotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> enzimático por MTT	72
VII.3. Evaluación de la Defensa Antioxidante Intracelular por <i>Bucida buceras</i>	73
VII.4. Evaluación del glutatión reducido (GSH), enzimas antioxidantes: catalasa y glutatión peroxidasa y Poder reductor (FRAP)	77
VII.4.1. GSH	77
VII.4.2. CAT y GPx	80
VII.4.3. FRAP	82
VII.5. Efecto protector de <i>Bucida buceras</i> sobre el daño tóxico inducido por la adición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84
VIII. DISCUSIÓN	90
VIII.1. Evaluación Cinética y Tóxica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en un Modelo de Adición en Pulso	90
VIII.1.1. Efecto del suero fetal bovino (SFB) sobre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90
VIII.1.2. Efecto del tiempo sobre estabilidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en pulso	90
VIII.1.4. Velocidad de descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	91
VIII.1.5. Influencia de las células (ARPE-19) sobre el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	91
VIII.1.6. Citotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en pulso por MTT	93
VIII.2. Evaluación Cinética y Tóxica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en un Modelo de Generación Enzimática Continua con Glucosa Oxidasa (GOx)	96
VIII.2.1. Comportamiento de la GOx en el medio en ausencia y presencia de células ARPE-19	96
VIII.2.2. Citotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> enzimático por MTT	97

VIII.3. Evaluación del Glutati3n Reducido (GSH), Enzimas Antioxidantes: Catalasa y Glutati3n Peroxidasa y Poder Reductor (FRAP) .....	98
VIII.3.1. GSH.....	98
VIII.3.2. CAT y GPx .....	100
VIII.4. Efecto protector de <i>Bucida buceras</i> sobre el da3o t3xico inducido por la adici3n del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	100
IX. CONCLUSIONES .....	103
X. RECOMENDACIONES .....	104
XI. LITERATURA CITADA.....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Determinaciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en DMEM en presencia y ausencia de suero y en PBS	57
Figura 2	Reducción del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> adicionado en pulso a un medio de cultivo D10 y DMEM sin presencia de ARPE-19	58
Figura 3	Descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en PBS por catalasa	59
Figura 4	Descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ausencia o presencia de ARPE-19 en medio con suero y sin suero	60
Figura 5	Concentración del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el tiempo en medio libre de suero y con suero en presencia de ARPE-19	62
Figura 6	Influencia de la concentración celular sobre la eliminación del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	64
Figura 7	Citotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en pulso	66
Figura 8	Influencia del tiempo de incubación sobre la acción citotóxica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ARPE-19	68
Figura 9	Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el medio de cultivo con y sin ARPE-19, generado por glucosa oxidasa (GOx) en 1 hora	69
Figura 10	Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el medio de cultivo con y sin ARPE-19, generado por glucosa oxidasa (GOx) en 48 horas	71
Figura 11	Citotoxicidad en ARPE-19 en 48 horas en GOx	72
Figura 12	Poder antioxidante y actividad de secuestro del radical DPPH de <i>Bucida buceras</i>	75
Figura 13	Efectos de la GOx y adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre el glutatión reducido (GSH)	78
Figura 14	Diagrama del sistema redox del glutatión	80
Figura 15	Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por GOx y pulso en co-tratamiento con <i>Bucida buceras</i>	81
Figura 16	Efecto del co-tratamiento de <i>Bucida buceras</i> en el cultivo ARPE-19 en GOx y pulso sobre la capacidad antioxidante evaluada por FRAP	83
Figura 17	Efecto protector de <i>Bucida buceras</i> sobre la muerte celular	85
Figura 18	Efecto de <i>Bucida buceras</i> sobre el daño a la proteína	86
Figura 19	Actividad de la Caspasa-3 inducida por GOx y pulso sobre ARPE-19 a 24 horas	87
Figura 20	Visión esquemática de los efectos protectores del extracto de <i>Bucida buceras</i> sobre ARPE-19	89

## RESUMEN

El estrés oxidativo se define como un estado de desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes provocando efectos adversos al favorecer los procesos de oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes. Un desequilibrio de este tipo da a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) como pueden ser: radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), entre otros. Las ERO perjudican las funciones fisiológicas de las células del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19), que se conocen como una de las principales causas de patologías oculares.

En el presente trabajo se utilizó el extracto de *Bucida buceras* como antioxidante el cual se usó como co-tratamiento para la prevención del daño por  $H_2O_2$ . El propósito de este estudio fue explorar los efectos retinoprotectores del extracto después de la adición simple del  $H_2O_2$  cuya concentración del oxidante en el medio no es mantenida, por ello también se usó la generación continua de  $H_2O_2$  utilizando glucosa oxidasa (GOx) en células ARPE-19.

El objetivo principal fue evaluar y comparar la modulación de indicadores redox y de viabilidad celular del extracto de *Bucida buceras* sobre células humanas del epitelio pigmentario de la retina inducido a un estrés oxidativo. Para ello se evaluaron, la actividad antioxidante por el método colorimétrico de captura del radical libre DPPH, el poder reductor por el ensayo de FRAP, el glutatión reducido, las enzimas antioxidantes, catalasa y glutatión peroxidasa, y también la viabilidad celular del extracto sobre las células ARPE-19 por medio de la actividad proliferativa, a través del método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio MTT.

Los resultados mostraron que *Bucida buceras* presenta capacidad retino-protectora dado su potencial de disminuir el efecto tóxico inducido por el  $H_2O_2$  y recuperar los sistemas de defensa no enzimático y enzimático. Estos resultados sugieren que *Bucida buceras* puede proteger las células ARPE-19 contra las patologías oculares asociadas con el estrés oxidativo.

## I. INTRODUCCIÓN

El deterioro de la homeostasis redox normal y la consecuente acumulación de biomoléculas oxidadas ha sido vinculada a una amplia variedad de enfermedades (desórdenes cardiovasculares y neurológicos, diabetes, obesidad, síndrome metabólico, cáncer, enfermedades oculares, etc). En cuanto al sistema visual, también se han implicado las especies reactivas del oxígeno (EROs) en la etiopatogenia de diversos procesos oftalmológicos, principalmente las cataratas, degeneración macular asociada a la edad, vítreo-retinopatías, retinopatía diabética y glaucoma (Miranda et al., 2010; Alghadyan, 2011; Peters et al., 2013; Yu et al., 2013).

Aunque las especies reactivas del oxígeno (EROs) son mediadores bien establecidos del daño oxidativo y de la muerte celular, los mecanismos por el cual desencadenan específicamente las modalidades de muerte celular y los requerimientos esenciales de este fenómeno son en gran parte desconocidos. Las EROs son generadas continuamente y subsecuentemente transformadas y destoxificadas, como una consecuencia del metabolismo aerobio. Tradicionalmente vistos como agentes nocivos, las especies reactivas del oxígeno también funcionan como moduladores de sincronización de varios procesos biológicos, incluyendo la señalización, proliferación y diferenciación celular (Finkel, 2011; Murphy et al., 2011; Zhu et al., 2012).

Esta aparente paradoja apunta a las EROs como moléculas de doble efecto en el cruce de señalización del estrés, una intrínseca dicotomía que ha sido sujeta a extensiva investigación (Dickinson y Chang, 2011). Mientras una transitoria y controlada generación de EROs regula ciertos procesos fisiológicos, una desbalanceada y prolongada producción de especies reactivas puede causar estrés oxidativo. Uno de los principales resultados del estrés oxidativo constituye el daño a biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) que contribuye a la patogénesis de un amplio rango de enfermedades y al envejecimiento celular (Pan et al., 2009). Algunos productos oxidados de lípidos (isoprostanos y malondialdehído), ADN (8-oxo-7,8 dihidro-2 desoxyguanosina) y de proteínas (productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP)) son generalmente monitoreados para evaluar el estrés oxidativo *in vivo*.

Como una primera defensa contra el estrés oxidativo, la célula posee un rango de compuestos antioxidantes (vitaminas E, C, carotenoides, coenzima Q, glutatión, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos) y enzimas (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR)), que funcionan para mantener bajo los niveles de radicales libres y reactivos oxidantes (Pickering et al., 2013).

Los antioxidantes fenólicos, vitaminas y fitocompuestos reducen el estrés oxidativo protegiendo las células contra efectos adversos. Muchos de los antioxidantes en alimentos y bebidas proveen protección celular y tisular contra el daño oxidativo mediante la inducción de una defensa antioxidante endógena.

Entre las varias EROs, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es estable y puede alcanzar dianas moleculares distantes de su sitio de generación (Stone and Yang, 2006; Veal et al., 2007). Este puede activar/modular las vías de transducción de señales y también inducir muerte celular por apoptosis o necrosis por mecanismos que aún no están bien comprendidos. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es especialmente sensible al daño oxidativo por  $H_2O_2$  provocando la ruptura de simples y dobles cadenas (Barbouti et al., 2002; Ott et al., 2007). La extensión del daño al ADN induce muerte celular. Mientras que a niveles nanomolares el peróxido de hidrógeno es un estimulante del crecimiento y proliferación celular, a concentración micromolar causa transitorias paradas del crecimiento e induce a alteraciones en la expresión de genes que conlleva a adaptaciones protectoras (Burdon, 1995; Wiese et al., 1995; Pickering et al., 2012). A niveles milimolar es un oxidante tóxico que causa un franco estrés oxidativo. Moderadas concentraciones de  $H_2O_2$  puede resultar en apoptosis mientras que altas dosis preferencialmente induce necrosis.

Numerosos estudios han analizado la respuesta de los cultivos celulares al  $H_2O_2$  cuando es adicionado al medio de cultivo como simple o repetidos pulsos (Sobotta et al., 2013; Pickering et al., 2013; Panieri et al., 2013). Usualmente el propósito de estos experimentos es investigar la respuesta celular al estrés oxidativo como puede ocurrir naturalmente en condiciones de patologías crónicas. Muchos de estos estudios han sido conducidos por adición de  $H_2O_2$  diluido al medio de cultivo celular (tratamientos por pulsos o bolos) asumiendo que estos al menos parcialmente mimetizan condiciones y respuestas que pueden ocurrir *in vivo*.

Debido a que el  $H_2O_2$  es generado continuamente *in vivo* a niveles de “estado estacionario” fluctuante alrededor de las concentraciones submicromolar (Gardner et al., 1997; Sobotta et al., 2013), la exposición celular a un persistente flujo representa un método de liberación que se asemeja a condiciones patofisiológicas. Situaciones *in vivo* pueden ser mejor representadas por prolongadas exposiciones (varias horas) a concentraciones muy bajas (en el rango de micromolares o submicromolar) del  $H_2O_2$  exógeno. Una alternativa a la inestabilidad de los tratamientos en pulso es el método acoplado a una enzima/sustrato que permite la generación extracelular continua del  $H_2O_2$ . Los métodos de glucosa/glucosa oxidasa y xantina/xantina oxidasa han sido usados para la generación continua del oxidante en líneas celulares (Kaczara et al., 2010; Panieri et al., 2013). El  $H_2O_2$  exógeno es degradado por catalasa y peroxidasas celulares. Un sistema acoplado a dos enzimas: glucosa oxidasa/catalasa (GOx/CAT) permite la exposición a un “estado estacionario” con niveles bajos de producción del  $H_2O_2$  (Sobotta et al., 2013).

Evidencias acumuladas sugieren que la respuesta celular al  $H_2O_2$  depende no solamente de su efectiva concentración a niveles de estado estacionario, sino también de su sitio subcelular de generación/distribución. Para la generación endógena de  $H_2O_2$  se ha utilizado antimycin A. Este es un inhibidor selectivo del complejo III de la cadena de transporte mitocondrial que estimula a la mitocondria a producir anión superóxido que resulta efectivamente convertido en detectables niveles de  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa-Mn mitocondrial (Panieri et al., 2013).

La estimación de la contribución de las EROs a los procesos celulares es complicada debido a algunas limitaciones técnicas que han sido parcialmente superadas. En nuestro estudio las células humanas del epitelio pigmentario de la retina serán expuestas a concentraciones extracelulares del peróxido de hidrógeno por adición del oxidante al medio de cultivo o por generación enzimática continua con glucosa oxidasa induciendo al estrés oxidativo tales como: glutatión reducido, poder reductor, contenido de peróxido y actividad enzimática por medio de catalasa y glutatión peroxidasa, el impacto sobre la viabilidad celular y marcadores del estrés oxidativo serán evaluados.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Desequilibrio Redox

Las reacciones biológicas de oxidación/reducción (redox) se encuentran poco comprendidas a pesar de su gran importancia en muchos procesos fisiológicos y patológicos (Valko et al., 2007; Sarsour et al., 2009). El estado intracelular redox, el cual se refiere a la relación reversible de una forma oxidada a su forma reducida de una pareja específica mantiene la homeostasis celular a través del balance de oxidantes y antioxidantes. Estas reacciones normalmente regulan el tono vascular (Faraci, 2006), la activación de plaquetas (Freedman, 2008), y la respuesta inmune (Forman y Torres 2002). Cuando la homeostasis redox está comprometida y persiste el estrés oxidativo consecuencias patológicas involucran a varios sistemas (cardiovascular, pulmonar, renal, gastrointestinal, hepático y neurológico), así como enfermedades oculares, metabólicas e inflamatorias.

El estrés oxidativo puede ser definido como un estado de desequilibrio hacia los factores que generan especies reactivas del oxígeno y de nitrógeno (ej. radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxilo, óxido nítrico, peroxinitrito, entre otros) y el debilitamiento de factores antioxidantes que protegen a las macromoléculas celulares de estas especies reactivas (Mittler et al., 2011; Styskal, et al., 2012; Lee et al., 2012; Pickering et al., 2013; Panieri et al., 2013). Dentro de estas se destacan antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos endógenos tales como glutatión, ácido úrico, coenzima Q y antioxidantes exógenos como los factores dietarios: vitaminas y polifenoles (Pickering et al., 2013).

Aunque las especies reactivas del oxígeno (EROs) son mediadores bien establecidos del daño oxidativo y de la muerte celular, los mecanismos por el cual desencadenan específicamente las modalidades de muerte celular y los requerimientos esenciales de este fenómeno son en gran parte desconocidos. Las EROs tradicionalmente vistos como agentes nocivos, también funcionan como moduladores de sincronización de



varios procesos biológicos, incluyendo la señalización, proliferación y diferenciación celular (Finkel, 2011; Murphy et al, 2011; Zhu et al., 2012).

Esta aparente paradoja apunta a las EROs como moléculas de doble efecto en el cruce de señalización del estrés, una intrínseca dicotomía que ha sido sujeta a extensiva investigación (Dickinson y Chang, 2011). Mientras una transitoria y controlada generación de EROs regulan procesos fisiológicos, una desbalanceada y prolongada producción de especies reactivas puede causar estrés oxidativo. Uno de los principales resultados del estrés oxidativo constituye el daño a biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) que contribuye a la patogénesis de un amplio rango de enfermedades y al envejecimiento celular (Pan et al., 2009). En cuanto al sistema visual, también se han implicado las especies reactivas del oxígeno (EROs) en la etiopatogenia de diversos procesos oftalmológicos, principalmente las cataratas, degeneración macular asociada a la edad, vítreo-retinopatías, retinopatía diabética y glaucoma (Miranda et al., 2010; Alghadyan, 2011; Peters et al., 2013; Yu et al., 2013).

### **II.1.1 Fuentes endógenas y exógenas de especies reactivas del oxígeno (EROs)**

#### **II.1.1. 1. Fuentes endógenas**

Las especies reactivas del oxígeno es un término que describe ampliamente una variedad de moléculas y radicales libres (especies químicas con uno o más electrones desapareados) derivados del oxígeno molecular. Las EROs presentan distintas propiedades biológicas, las cuales incluyen reactividad química, tiempos de vida media y solubilidad lipídica. Su reactividad determina la toxicidad, elevada reactividad resulta en tiempos de vida media pequeños ( $t_{1/2}$ ) y difusión limitada (anión superóxido tiene  $t_{1/2} = 10^{-6}$  s, el radical hidroxilo  $10^{-9}$  s) (Mittler et al., 2011). El término ERO es frecuentemente usado para incluir las especies radicalarias y no radicalarias. Los radicales libres en los organismos incluyen hidroxilo (OH $\cdot$ ), superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico (ON $\cdot$ ) y peroxy (RO $_2^{\cdot}$ ). El anión

peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) y ozono ( $\text{O}_3$ ) no son radicales libres, pero pueden ser fácilmente convertidos a radicales libres en reacciones biológicas.

Los factores que generan las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) existen como productos del normal proceso fisiológico y de varias fuentes externas. Las mitocondrias constituyen una fuente principal de generación de ERO, específicamente de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y del radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) (Hartwig, 2013). Las reacciones que generan energía (ATP) en la mitocondria requieren electrones desde sustratos reducidos al pasar por los diferentes complejos de la cadena de transporte mitocondrial. Se estima que entre el 0.2-2% del  $\text{O}_2$  consumido en las mitocondrias es univalentemente reducido a superóxido desde los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. La mitocondria produce de 2-3 mmol de superóxido/min por miligramo de proteína (Treberg et al., 2010). Este radical es el principal e inicial arquitecto de la señalización y daño de las ERO (Chance et al., 1979; Cardenas y Davies, 2000). Al reaccionar con el agua, el superóxido puede producir perhidroxyl radical, el cual ha sido implicado en el daño a lípidos y oxidación a proteínas (Cohen, 1994). Sin embargo, superóxido es usualmente convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la superóxido dismutasa que se encuentra en la matriz y espacio inter-membrana de la mitocondria.

El uso de  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones permite la obtención de mayor cantidad de energía libre generada a partir de la oxidación de nutrientes. En los procesos de oxidación biológica una gran cantidad de esta energía libre no es liberada como calor, sino que es capturada en enlaces de alta energía como los de adenosín trifosfato (ATP). Consecuentemente la adaptación evolutiva del oxígeno como el aceptor final de electrones ha permitido entre otros beneficios lograr multicelularidad, sistemas nerviosos más complejos y un rápido y eficaz movimiento mecánico. Sin embargo los beneficios del metabolismo aerobio han acarreado un costo, conllevando a la formación de especies reactivas del oxígeno (Zimniak, 2011). Un incremento en la generación de EROs se produce cuando el potencial redox mitocondrial es significativamente reducido como ocurre durante la hipoxia o significativamente oxidado. En este último caso el incremento de los niveles de EROs resulta por una depleción de la capacidad antioxidante como consecuencia de la disminución en los niveles de NADPH (Aon et al., 2010).

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser distinguidas por sus fuentes de generación endógena o exógena. La cadena respiratoria mitocondrial, las reacciones metabólicas de la citocromo P450 y la respuesta inflamatoria son fuentes endógenas importantes. Las células inmune incluyendo macrófagos y neutrófilos, así como el microsoma generan ERO intracelularmente (Li et al., 2011; Geering y Simon, 2011). Conjuntamente con la respiración mitocondrial el anión  $O_2^-$  es generado por varias reacciones metabólicas entre las que se incluyen las NADPH oxidasas (Nox's), xantina oxidasa (XO) produce  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , óxido nítrico sintetasa, lipoxigenasas y mieloperoxidasas.

#### **II.1.1.1. 1. NADPH oxidasas**

Las enzimas NADPH oxidasas (Nox) son una familia de hemo-proteínas cuya función primaria es transportar los electrones desde las NADPH al oxígeno con la producción del anión  $O_2^-$ . La familia Nox comprende siete miembros cada uno con distinta isoforma catalítica denominadas Nox 1-5, doble oxidasa1 y 2 (Duox1, Duox2). La activación de las NADPH oxidasas (Nox1 y Nox2) generan  $O_2^-$  mediante la transferencia de dos electrones de NADPH en el citosol a la FAD (Bedard y Krause, 2007). En contraste, Nox4 predominantemente produce  $H_2O_2$  y se expresa en muchos tipos de células no fagocíticas ubicadas en el retículo endoplasmático, el espacio perinuclear y en el núcleo (Sturrock, et al., 2007).

La expresión de las sub-unidades catalíticas de las Nox varían entre diferentes tipos de células y según el tejido/órgano (Lambeth, 2004; Bedard y Krause, 2007). Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 pueden estar situados ya sea en la membrana plasmática o dentro de la célula y por lo tanto pueden generar ERO extracelular o intracelular (Lassègue y Giendling, 2010).

Las evidencias sugieren que los miembros de la familia Nox/Duox son importantes productoras de especies reactivas, no solamente a partir de células fagocíticas, sino también de células no-fagocíticas, aunque las funciones biológicas de las Nox/Duox en células no fagocíticas son mas desconocidas.

La oxidasa de fagocitos (neutrófilos y macrófagos) es un complejo multicomponente que cataliza la formación de  $O_2^-$  durante el proceso de fagocitosis (Vignais, 2002). Las oxidasas en células no-fagocíticas han sido identificadas con la denominación de Nox1. A diferencia de las oxidasas de fagocitos, las oxidasas no-fagocíticas están activas durante el metabolismo normal y generan bajos niveles de ERO, incluso en ausencia de estimulación extrínseca: sin embargo, sus generaciones de ERO se incrementan en respuesta a la estimulación agonista.

Debido a la excesiva generación de ERO a partir de las Nox que contribuyen a la progresión de un amplio espectro de enfermedades. La familia Nox es una excelente diana terapéutica, en la que el bloqueo selectivo de las isoformas individuales de las Nox constituye un área de intensa investigación científica. Hasta la fecha, se han identificado varios inhibidores potenciales, sin embargo, la mayoría de ellos parecen presentar una baja selectividad, potencia y biodisponibilidad (Jaquet et al., 2009).

### **II.1.1. 1. 2. Xantina oxidasa**

La xantina oxidasa (XO) y la xantina deshidrogenasa (XDH) son iso-enzimas interconvertibles de la enzima xantina oxidorreductasa (XOR) y catalizan los dos pasos finales de la vía de degradación de las purinas (adenosina). Las reducciones de hipoxantina y xantina en ácido úrico, producen  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Ambas formas de las enzimas actúan como las NADPH oxidasas generando EROs, que pueden jugar un papel importante en lesiones celulares en condiciones de aumento de la concentración de NADPH (Nishino *et al.*, 2008; Maia et al., 2005). Las XOR tienen una amplia distribución tisular, pero sus niveles en plasma en mamíferos sanos son bajos, aumentando considerablemente en condiciones fisiopatológicas (Martin et al., 2004).

### **II.1.1.1. 3. Óxido nítrico sintetasa (NOS)**

La familia de las enzimas NOS generan óxido nítrico ( $\text{ON}^\cdot$ ) a partir de la conversión de L-arginina a L-citrulina. Las NOS son oxidoreductasas homodiméricas en la que el dominio que contiene hemo oxigenasa está vinculado a NADPH-citocromo P450 reductasa como el dominio diflavin (Marletta, 1994). Tras la activación, el dominio de flavoproteína transfiere electrones desde NADPH a FMN, lo que reduce el hierro hemo y resulta en la activación de  $\text{O}_2$  seguido de la oxidación del átomo de nitrógeno de la guanidina de L-arginina, formando  $\text{ON}^\cdot$  y citrulina (Channon, 2004).

Tres isoformas de NOS están presentes de las cuales neuronal/endotelial (nNOS) y eNOS son constitutivas y reguladas por la actividad a nivel postraduccional. La isoforma iNOS se produce en respuesta a las citoquinas proinflamatorias y está regulada principalmente a nivel transcripcional (Knowles y Moncada, 1994; Nathan, 1995). En condiciones normales de eNOS ejerce efectos antiaterogénicas en la pared vascular, la adhesión de leucocitos y agregación de plaquetas (D'Souza et al., 2003). El  $\text{ON}^\cdot$  derivado de eNOS regula el tono muscular y la presión arterial. Sin embargo, cuando la actividad de la eNOS se desacopla como sucede en condiciones fisiopatológicas (disfunción endotelial) aumenta la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Channon, 2004). La evidencia reciente indica que la nNOS tiene una función protectora contra la aterosclerosis (Kuhlencordt et al., 2006). Por otra parte, un aumento rápido y brusco en la generación de  $\text{ON}^\cdot$  por la regulación positiva de la expresión y actividad de iNOS está vinculado a patologías cardiovasculares (Feng et al., 2001). La evidencia reciente indica que la nNOS tiene una función protectora contra la aterosclerosis (Kuhlencordt et al., 2006).

### **II.1.1.1. 4. Lipoxigenasas**

Las lipoxigenasas (LOXs) son dioxigenasas que contienen hierro no hemo y que oxidan los ácidos grasos poliinsaturados liberados de la membrana celular en condiciones inflamatorias a hidroperóxidos derivados de ácidos grasos, por lo que se les considera otra fuente importante de la producción de ERO. Los seres humanos tienen seis genes

(denominados "ALOX" por convención, para lipoxigenasa del ácido araquidónico), mientras que los ratones tienen siete genes funcionales (Funk et al., 2002). Las enzimas LOX son nombradas por el número de átomo de carbono de los ácidos grasos poliinsaturados que se oxidan (por ejemplo, 5-LOX). 5-LOX cataliza la transformación del ácido araquidónico libre a leucotrieno A<sub>4</sub>, que en la hidrólisis rinde leucotrieno B<sub>4</sub>, un potente quimio atrayente y activador de leucocitos (Back, 2009).

#### **II.1.1.1. 5. Mieloperoxidasas**

Las mieloperoxidasas (MPO) están presentes en los fagosomas de los neutrófilos y de los monocitos y son responsables de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos. Las MPO generan varios oxidantes que inician la peroxidación de lípidos e inducen la modificación de residuos de aminoácidos en las proteínas, incluyendo la nitración, cloración, y carbamilación (Thomas et al., 2008). Las MPO inducen la carbamilación de proteína en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sitios de inflamación y en las placas ateroscleróticas. Las acciones pro inflamatorias y pro aterogénicas de MPO pueden incluir la promoción del reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación (Klinke et al., 2011). La evidencia sustancial sugiere también que MPO convierte el nitrito, un producto final del metabolismo del NO<sup>-</sup> probablemente en dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), en una reacción dependiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et al., 2002). El NO<sub>2</sub> generado promueve la peroxidación de los lípidos de la LDL (Podrez et al., 1999).

#### **II.1.1.1. 6. Monoamino oxidasa**

La monoamino oxidasa existe en dos isoformas (MAO A y MAO B) es una flavoproteína unida a la membrana externa mitocondrial y constituye otra fuente importante de ERO que cataliza la desaminación de los neurotransmisores y aminas biogénicas (Edmondson et al 2004).

### **II.1.1.1. 7. Generación de ERO mediada por metales**

Los iones metálicos producen ERO intracelularmente de una manera directa e indirecta, en donde la reacción de tipo Fenton es uno de los mecanismos más conocidos. Durante esta reacción, un ion de metal de transición reacciona con  $H_2O_2$  para generar el  $\cdot OH$ , altamente tóxico y un ion de metal oxidado. Muchos metales, tales como Fe, Cu, Cr, Co, Ni pueden generar radicales libres a través de la reacción de tipo Fenton, sus capacidades para generar radicales libres difieren entre sí (Desurmont, 1983, Shaeib et al., 2013). Los mecanismos por los cuales iones Fe o Cu libres median la generación de  $\cdot OH$  bajo condiciones fisiológicas *in vivo* a través de la reacción de Fenton no se conocen por completo.

Otro mecanismo clave en la generación de ERO por metales es la inducida por la reacción de Haber-Weiss. En esta reacción el  $O_2^{\cdot -}$  media la generación de  $\cdot OH$  a partir del  $H_2O_2$ . Esta reacción puede implicar metales como Cr y Co. El mecanismo de generación de  $\cdot OH$  a través de la reacción de Haber- Weiss es probable que sea como la producción de ERO en la función inmune de los macrófagos durante la fagocitosis (Freeman y Crap, 1982).

### **II.1.1.2. Fuentes exógenas**

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser producidas por varios compuestos, muchos de estos xenobióticos, ejercen su efecto tóxico mediante su activación metabólica a productos intermediarios que son radicales libres. Cuando estos compuestos son reducidos por un electrón, se producen especies que reaccionan con el oxígeno molecular para formar radical superóxido y generar la molécula original. Esta reacción normalmente está catalizada por la NADPH-citocromo P-450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH (nicotinamida adeninucleotido-fosfato reducido), como dador electrónico. Si estas moléculas oxidadas se reducen de nuevo, se establece un ciclo redox en el que hay un consumo desproporcionado de oxígeno molecular de equivalentes redox, de esta manera, las especies reactivas de oxígeno que se forman dan lugar a un estrés oxidativo que provocará graves daños celulares (Gil, 2010).

#### **II.1.1.2.1. Medicamentos**

Numerosos medicamentos pueden aumentar la producción de radicales libres ya que aumentan la presencia de tensión del oxígeno. Los agentes parecen actuar de forma aditiva con la hiperoxia para acelerar la tasa de daño. Estos medicamentos incluyen antibióticos que dependen de grupos quinoides o metales con destino a la actividad, agentes antineoplásicos que poseen actividad pro-oxidante. En la adición de radicales derivados de la penicilamina, fenilbutazona pueden inactivar la proteasa y agotar el ácido ascórbico acelerando la peroxidación lipídica (Tamer et al., 2012).

#### **II.1.1.2.2. Radiaciones**

La radioterapia puede causar lesiones tisulares que son causadas por los radicales libres. La radiación electromagnética (rayos X, rayos gamma), la radiación de partículas (electrones, fotones, neutrones, partículas alfa y beta), generan radicales primarios mediante la transferencia de su energía a los componentes celulares, tales como el agua. Estos radicales primarios pueden surgir reacciones secundarias. Estas radiaciones causan la fisión heterolítica del agua para producir átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo y, en presencia de oxígeno, radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Gil, 2010).

#### **II.1.1.2.3. Humo del cigarro**

El humo del cigarro puede ser separado en dos fases, la gaseosa y la sólida o alquitrán. En la fase gaseosa se han detectado las siguientes especies reactivas: superóxidos, radicales hidroxilo y peróxido,  $H_2O_2$ , oxígeno singlete, óxido nítrico y peroxinítrico (Kodama et al., 1999).



#### **II.1.1.2.4. Ozono**

El ozono es un potente agente oxidante de los radicales libres. El ozono (O<sub>3</sub>) contiene dos electrones desapareados y se degrada bajo condiciones fisiológicas a OH, lo que sugiere que los radicales libres se forman cuando el ozono reacciona con sustratos biológicos (Tamer et al., 2012).

#### **II.1.1.2.5. Luz visible**

La luz visible reacciona con cromóforos para producir productos finales que son capaces de inducir la producción de especies reactivas del oxígeno y el daño oxidativo a las macromoléculas biológicas, lo que conduce a la disfunción celular y a la muerte celular (SanGiovanni et al., 2005).

Además, una amplia variedad de agentes ambientales incluyendo contaminantes del aire fotoquímicos como pesticidas, disolventes, anestésicos, gases de escape y la clase general de hidrocarburos aromáticos, también causan daño por los radicales libres a las células.

El ojo humano está constantemente expuesto a estos compuestos que contribuyen al daño oxidativo en los tejidos oculares. Con el tiempo, todas las estructuras oculares, de la película lagrimal de la retina, se someten a estrés oxidativo y, por lo tanto, las defensas antioxidantes de cada tejido asumen el papel de una salvaguardia contra patologías degenerativas oculares. La superficie ocular y la córnea protegen los otros tejidos oculares y están expuestos significativamente al estrés oxidativo de origen ambiental (Saccà et al., 2013).

### **II.1.2. Rol fisiológico y patológico de las EROs en las funciones celulares**

La formación de ERO es inevitable en los organismos aerobios. Al limitar la formación de ERO y reforzar las defensas anti-ERO, el estrés oxidativo puede ser minimizado, pero no eliminado. Un cierto nivel de ERO es necesario debido a su papel como mediadores en diversos procesos celulares vitales y en diferentes redes de señalización (Mittler et al., 2011). Bajo nivel de ERO es esencial para muchos procesos celulares normales, incluyendo la señalización, la adhesión, la respuesta inmune, la apoptosis y la supervivencia celular (Zhu et al., 2012). Especialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a niveles fisiológicos funciona como señalizador en varias respuestas biológicas tales como: proliferación celular, migración, supervivencia, diferenciación y expresión de genes (Rhee et al., 2000; Finkel, 2011).

Hay una clara diferencia entre el nivel de ERO requerido para mecanismos celulares básicos como la señalización celular y la excesiva producción de ERO que contribuye al estrés oxidativo. Se ha demostrado que los radicales libres desempeñan un papel importante en el sistema gluco-regulador en mamíferos. Por ejemplo, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regula la liberación de insulina estimulada por glucosa a partir de células β para modular la señalización proximal y distal de la insulina. Se ha demostrado que la estimulación de la insulina promueve la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que luego mejora la cascada de la insulina mediante la inhibición de la actividad proteína tirosina fosfatasa, que conduce a un aumento en el nivel basal de fosforilación de la proteína receptora de la insulina (Styskal et al., 2012).

El peróxido de hidrógeno se ha relacionado con la regulación redox durante la proliferación celular, la apoptosis y en los procesos inflamatorios. Algunos investigadores sugieren que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juega un doble papel en la regulación de los procesos inflamatorios, actuando tanto como un pro-inflamatorio y como agente anti-inflamatorio. Por otra parte, los procesos metabólicos celulares opuestos, tales como la proliferación celular, a bajas concentraciones, y la señalización de muerte celular en una concentración elevada. La proliferación celular normal se correlaciona con la producción de EROs endógeno a través de la activación de vías de señalización relacionadas con el crecimiento, incluyendo la proteína quinasa activada por mitógenos (Andrade et al., 2013).

El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden actuar como moléculas de señalización celular por oxidación directa o la modificación de los grupos tioles (SH) de los residuos de cisteína. La oxidación-reducción de los grupos-SH en el interior de las células, por un lado es crucial para el correcto funcionamiento de muchas enzimas. Por otra parte, las alteraciones en el estado redox puede servir como mecanismos de señalización para activar o inactivar distintas vías de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (D'Autreaux y Toledano, 2007).

Las vías de señalización celular regulada por EROs pueden ser agrupadas dentro de las que afectan la proliferación, supervivencia, diferenciación y metabolismo (e.j. tioredoxinas), las pertenecientes a las respuestas antioxidante y antiinflamatoria (factor nuclear eritroide-2/ Kelch-like protein-1 (Nrf2/Keap 1), el factor nuclear kB (NF-kB), las reguladoras de la homeostasis del hierro y, finalmente, las inducidas en respuesta al daño del ADN (e.j. p53, ATM, PARP1, ASK1) (Ray et al., 2012).

Una importante adaptación al estrés oxidativo consiste en la regulación de genes de detoxificación antioxidante. La inducción coordinada de los genes para las proteínas de fase II protege a las células contra el daño generado por el estrés oxidativo. Se han reportado más de 200 genes involucrados en la respuesta antioxidante. Dos de las vías importante son los factores de transcripción activados por reacciones óxido-reducción (Ref-1) y los factores de transcripción unido al elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés). Ambas vías juegan un rol crítico en la regulación de expresión de antioxidantes y enzimas que metabolizan xenobióticos de la fase II contribuyendo a la detoxificación y/o eliminación de estresores oxidativo ambientales y la protección de células y tejidos (Zhang et al., 2014).

Un ejemplo de proteína unida al zinc regulada por procesos redox es la proteína-53 (p53) supresora de tumor. Los genes supresores de tumores poseen función protectora que limitan el crecimiento de tumores y regulan varias actividades celulares. Cuando los genes supresores de tumores son alterados, las células pueden crecer fuera de control conduciendo al cáncer. El gen supresor de tumor p53 es el gen mutado más frecuente en cánceres humano. Este gen es conocido como el “guardián de la célula” porque regula la transcripción de varios genes por interacción directa con proteínas involucrada en la replicación, transcripción y reparación del ADN, provoca una respuesta antiproliferativa, incluyendo la parada del ciclo celular, senescencia celular y apoptosis en respuesta a varias

señales. También es activada en respuesta al estrés oxidativo, en el cual juega un rol antioxidante (Hafsi y Hainaut; 2011; Vurusaner et al., 2012).

Existen múltiples procesos celulares en los cuales p53 y EROs están involucrados. Principalmente especies reactivas celulares se encuentran incrementadas por transcripción de genes pro-oxidantes inducidos por p53 para contribuir a la muerte celular. Por otra parte, p53 participa en la expresión de algunos genes antioxidante importantes tales como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa mitocondrial demostrando la función protectora en el sistema de defensa antioxidante. En condiciones fisiológicas cantidades reducidas de p53 suprimen las EROs, mientras que elevados niveles inducen la acumulación de estas especies reactivas en respuesta al estrés celular.

Mientras el balance entre la defensa antioxidante celular y la generación de EROs es mantenida bajo condiciones metabólicas normales (homeostasis), una excesiva generación de EROs puede ocasionar un estrés oxidativo. Las investigaciones recientes sugieren que exposiciones crónicas a especies radicalarias pueden causar el desequilibrio redox por ruptura del balance entre los niveles producidos de EROs y el potencial del sistema antioxidante celular para removerlos. Un prolongado y persistente estrés oxidativo causa la activación de moléculas de señalización sensibles a reacciones de óxido-reducción. El estrés oxidativo también daña a bio-moléculas que eventualmente inducen a una variedad de enfermedades crónica-degenerativas (Lee et al., 2012). Bajo condiciones de estrés oxidativo, los radicales libres que no son reducidos o removido del ambiente celular pueden causar daños a macromoléculas celulares incluyendo a los ácidos nucleicos, la peroxidación de lípidos, la oxidación e inactivación de proteínas y enzimas. Los efectos biológicos de las EROs son dependientes de la cantidad, tipo y duración, así como de las fuentes y localización subcelular.

### **II.1.2.1. Peroxidación de lípidos**

Los lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son susceptibles a la oxidación iniciada por radicales libres y pueden participar en reacciones en cadena que aumentan el daño a las biomoléculas. El proceso en cadena de la peroxidación de lípidos

genera simultáneamente hidroperóxidos lipídicos y aldehídos de diversas longitudes de cadena (Niki, 2009; Leonarduzzi et al, 2012).

Por otra parte, la oxidación de los lípidos puede causar cambios en la estructura y la fluidez de las membranas celulares y orgánulos que son perjudiciales para los procesos y funciones celulares (Esterbauer, 1993). Esto afecta, en última instancia, las funciones celulares, aumentando aún más las concentraciones de EROs celulares. Además, la oxidación de los lípidos puede formar especies de radicales lipídicos que dañan otras macromoléculas celulares. Por ejemplo, los peróxidos de lípidos como el malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4HNE) que reaccionan tanto con el ADN y proteínas (Hartley et al., 1997).

La peroxidación enzimática y no-enzimática de AGPI genera varias especies de aldehídos reactivos, que han mostrado ejercer funciones de regulación, así como efectos perjudiciales en diversos tipos de células y órganos. Estos productos finales de la peroxidación lipídica son conocidos por ser moléculas responsables del efecto pro-aterogénico de oxLDL. Los efectos biológicos de oxLDLs están mediados a través de vías de señalización, especialmente las de receptores, proteínas quinasas, y la activación de factores de transcripción, que a su vez estimulan la expresión de genes implicados en el estrés oxidativo y en la respuesta inflamatoria durante la generación de la placa aterosclerótica (Mazière y Mazière , 2009). De hecho, el estrés oxidativo y la inflamación van de la mano, ya que el estrés oxidativo induce la producción de citoquinas inflamatorias y, las citoquinas, a su vez, inducen la producción de radicales libres.

El hidroxinonenal más representativo en los tejidos y células es 4HNE (Schneider et al., 2008). Este aldehído se ha investigado a profundidad gracias a su contribución a la patogénesis de las enfermedades humanas crónicas, y esta molécula se ha informado que poseen tanto efectos citotóxicos, como de señalización celular (Poli et al., 2008).

### **II.1.2.2. Oxidación de proteínas**

Las proteínas en particular, son susceptibles al ataque por radicales libres y EROs, que puede conducir a modificaciones oxidativas (Berlett y Stadtman, 1997). Los aumentos en la acumulación de estas formas pueden conllevar a cambios funcionales de la proteína (generalmente perjudicial) que puede alterar varios procesos fisiológicos celulares (Pierce et al., 2008). Una vez oxidadas las proteínas deben ser reparadas y, si la reparación no es posible, deben ser degradadas o eliminadas de las células para reducir al mínimo los posibles efectos negativos de estas proteínas dañadas.

Casi todos los aminoácidos son susceptibles a la modificación oxidativa por uno o más tipos de EROs. Los aminoácidos que contienen grupos-SH (cisteína y metionina) son los únicos que tienen enzimas específicas para reparar el daño oxidativo (disulfuros de cisteína, metionina). Sin embargo, la oxidación de otros aminoácidos, o daños sin resolver a la cisteína y la metionina, pueden dar lugar a restos de oxidación que no son reparados. En los casos en que la reparación no es posible, las proteínas oxidadas son generalmente marcadas para la degradación por el sistema de proteosoma o removidas a través de los procesos de autofagia. A pesar de los eficientes sistema de remoción de las proteínas oxidadas, ciertas proteínas dañadas pueden permanecer y acumularse promoviendo la disfunción celular (Berlett y Stadtman, 1997).

Las EROs dañan especialmente proteínas, porque pueden introducir modificaciones en la cadena lateral de los aminoácidos. Estas modificaciones pueden ser irreversibles, tales como la introducción de grupos carbonilo en la cadena lateral de aminoácidos (arginina, lisina, prolina y treonina). El procedimiento de carbonilación provoca disfunción de la proteína y la agregación de proteínas, que conduce a su acumulación durante el estrés oxidativo. La carbonilación de proteínas constituye un biomarcador general de la oxidación de proteínas (Nystrom, 2005; Moller et al., 2011; Hatem et al., 2014)

### II.1.2.3. Oxidación del ADN

El ADN, tanto nuclear como mitocondrial es susceptible a la oxidación, dando como resultado mutaciones con la formación de 8-hidroxiguanosina (8-OHdG). El 8-OHdG es un producto de oxidación relativamente estable y que se puede medir tanto en los tejidos y en la orina excretada, representando con precisión la cantidad de oxidación del ADN como una medida del daño al ADN (Wu et al., 2004). El ADN es especialmente sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como daño oxidativo provoca la ruptura de simples y dobles cadenas (Barbouti et al., 2002; Ott et al., 2007). La extensión del daño al ADN induce muerte celular. La oxidación del ADN ha sido fuertemente implicada en la senescencia celular, la apoptosis y el desarrollo de fenotipos de células cancerosas (Leonarduzzi et al., 2012).

Especialmente la generación de niveles elevados del daño al ADN se ha implicado en la carcinogenicidad. El daño oxidativo al ADN incluye una serie de lesiones, tales como modificaciones de bases, lesiones en el azúcar, rompimiento de hebras individuales y dobles, errores de replicación, inestabilidad genómica, enlaces cruzados ADN-proteína, y enlaces cruzados de ADN-ADN. Las principales EROs que conducen al daño del ADN son OH·, singlete del oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Entre estos, sólo el OH· es capaz de generar hebras simples en el ADN como consecuencia de la abstracción de hidrógeno de los restos de 2-desoxirribosa. (Dedon, 2008). En cuanto a los daños a una sola base del ADN, el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reacciona específicamente con la guanina, produciendo 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-Oxo-Gua). Además de los daños a una sola base, el radical OH· y otros oxidantes pueden generar radicales orgánicos capaces de reaccionar con otros constituyentes del ADN o proteínas, dando lugar a lesiones del ADN más complejas tales como enlaces cruzados-intra e inter-cadena de ADN, así como entrecruzamientos de enlaces ADN-proteína.

Los iones de metales de transición desempeñan un papel importante en la inducción del daño oxidativo. Mientras que ni el peróxido de hidrógeno ni el radical superóxido son capaces de reaccionar directamente con el ADN. En presencia de metales de transición tales como el hierro, cobre, cobalto o níquel el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se convierte en un OH· altamente reactivo, por reacciones de tipo Fenton induciendo así rupturas de la cadena de ADN. En la carcinogenicidad inducida por metal, las interacciones con las proteínas implicadas en el crecimiento celular, la apoptosis y respuesta celular al daño del ADN parecen ser de gran importancia (Hartwig, 2013).

### **II.1.3. Mecanismos antioxidantes del sistema de defensa**

Se define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Son reductores nucleófilos que directamente reaccionan con oxidantes para prevenir la oxidación de una tercera molécula (Forman et al., 2014). Un antioxidante “ideal” *in vivo* debe interceptar y detoxificar especies reactivas biológicamente importantes y debe ser activado y reciclado por procesos endógenos (Yu et al., 2012; Bian et al., 2012; Murphy, 2011).

#### **II.1.3.1. Mecanismos antioxidantes enzimáticos**

Los organismos aeróbicos son protegidos del estrés oxidativo inducido por especies reactivas del oxígeno/nitrógeno por una compleja red de defensa por múltiples antioxidantes con diversas funciones. Algunos antioxidantes son moléculas pequeñas, mientras que otros son macromoléculas tales como proteínas y enzimas. Los sistemas antioxidantes fisiológicos tienen varias líneas de defensa. En la primera línea, los antioxidantes primarios previenen la producción de EROS/ERN y otras especies reactivas, por ejemplo, el secuestro de los iones metálicos activos y la reducción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno en hidróxidos y agua, respectivamente. En este grupo se destacan las superóxido dismutasas (SOD, SOD Mn, SOD CuZn), glutatión peroxidasa dependiente de selenio (GPx Se), glutatión reductasa (GR), peroxidasas, catalasa, glutaredoxina, tiorredoxina (Trx) y proteínas que fijan metales como la ferritina y la ceruloplasmina (Gil et al., 2003).

Las superóxido dismutasas (SOD) reducen los niveles de superóxido en la célula; estas enzimas catalizan la conversión del radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Las SOD son una de las primeras líneas de defensa contra los radicales superóxido producidos por las mitocondrias durante la respiración celular y las NADPH oxidasas. Tres isoformas principales se encuentran en los mamíferos: Cu Zn CuZnSOD superóxido dismutasa (SOD 1); superóxido dismutasa dependiente de Mn



(MnSOD; SOD2), y la superóxido dismutasa extracelular (ECSOD; SOD3). Cada isoforma se localiza específicamente en diferentes compartimentos celulares con la ubicación principal de SOD1 en el citoplasma y en el espacio intermembrana mitocondrial, SOD2 en la matriz mitocondrial, y SOD3 en los fluidos extracelulares (Okado y Fridovich, 2001).

Los peróxidos, incluyendo los generados por la SOD, se convierten en agua y oxígeno en la célula principalmente por la catalasa, glutatión peroxidasa, y peroxirredoxinas. La catalasa se expresa de forma ubicua entre los tejidos de los mamíferos y se encuentra principalmente en los peroxisomas. La función catalítica primaria de la catalasa es la descomposición de peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua (Halliwell y Gutteridge, 1989). En general, las peroxidasa de glutatión (GPx) pueden reducir los peróxidos (incluyendo peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de lípidos) a formas menos tóxicas, incluyendo agua y alcoholes. Existen 8 tipos de GPxs que difieren en la localización del tejido y la especificidad de sustrato; sin embargo, sólo GPx1 y GPx4 se expresan de forma ubicua. La glutatión peroxidasa 1 (GPx1), la isoforma más abundante de los mamíferos, es responsable de gran parte de la desintoxicación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el citoplasma. GPx4 se expresa en niveles bajos, y su especificidad es para la desintoxicación de peróxidos de lípidos, incluyendo fosfolípidos hidroperóxidos e hidroperóxidos de esterios de colesterol (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las peroxirredoxinas (Prdx) son una clase de antioxidantes relativamente recién descubiertas que pueden reducir el peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, y una gama diferentes de hidroperóxidos orgánicos. Al menos 6 isoformas diferentes Prdx se han descubierto en las células de mamíferos, cada uno con localización celular específica en la mayoría de los compartimentos celulares, incluyendo citosol, núcleo, mitocondrias, y el complejo de Golgi (Wood et al., 2003). Además, las tiorredoxinas (Trx) catalizan la reducción de los enlaces disulfuro en múltiples proteínas sustrato. A través de esta reacción, TRX actúan como antioxidante a través peroxirredoxinas y mediante la reducción de disulfuros en proteínas y sulfóxidos metionina (Powis y Monfort, 2001). Hay dos formas de TRX en las células de mamíferos: La TRX1 que se encuentra principalmente en el citosol, mientras Trx2 es la forma mitocondrial. Las sulfóxido reductasas de metionina (MSR) también pueden reparar los daños de oxidación a las proteínas porque pueden reducir la forma oxidada de la metionina (sulfóxido de metionina) de nuevo a la metionina no oxidada (Stadtman, 2006).

### II.1.3.2. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos

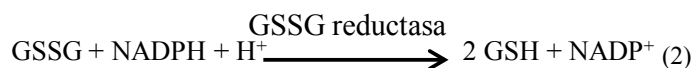
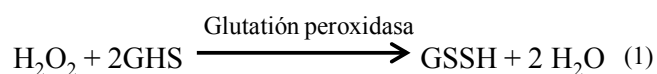
En la segunda línea de defensa, antioxidantes secundarios reducen, o eliminan ERO / ERN y otras especies reactivas antes de que ataquen moléculas biológicas. Estos antioxidantes al reaccionar con un radical libre le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre no tóxico y que en algunos casos puede regenerarse a su forma reducida por la acción de otros antioxidantes y de esta forma evitan las reacciones en cadena. Ejemplo de ellos tenemos: las vitaminas C y E, carotenos, fenoles, glutatión reducido (GSH), ácido lipoico, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, ubiquinona entre otros (Liu y Gaston, 2010; Kuiper et al., 2011; Bian et al., 2012; Lebold y Traber, 2014; Niki, 2014; Forman et al., 2014).

El glutatión, un tripéptido compuesto de cisteína, glutamato y glicina es el tiol intracelular más abundante (1 a 10 mM) en la célula, constituye un factor determinante en el mantenimiento del estado redox celular. El GSH desempeña un papel crítico en la regulación de una variedad de funciones celulares, incluyendo la detoxificación de xenobióticos, la síntesis de ADN y de otros compuestos endógenos, la modulación de la expresión génica, y la regulación del ciclo celular. Sin embargo, la función más importante y bien conocida del GSH es la defensa antioxidante. El glutatión puede reducir el peróxido de hidrógeno y peróxidos de lípidos a través de reacciones catalizadas-GPx. Otro mecanismo importante mediante el cual GSH ejerce su función antioxidante es mantener los residuos de cisteína las de proteínas en su forma reducida a través de reacciones catalizadas por glutaredoxina y sulfiredoxina (Liu y Gaston, 2010).

La pareja de GSH/GSSG es considerada como el árbitro principal del estado redox de las células debido a que es de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor que otros pares redox y también está metabólicamente vinculado a los pares redox menos abundantes de donaciones directas o indirectas de equivalentes reducidos para la reducción de sus formas oxidadas. El componente funcional clave de GSH es el grupo tiol en el residuo de cisteína, que puede actuar tanto como un agente reductor y como un agente nucleofílico. Una característica única de las reacciones de oxidación / reducción del GSH es que implican transferencias de dos electrones, mientras que otros pares redox implican electrones individuales; por lo tanto, es un reductor altamente versátil, sirviendo de múltiples funciones fisiológicas, incluyendo el secuestro de radicales por reacciones directas,

proporcionando equivalentes reducidos para la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos de lípidos mediado por enzimas, el mantenimiento de los grupos tioles de proteínas, la conjugación y la excreción de xenobióticos, entre otros (Lu, 2009).

En la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción 1), el GSH se oxida a glutatión disulfuro (GSSG), que puede ser excretado de las células o reconvertido a GSH por la actividad de NADPH dependiente de disulfuro de la glutatión reductasa (reacción 2). El GSSG también puede reaccionar con los residuos de proteína para formar disulfuros mixtos (reacción 3). Los mecanismos por el cual las células mantienen la homeostasis intracelular del GSH incluyen el ciclo redox y la nueva síntesis. El ciclo redox del GSH, catalizada por GSSG reductasa, evita la pérdida de GSH en forma de GSSG que se genera durante la reducción de diversos oxidantes con GSH, mediante la reducción de GSSG de nuevo a GSH (Liu y Gaston, 2010).



La capacidad del ácido ascórbico para mostrar propiedades antioxidantes está relacionada con el hecho de que el radical dehidroascorbato es menos reactivo que muchos de los radicales que pueden ser secuestrados por el ascorbato (Lane y Lawen, 2009). Existen sistemas enzimáticos intracelulares *in vivo* para reducir este radical del ascorbato usando NADH (la enzima reductasa NADH-semidehidroascorbato) o GSH (la enzima reductasa de dehidroascorbato) como fuentes de poder reductor. El ácido ascórbico en los fluidos extracelulares humanos se agota rápidamente bajo condiciones de estrés oxidativo (Kuiper et al.; 2011).

La vitamina E tiene ocho isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -tocoferol (cadenas saturadas) y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -tocotrienol (cadenas insaturadas) dependiendo de las posiciones y números de grupos metilo. Los tocoferoles y los tocotrienoles correspondientes tienen la misma capacidad de eliminación de los radicales libres. Todos los tocoferoles son antioxidantes, sin embargo  $\gamma$  y  $\delta$  son antioxidantes más potente que los otros debido a su carbono 5 no

metilado (Traber, 2006). La reactividad relativa de las formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hacia los radicales de oxígeno disminuye en el orden de  $\alpha > \beta = \gamma > \delta$  (Yoshida et al., 2003; Niki, 2009; Niki, 2014). Notablemente,  $\alpha$ -tocoferol tiene la mayor biodisponibilidad debido a su mayor afinidad por la proteína de transferencia y la baja tasa de metabolismo.  $\alpha$ -Tocoferol, un antioxidante soluble en lípidos, es una de las ocho formas de vitamina E sintetizadas por las plantas y la única forma que cumple con los requerimientos de vitamina E en humanos (Food and Nutrition Board, 2000).

El  $\alpha$ -tocoferol retarda la peroxidación lipídica por interrupción de la cadena de propagación de radicales peroxilos antes de que estos puedan reaccionar con las proteínas y ácidos grasos de las cadenas laterales. Estos antioxidantes pueden inhibir la producción de radicales libres a través de la quelación de metales de transición, interrumpiendo las reacciones en cadena y reduciendo las concentraciones de EROs (Fontham, 1994; Kohen y Gati, 2000; Niki y Noguchi, 2004; Vlachodimitropoulou et al., 2010). La vitamina E es incapaz de inhibir la iniciación de la oxidación de lípidos, pero puede romper la propagación de la cadena.  $\alpha$ -Tocoferol neutraliza los radicales peroxilos durante la propagación e impide la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. La vitamina E probablemente no es un secuestrador eficiente *in vivo* del radical hidroxilo, alcoxilo, el dióxido de nitrógeno, ozono, hipoclorito, y el singlete de oxígeno (Niki, 2014).

El efecto antioxidante *in vivo* de la vitamina E como un secuestrador del radical peroxilo se puede evaluar a partir de los niveles de peróxidos de los ácidos grasos poliinsaturados: isoprostanos, neuroprostanos, 7  $\beta$ -colesterol y 7- ketocolesterol. El efecto inhibitorio contra la peroxidación lipídica depende de la concentración, la distribución, y la composición de los lípidos y ácidos grasos, así como la reactividad y la concentración del antioxidante. La reactividad de los radicales peroxilo hacia los lípidos se presenta en el siguiente orden: AGPI > Colesterol > ácidos grasos monoinsaturados > ácidos grasos saturados. El tipo de lípidos y la composición de ácidos grasos varían notablemente entre los tejidos y, posiblemente, entre las personas y dependen también de la dieta. El ácido araquidónico y ácido docohexaenoico son los principales AGPI en el cerebro y la retina. La vitamina E debe ejercer efectos beneficiosos en la inhibición de la peroxidación lipídica, la prevención y tratamiento de diversas enfermedades en las que el estrés oxidativo por radicales libres esté involucrado, cuando se administra al sujeto en el momento adecuado y durante el tiempo necesario.

Los antioxidantes dietarios vitamina C, vitamina E y los carotenoides proporcionan un sistema antioxidante integrado con el glutatión para la eliminación de los radicales libres y la protección del daño oxidativo. Cuando el  $\alpha$ -tocoferol reduce los radicales peroxil a hidroperóxidos lipídicos, la enzima glutatión peroxidasa selenio-dependiente (GPx4) convierte el hidroperóxido a los hidróxidos de lípidos menos tóxicos a expensas de glutatión. La vitamina C reduce el radical  $\alpha$ -tocoferol, regenerando el  $\alpha$ -tocoferol activo. Posteriormente, el ascorbato se regenera a expensas del glutatión. Este sistema antioxidante ascorbato-tocoferol-GSH es auto-regenerado a expensaa de un gasto de energía (NADH, NADPH). El mantenimiento de esta red antioxidante es crucial para proteger las membranas celulares contra la degradación mediada por radicales (Lebold y Traber, 2014).

El ácido  $\alpha$ -lipoico ( $\alpha$ -LA) es un cofactor esencial de los complejos multienzimáticos que están asociados con las reacciones de transporte de electrones mitocondriales en el metabolismo de la energía celular.  $\alpha$ -LA y su forma de ácido ditiol dihidrolipoico (DHHLA) también se consideran potentes eliminadores de radicales libres y se han utilizado para prevenir o reducir el daño inducido por especies reactivas del oxígeno. Además, el sistema  $\alpha$ -LA-DHHLA recicla la potencia antioxidante de GSH, vitamina C, vitamina E, y la coenzima Q10, manteniendo así el estado celular reducido en la lucha contra el estrés oxidativo. Además, los efectos beneficiosos de  $\alpha$ -LA están mediadas a través de los efectos antioxidantes indirectos por la regulación positiva de la hemo oxigenasa-1 (una enzima con función antioxidante) y también pueden transmitir una respuesta dependiente de la desintoxicación Nrf2 fase II (Cheng et al., 2011).

Las células han desarrollado mecanismos de adaptación para soportar el estrés oxidativo. Estos incluyen una batería de proteínas protectoras/defensivas que protegen a las células contra el estrés oxidativo y promueven la supervivencia celular. Se incluyen entre estas proteínas las de defensa de fase II, como las que participan en la biotransformación de xenobióticos y drogas (NAD(P)H: quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), HNR: oxidorreductasa quinona 2 (NQO2), glutatión S-transferasa (GST), y moléculas tales como el glutatión reducido y metalotioneínas). La batería de proteínas citoprotectoras también incluye transportadores de fármacos que juegan papel importante en la entrada y salida de las drogas; las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, que evitan la muerte celular por apoptosis y promueven la supervivencia de las células; y el proteasoma que remueve la oxidación y daño de las proteínas (Niture et al., 2014). Los genes citoprotectores se

expresan y se inducen en respuesta a xenobióticos, antioxidantes, oxidantes, metales pesados y luz UV de manera ubicua. La inducción de estos genes es parte de un mecanismo oxidativo/electrófilo en defensa por el estrés incluyedo la inducción coordinada de más de 200 genes. Tanto la expresión constitutiva e inducible de los genes de defensa está regulado por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Niture et al., 2014).

La localización anatómica profunda del color amarillo de los carotenoides pueden reducir la exposición de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario de retina (EPR) a la luz azul y con esto, disminuir la producción foto-mediada de las especies reactivas de oxígeno, tales como el singlete de oxígeno. La luteína y la zeaxantina son también excelente secuestradores del oxígeno singlete; sus capacidades son superiores a la del  $\alpha$ -tocoferol. La función antioxidante de estos carotenoides en la protección al EPR de la foto-oxidación es por dos mecanismos diferentes: el bloqueo de la luz azul dañina y extinción de especies reactivas del oxígeno. También se sabe que la luteína y la zeaxantina dietética juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria. La suplementación de estos carotenoides en el EPR protege al proteoasoma de la inactivación y atenúa los cambios en la expresión de estos genes relacionados con la inflamación. Este puede ser uno de los mecanismos por los que la luteína y la zeaxantina dietética modulan la inflamación ocular sistémica para reducir el riesgo de degeneración macular asociado a la edad (Bian et al., 2012).

El aumento en la ingesta dietética de uvas o de luteína/zeaxantina es suficiente para evitar la oxidación del EPR, el daño al citoesqueleto, y la pérdida de la visión. Esto sugiere que la pérdida de la función de los fotorreceptores se produce como consecuencia del daño oxidativo al EPR. La falta de un beneficio en la función normal de la retina sugiere que estos antioxidantes dietarios previenen la pérdida de la visión específicamente causada por el patológico estrés oxidativo más que la mejora de la función visual de forma independiente. El EPR humano acumula daño oxidativo con la edad y en las personas con alta carga oxidativa, como los fumadores, tienen un mayor riesgo de desarrollar una degeneración macular. El aumento a largo plazo de la ingesta de antioxidantes por la dieta probablemente reduce el daño oxidativo al EPR en el ojo humano y puede retrasar la aparición de la deficiencia visual relacionada con la edad (Yu et al., 2012)

Los antioxidantes más abundantes en la dieta son los polifenoles. Estos proporcionan recursos valiosos a la medicinas natural contribuyendo a la prevención y/o

tratamiento de enfermedades degenerativas (por ejemplo enfermedades cardiovasculares y cáncer) (Forman et al., 2014). Los polifenoles (mayoritariamente flavonoides) brindan protección a las células y tejidos, siendo sus efectos antioxidantes bien establecidos en modelos *in vitro* o en animales. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se asocia principalmente con tres procesos: 1) los aumentos de los niveles de GSH intracelular; 2) el bloqueo de la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3) el secuestro de radicales libres y especies reactivas, junto con la inhibición de la formación y propagación de reacciones de radicales libres a través de la quelación de iones de metales de transición (Rice-Evans et al., 1996; Sánchez-Gallego et al., 2010). Por lo tanto, el descubrimiento de polifenoles específicos con mejor eficacia y potencia antioxidante sería útil para aplicaciones clínicas.

Los polifenoles que actúan como potentes antioxidantes *in vitro*, se conoce actualmente que inducen sistemas enzimáticos *in vivo*. Investigaciones recientes muestran que compuestos fenólicos y algunos otros fitocompuestos, más que actuar como antioxidantes químico *in vivo* generan señales para la inducción de enzimas protectoras e incrementan sus niveles a través de las vías de transducción de señales alterando la expresión de genes, particularmente el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Bian et al., 2012; Forman et al., 2014). Algunos compuestos aromáticos que inicialmente se pensó que actuaban como antioxidantes secuestradores de radicales libres también inducen estas enzimas mediante la transcripción de estos genes. El metabolismo o ciclaje redox de compuestos fenólicos generan quinonas (electrófilos) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  que pueden activar el elemento de respuesta electrofílica (EpRE o ARE) (Forman et al., 2014).

En la tercera línea de defensa, compuestos antioxidantes terciarios y las enzimas de reparación del daño reconstituyen las membranas y tejidos. Está constituido fundamentalmente por proteinasas, fosfolipasas, endo y exonucleasas, ADN glicosilasas, peroxidasas y metionina sulfóxido reductasas cuyas funciones son:

- Reparación directa del daño a proteínas, ADN, ARN, lípidos y carbohidratos
- Degradación de las moléculas oxidadas conservando estructuras básicas no dañadas (aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos).
- Eliminación de los productos dañados irreversiblemente. (Forman et al., 2014).

Por lo tanto los antioxidantes actúan en cooperación y de forma sinérgica en la red de defensa para hacer frente al estrés oxidativo. Por otra parte, los bajos niveles de estrés

oxidativo inducen una respuesta adaptativa, lo que acelera la producción de proteínas y enzimas antioxidantes y los transfiere al sitio correcto en el momento adecuado y en las cantidades correctas (Niki, 2014).

### **II.1.3.3. Mecanismo antioxidante según vía de entrada**

Otra clasificación es la que divide a los antioxidantes en exógenos o que ingresan a través de dieta o suplementos, requiriendo continua reposición y los endógenos que son sintetizados por la propia célula.

Entre los endógenos tenemos:

- Enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (selenio (GPx), peroxidasa, tioredoxinas (Trx).
- Antioxidantes preventivos que son secuestradores de metales de transición (transferrina, lactoferrina, ferritina, ceruloplasmina, albúmina, haptoglobina)
- Sustancias endógenas con capacidad antioxidante (GSH, urato, bilirrubina, ubiquinonas, etc) (Bian et al., 2012).

Entre los exógenos están:

- Naturales: Se encuentran en los alimentos y se incorporan a través de la dieta (Vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -carotenos, ácido lipoico, selenio y compuestos fenólicos).
- Sintéticos:
  1. Preventivos secuestradores de metales de transición (deferroxamina).
  2. Capturadores de EROs (pirrolopirimidinas con esqueleto BHT, n-acetil-cisteína, antiinflamatorios no esteroideos).
  3. Inhibidores de xantina oxidasa (alopurinol) y de la NADPH oxidasa (oxatomida).
  4. Enzimas antioxidantes de uso terapéutico (PEG\_SOD, deferral/MnIII).



5. Vitaminas y oligoelementos (Vitamina E, C, zinc, selenio, hierro) (Bian et al., 2012).

#### **II.1.4. EROs y enfermedades**

Una desbalanceada y prolongada producción de radicales libres causa el estrés oxidativo y contribuye a la patogénesis de múltiples enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes, enfermedades cardio-vasculares, neurodegeneración, inflamación y enfermedades oculares.

Durante la iniciación del cáncer las especies reactivas del oxígeno inducen daños al ADN conduciendo a mutaciones genéticas y alteraciones estructurales al ADN. Las EROs pueden crear algunas alteraciones en los genes supresores de tumores e incrementar la expresión de proto-oncogenes. Recientemente ha sido reportado que las EROs disminuye la expresión de enzimas reparadoras del ADN, al inducir mutaciones al ADN mitocondrial deteriorando la cadena de transporte de electrones e incrementando la producción de especies reactivas. Además las EROs pueden activar vías específicas de señalización que contribuyen al desarrollo del tumor por regulación de la proliferación celular, angiogénesis, procesos de metástasis e inestabilidad genética (Rebillard et al., 2013).

El estrés oxidativo ha emergido como un factor crítico en la iniciación y desarrollo de la diabetes y está acompañado por una incrementada generación de EROs. Un daño celular y tisular ocurre en circunstancias patológicas tales como la exposición prolongada a la glucosa causando una elevación en los niveles de radicales libres y una reducción de la producción antioxidante. Evidencias científicas soportan la capacidad del estrés oxidativo en el deterioro de la angiogénesis, de la función de las células progenitoras del endotelio (EPC) y de la movilización de las células progenitoras circulante (CPC). (Styskal et al., 2013).

## II.2. Anatomofisiología Ocular

### II.2.1. Estructuras anatómicas del ojo

El ojo o globo ocular es el órgano de la visión. Está formado por dos segmentos de esferas de diámetro diferente y que reciben la denominación de segmento anterior y segmento posterior. El *segmento anterior*, representa un sexto del globo ocular y es más prominente que el *segmento posterior*, que comprende cinco sextos de la circunferencia total del globo ocular. A su vez, el ojo está compuesto por tres túnicas o capas concéntricas y por los elementos contenidos en su interior. De fuera a dentro, estas tres capas son:

- Capa fibrosa o externa, constituida por la córnea y la esclerótica o esclera.
- Capa intermedia, vascular o úvea, que contiene el iris, el cuerpo ciliar y la coroides.
- Capa interna o nerviosa, también denominada retina (Subczynski et al., 2010)..

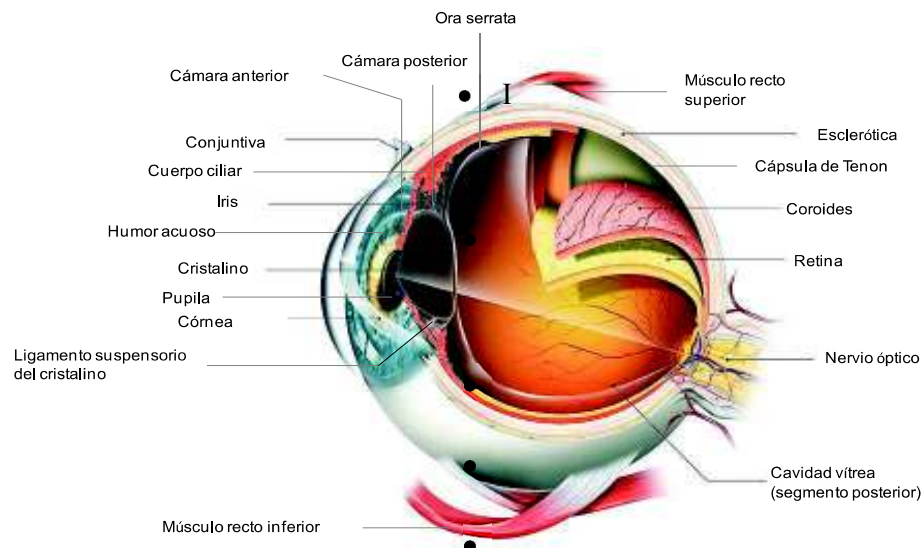


Imagen. Estructura del globo ocular

La retina humana es de aproximadamente 0,2 mm de espesor y tiene un área de aproximadamente 1 100 mm<sup>2</sup>. La retina posee unos 200 millones de neuronas. El disco óptico, donde las células neuronales se fusionan para formar el nervio óptico, es la única área de la retina que es "ciego" ya que carece de fotorreceptores. La mácula es la parte posterior central de la retina y tiene la mayor concentración de fotorreceptores, que facilitan la visión central y proporciona la agudeza visual con más alta resolución (Bian et al., 2012). En el centro de la mácula se encuentra la fovea, una depresión con alta concentración de células de cono, responsable de la visión central. Un aumento en la ingesta dietética de luteína y zeaxantina aumenta la densidad óptica del pigmento macular y proporciona una mejor protección contra la fotooxidación (Connolly et al., 2011).

Aunque la retina es una estructura multicapa compleja, puede ser funcionalmente dividida en dos partes: la retina neural, compuesta por fotorreceptores (conos y bastones) y sus conexiones neuronales, responsable de proceso de foto-transducción; y el Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) y su lámina basal conocida como membrana Bruch's que mantienen la integridad entre la retina y la coroides. El EPR se compone de una monocapa polarizada de células hexagonales pigmentadas (melanina), y su integridad es esencial para la visión. La melanina en el EPR actúa en contra de EROs protegiendo la retina neural.

El EPR se encuentra adyacente a la retina externa, donde se llevan a cabo funciones esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores. Sus principales funciones son el transporte de agua, iones, y nutrientes; captación de la circulación de la vitamina A, su almacenamiento como éster, su conversión a retinol y su transferencia a los fotorreceptores; eliminación de material de desecho acumulado en los fotorreceptores; la fagocitosis diurna y la digestión de los segmentos exteriores de los fotorreceptores; absorción de la luz; protección contra la foto-oxidación, y la secreción de factores esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de la retina (Burke y Hjelmeland, 2005; Strauss, 2005; Yu et al., 2012; Bian et al., 2012).

La retina es una parte del sistema nervioso central (SNC), que percibe y procesa la información visual. Pero los fotorreceptores de la retina son altamente susceptibles a la oxidación porque están expuestos a una gama de intensidades de luz (Tanito et al., 2002). El EPR está en alto riesgo de estrés oxidativo, ya que reside en un entorno de alta tensión de oxígeno y se expone a la luz azul fototóxica (Wu et al., 2006). Entre las especies reactivas del oxígeno a las que se exponen las células epiteliales de la retina se reportan al

peróxido de hidrógeno. Al igual que en la mayoría de las células, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se genera durante el metabolismo normal del oxígeno en la mitocondria. En el EPR, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también se produce durante la fagocitosis diaria de los segmentos externos de los fotorreceptores y se genera como consecuencia de la irradiación de la luz sobre el pigmento de melanina (Korytowski et al., 1987; Kaczara et al., 2010).

### **II.2.2. Cultivo Celular ARPE-19 (ATCC 2302)**

Las células ARPE-19 (American Type Culture Collection (ATCC 2302)) es una línea celular humana del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Derivada en 1986 de ojos normales de un joven de 19 años de edad que murió de un trauma craneal en un accidente vehicular. Las células surgen espontáneamente con cariólogía normal formando monocapas epiteliales polarizadas sobre filtro poroso. La línea celular se estableció por tripsinización selectiva de un cultivo primario de EPR resultante en una población uniforme de células altamente epiteliales, que presentan un fuerte potencial de crecimiento (Dunn, 1996). ARPE-19 tiene propiedades estructurales y funcionales características de las células del EPR *in vivo* y sugieren que esta línea celular es valiosa para estudios *in vitro* de fisiología de la retina del epitelio pigmentario.

ARPE-19 es una línea de célula adulta humana que muestra muchas propiedades diferenciadas del epitelio pigmentario de la retina *in vivo*. Por ejemplo, las células ARPE-19 expresan proteínas-EPR específica, como RPE65 y retinaldehído-unida a proteína celular (Hanneken et al., 2006; Vogel et al., 2007). Otras características del EPR específicas de células ARPE-19 incluyen polarización morfológica y funcional cuando se siembran sobre filtros recubiertos, la formación de una estrecha unión, alta resistencia transepitelial, expresión y secreción de factores de crecimiento vascular (VEGF) y del factor derivado del epitelio pigmentario (Geisen et al., 2006). Por lo tanto, la línea celular ARPE-19 es la línea de células más comúnmente utilizada en la investigación de los ojos. Informes recientes indican que ARPE-19 y las células primarias fetales humanas del EPR tienen una sensibilidad similar a los oxidantes y otros tipos de estrés celular (Zhang et al.,

2008). Los compuestos que protegen células ARPE-19 del daño oxidativo también protegen a las células del EPR fetales humanas primarias.

### **II.2.3. Patologías oculares asociadas al estrés oxidativo**

Los ojos están en constante riesgo de sufrir daño oxidativo debido a la alta exposición al oxígeno, y a la presencia de una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados formando parte de la retina. Además se someten a una elevada exposición a la luz, a contaminantes ambientales, al humo del tabaco y a los rayos ultravioletas (Wu et al., 2006; Kaczara et al., 2010). El estrés oxidativo al cual está sometida la capa de células del EPR con el tiempo produce la disfunción del tejido, contribuyendo al desarrollo de la patogénesis de muchas enfermedades del aparato visual como son: la degeneración macular relacionada con la edad (DMA), retinopatía diabética y las degeneraciones hereditarias de la retina.

El lente del ojo humano es muy vulnerable al estrés oxidativo. Los lentes ricos en proteínas dependen de la capacidad de diversos antioxidantes y enzimas para mantener las proteínas en un estado reducido y garantizar su transparencia (Yu et al., 2013). La extensa oxidación de proteínas y lípidos en el cristalino se asocia con las cataratas en humanos. Una proporción significativa de las lentes y del humor acuoso tomados de pacientes con cataratas han mostrado elevados niveles de  $H_2O_2$ . Debido a que las concentraciones de  $H_2O_2$  que se encuentra en las cataratas, pueden causar la opacificación del cristalino y producir un patrón de oxidación similar a la encontrada en la catarata, se reporta que el  $H_2O_2$  es el principal oxidante involucrado en la formación de cataratas. En los ojos normales humanos se ha reportado un nivel de  $H_2O_2$  en el humor acuoso en el rango de 14-31  $\mu M$ . Sin embargo, en condiciones patológicas como la existente en ojos con cataratas, el nivel de  $H_2O_2$  difería en 33 a 324  $\mu M$  con una media de 189  $\mu M$ . (Spector, 1998).

El estrés oxidativo contribuye a la aparición y progresión de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Debido a la alta tasa metabólica y a la acumulación de lipofuscina con los años, el EPR es un blanco perfecto del daño fotooxidativo en el ojo (Sparrow y Boulton, 2005). La mayor parte de la luz ultravioleta es absorbida por el cristalino, la de alta energía, entre 400 y 500 nm, alcanza la retina y puede provocar

fototoxicidad, fenómeno conocido como “efecto de riesgo por luz azul” (blue light hazard). Esta energía luminosa provoca la generación de radicales libres en los tejidos oculares, promoviendo con ello la peroxidación lipídica. El EPR es también una fuente importante de citocinas que regulan la respuesta inflamatoria en la retina (Bian et al., 2012). Los eventos patológicos moleculares y celulares incluyen la apoptosis de los fotorreceptores y la acumulación del pigmento lipofuscina en células del epitelio pigmentario, y aunque la pérdida de la visión en la DMAE resulta de un daño a los fotorreceptores en la retina, tiene como patogénesis inicial la degeneración de las células del epitelio pigmentario. En el estrés fotooxidativo se produce la muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina, seguida de la muerte de los fotorreceptores.

La DMAE es una enfermedad multifactorial y la causa principal de ceguera en los países industrializados. El envejecimiento, antecedentes genéticos, el tabaquismo, los factores dietéticos contribuyen a la enfermedad. La pérdida del epitelio pigmentario de la retina con el envejecimiento está relacionado con la degeneración macular. Se manifiesta cambios morfológicos difusos a nivel de la membrana EPR, Bruch's, y los fotorreceptores asociados con una reducción de la agudeza visual. Estos cambios consisten en una capa continua de depósito laminar basal y escombros membranosos debajo de la mácula. La DMAE causa la pérdida de la agudeza visual por drusas, atrofia geográfica, hemorragia subretiniana y desprendimiento de retina sensorial serosa (Kim et al., 2003).

El EPR tiene un sistema de defensa antioxidante formidable que debe responder a un entorno de alto estrés oxidativo. La capacidad de defenderse contra el estrés oxidativo mediante la regulación positiva en la defensa antioxidante es probable que sea un evento crucial que media la iniciación y progresión de la DMAE. El glutatión y sus enzimas relacionadas son parte de esta defensa antioxidante (Miranda et al., 2010). El Estudio de Enfermedades de los ojos relacionada con la Edad (AREDS) mostró que los micronutrientes antioxidantes reducen la progresión de la degeneración macular intermedia.

La luteína y la zeaxantina dietética desempeñan papeles significativos en la protección contra la pérdida de la visión de la DMAE. La luteína y la zeaxantina en la retina pueden proteger contra la DMAE por dos mecanismos diferentes: el bloqueo de la luz azul dañina y el secuestro del de oxígeno reactivo (Li et al., 2010). Las evidencias recientes indican que la luteína y la zeaxantina dietética tienen funciones anti-inflamatorias

que reducen el riesgo de DMAE. La suplementación con estos antioxidantes puede romper parcialmente el círculo vicioso entre el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en células del EPR a través de la protección al proteosoma, de la inactivación y atenuación en la expresión de genes relacionados con la inflamación. Esto puede ser uno de los mecanismos por los que luteína y zeaxantina dietética modulan la inflamación ocular y sistémica (Bian et al., 2012).

La retinitis pigmentosa es un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por la progresiva degeneración de los fotorreceptores que conduce a la ceguera nocturna, pérdida de la visión periférica, y posteriormente la pérdida de la visión central. Recientemente, el estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de la retinitis pigmentosa. En circunstancias desfavorables, las EROs pueden causar un tremendo estrés oxidativo sobre los fotorreceptores de la retina y conducir a la muerte. Estudios recientes han demostrado que el uso de combinación de antioxidantes (zeaxantina, luteína, ácido  $\alpha$ -lipoico, y glutatión) reducen drásticamente el número de bastones fotorreceptores con ADN dañado por oxidación y retrasa los procesos de degeneración (Miranda et al., 2010). Komeima et al., 2006 mostró que la inyección de otra combinación de antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, Mn (III) tetrakis porfirina, ácido  $\alpha$ -lipoico) disminuyó la muerte celular en conos fotorreceptores en diferentes modelos de ratón enfermos de retinitis pigmentosa.

La retinopatía diabética (RD) es una complicación común de la diabetes y una causa principal de ceguera en adultos en edad activa. Aunque la retinopatía diabética se considera una enfermedad vascular, varios informes demuestran que las neuronas de la retina también se ven afectados, lo que conlleva a la pérdida de la visión (Gaspar et al., 2013). Los cambios degenerativos en la retina incluyen aumentos de la permeabilidad vascular, que conduce a edema macular y la proliferación celular endotelial. La retinopatía diabética es la causa más frecuente de nuevos casos de ceguera entre los adultos de 20 -74 años. Durante las dos primeras décadas de la enfermedad, casi todos los pacientes con diabetes tipo 1 y el 60% de los pacientes con diabetes tipo 2 tienen retinopatía. Los numerosos estudios han demostrado que las personas con retinopatía diabética tienen exceso de riesgo de complicaciones vasculares sistémicas, incluyendo accidentes cerebrovasculares, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y nefropatía (Alghadyan, 2011).

El mecanismo exacto por lo que la hiperglucemia provoca la interrupción vascular visto en la retinopatía no está claro. Ensayos clínicos a gran escala han identificado a la hiperglucemia como la clave para el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (superóxido, hidroxilo) a través de la activación de la proteinquinasa C, del aumento de la vía del poliol y de la glicosilación no enzimática de proteínas. El estrés oxidativo causado por la formación de radicales libres como resultado de la hiperglucemia y las vías bioquímicas anteriormente mencionadas conducen a daños en la vasculatura de la retina. Se encontró que los antioxidantes tales como la vitamina E podrían prevenir algunas de las disfunciones vasculares asociada con la diabetes (Fong et al., 2004).

El glaucoma primario de ángulo abierto (GAA) es una neuropatía óptica progresiva y tal vez, la forma más común de glaucoma. Es bien sabido que el GAA es una causa importante de ceguera, y es la segunda causa de ceguera en todo el mundo. El glaucoma de ángulo abierto es una neuropatía óptica asintomática, progresiva caracterizada por la ampliación del disco óptico y pérdida del campo visual. La presión intraocular elevada (PIO) es un factor de riesgo modificable para el glaucoma de ángulo abierto, pero no es diagnóstico. La evidencia reciente apunta a una relación entre el aumento del estrés oxidativo y la tensión en el nivel de la cabeza del nervio óptico, que afecta de algún modo la función normal y la supervivencia de los axones de células ganglionares en esta región. Entre las evidencias que apoyan la hipótesis de la conexión entre el estrés oxidativo y el glaucoma de ángulo abierto está la ocurrencia de daño oxidativo del ADN en portadores de esta enfermedad, comprobado por el incremento de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un producto de la alteración oxidativa del mismo. También avalan la hipótesis del daño oxidativo en pacientes glaucomatosos el incremento a la resistencia del flujo en la cámara anterior del ojo en presencia de altos niveles de peróxido de hidrógeno, la abundante actividad antioxidante de la malla trabecular, el incremento significativo en la actividad de la SOD y glutatión peroxidasa en el humor acuoso de estos pacientes y la afectación que produce el  $H_2O_2$  a la malla trabecular (Maydata et al., 2007; Peters et al., 2013).

El diagnóstico temprano depende de examen del disco óptico, la capa de fibras nerviosas de la retina, y el campo visual. El tratamiento para el glaucoma consiste en la reducción de la PIO a un rango objetivo aceptable para evitar un mayor daño del nervio óptico. Nuevos tratamientos para tratar directamente y proteger las células ganglionares de la retina que se dañan en el glaucoma también están en desarrollo (Quigley, 2011). El glutatión y las enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato



deshidrogenasa son claves en la protección contra el daño oxidativo y químico del cristalino, la córnea y la retina. Los pacientes glaucomatosos tienen una predisposición genética en cuanto a la susceptibilidad al daño inducido por ERO, dado por una delección muy frecuente del gen que codifica la glutatión transferasa (glutatión-S-transferasa M1), un producto clave en la respuesta antioxidante (Funk et al., 2004).

### II.3. Métodos de Inducción al Reto Oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El peróxido de hidrógeno es un constituyente fisiológico de las células y continuamente es producido por diversas vías celulares. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula pequeña, sin carga que fácilmente atraviesa las membranas celulares y se localiza en múltiples compartimentos sub-celulares. La concentración intracelular del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es estrechamente controlada por varios sistemas de defensas enzimáticos y no enzimáticos y se asume que varía entre 1-700 nM. Concentraciones intracelulares en estado estacionario por encima de 1 μM son consideradas que causan estrés oxidativo induciendo paradas celulares y muerte celular (Gulden et al., 2010).

Numerosos estudios han analizado la respuesta de los cultivos celulares al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando es adicionado al medio de cultivo como simple o repetidos pulsos (Kaczara et al., 2010; Sobotta et al., 2013; Pickering et al., 2013; Panieri et al., 2013; Zhang et al., 2014). Usualmente el propósito de estos experimentos es investigar la respuesta celular al estrés oxidativo como puede ocurrir naturalmente en condiciones de patologías crónicas. Muchos de estos estudios han sido conducidos por adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido al medio de cultivo celular (tratamientos por pulsos o bolos) asumiendo que estos al menos parcialmente mimetizan condiciones y respuestas que pueden ocurrir *in vivo*.

Debido a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es generado continuamente *in vivo* a niveles de “estado estacionario” fluctuante alrededor de las concentraciones submicromolar (Gardner et al., 1997; Sobotta et al., 2013), la exposición celular a un persistente flujo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representa un método de liberación que se asemeja a condiciones fisiológicas. Situaciones *in vivo* pueden ser mejor representadas por prolongadas exposiciones (varias horas) a concentraciones muy bajas (en el rango de bajos micromolares o submicromolar) del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

exógeno. Una alternativa a la inestabilidad de los tratamientos en pulso es el método acoplado a una enzima/sustrato que permite la generación extracelular continua del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los métodos de glucosa/glucosa oxidasa y xantina/xantina oxidasa han sido usados para la generación continua del oxidante en líneas celulares (Kaczara et al., 2010; Panieri et al., 2013). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno es degradado por catalasa y peroxidasas celulares. Un sistema acoplado a dos enzimas: glucosa oxidasa/catalasa (GOx/CAT) permite la exposición a un “estado estacionario” con niveles bajos de producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sobotta et al., 2013).

El tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre cultivos celulares es un modelo comúnmente empleado para evaluar la susceptibilidad al estrés oxidativo o la eficiencia antioxidante en diferentes tipos de células que están en riesgo alto de daño oxidativo, tales como las células del epitelio pigmentario de la retina. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es utilizado en muchas investigaciones de estrés oxidativo en el cual el agente oxidante ha sido adicionado al medio de cultivo de la inmortalizada línea celular del EPR (Kim et al., 2003; Kaczara et al., 2010; Zhang et al., 2014).

### **II.3.1. Métodos de adición al medio**

En modelos experimentales usados para investigar las funciones fisiológicas y efectos tóxicos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los cultivos celulares son expuestos a adiciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como pulsos o bolos al medio de cultivo. En estos modelos una substancial variación en las concentraciones tóxicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden ser encontradas, variando desde < 10 µM hasta > 1000 µM. En líneas celulares de mamíferos en cuanto al perfil de respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha encontrado que muy bajos niveles (3 a 15 µM) causan estimulación al crecimiento, intermedios niveles (120 a 150 µM) inducen paradas de crecimiento temporales, altas concentraciones (250 a 400 µM) causan paradas de crecimiento permanentes y concentraciones elevadas (≥ 1mM) produce muerte celular. Aunque las concentraciones citotóxicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicadas *in vitro* en muchos casos son considerablemente superiores a las concentraciones intracelulares (Gulden et al., 2010).

La respuesta de las células a una exposición al oxidante aguda (sola dosis alta) o crónica (repetidas dosis bajas o moderadas) es completamente diferente. Dependiendo del daño oxidativo, la exposición aguda puede provocar una serie de mecanismos

intracelulares de defensa antioxidante que neutralice el daño causado, pero si no es suficiente las células pueden morir por apoptosis o necrosis dependiendo de la extensión del daño oxidativo. La adición exógena del  $H_2O_2$  tiene un corto tiempo de vida media debido a su rápida degradación por enzimas o su descomposición en presencia de metales (Qenaie et al., 2014).

Muchos estudios conducidos por adición de  $H_2O_2$  diluido al medio de cultivo celular (tratamientos por pulsos o bolos) asumiendo que estos al menos parcialmente mimetizan condiciones y respuestas que pueden ocurrir *in vivo*. Sin embargo muchas veces no queda claro que extensión del tratamiento a pulso puede mimetizar situaciones fisiológicas relevantes. El efímero tiempo de exposición de las células a elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno en los experimentos en bolos puede ser algo atípico a lo que ocurre *in vivo*. Pocas investigaciones monitorean la cinética de degradación del peróxido de hidrógeno y toman en cuenta esa información para la interpretación de los resultados.

Estudios sobre la transitoria adaptación al estrés oxidativo han involucrado experimentos limitados a una exposición simple aguda. Aunque es más representativo del estrés oxidativo real repetidas exposiciones a bajas concentraciones del oxidante lo cual incrementa la tolerancia al estrés oxidativo dado a los cambios en la actividad del proteosoma (Pickering et al., 2013).

En exposiciones crónicas los mecanismos de defensa antioxidantes de las células se alteran como consecuencia de las repetidas exposiciones al oxidante, usualmente provocando el desarrollo de una serie de respuestas adaptativas que son distintas a la exposición aguda. Debido a estas respuestas adaptativas las células pueden resistir dosis tóxicas altas del agente oxidante que pudieran de otra forma ser letales. Los sistemas vivos pueden transitoriamente adaptarse a cambios temporales en los niveles de estrés a través de una combinación directa de activación/desactivación de enzimas y alteración en los niveles de expresión de genes. Esta transitoria adaptación es llamada hormesis (Pickering et al., 2013).

En células embrionarias de fibroblastos de ratón (MEF) repetidas exposiciones con  $H_2O_2$  parecen evitar la respuesta adaptativa al estrés si el intervalo entre exposiciones es demasiado corto y/o el nivel del peróxido es muy alto en cada contacto. Por el contrario, exposiciones repetidas de  $H_2O_2$  a intervalos de 12 h, especialmente a bajas concentraciones

del oxidante potenciaron positivamente las adaptaciones al estrés y extendieron el período de protección. Las exposiciones crónicas a bajos niveles del oxidante pueden potenciar y extender las respuestas adaptativas, pero exposiciones crónicas a altos niveles del oxidante evitan la adaptación (Pickering et al., 2013; Sobotta et al., 2013).

### **II.3.2. Métodos enzimáticos extracelulares de generación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Aunque la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los cultivos celulares es un modelo común de inducción del estrés, su concentración en el medio durante el periodo de tratamiento es usualmente no determinado o controlado. Sin embargo la concentración es de significancia porque los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son dependientes de la concentración y determinan el rango de señalización fisiológica. Los métodos de generación enzimática son una alternativa de generación continua del peróxido de hidrógeno que pueden ser usados en cortos tratamientos en cultivos celulares. Además las sostenidas concentraciones del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han sido logradas por largos periodos de tiempos. Los métodos de glucosa/glucosa oxidasa (GOx) y xantina /xantina oxidasa (XO) han sido empleados para la generación continua del oxidante en líneas celulares y constituyen condiciones fisiológicamente más relevantes que los que resultan de una simple adición de alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, especialmente para modelar un estrés oxidativo crónico (Kaczara et al., 2010; Panieri et al., 2013).

El método de GOx es usado para la generación continua del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en modelos *in vitro* y estudios *in vivo*. La oxidación de la glucosa contenida en el medio DMEM (4 mg/ml) en presencia de GOx inicia la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido glucónico en función de la concentración de la enzima (Kaczara et al., 2010; Sobotta et al., 2013; Gonzalez-Ramos et al., 2013). Alternativamente xantina oxidoreductasa convierte la xantina e hipoxantina a ácido úrico con la generación simultánea del anión superóxido, el cual se convierte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espontáneamente o catalizado por la superóxido dismutasa. Una concomitante producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno ha sido reportado para este sistema enzima-sustrato, aunque la restricción impuesta a la carga negativa del anión superóxido limita su difusión a través de la membrana (Shaeib et al., 2013; Panieri et al., 2013).

Existen varias razones por las cuales GOx es una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segura para la aplicación en los cultivos celulares, a diferencia a otras oxidasas como la xantina oxidasa, glucosa oxidasa exclusivamente convierte el oxígeno a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación estequiométrica simple (1:1), GOx genera continuamente bajos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente (ninguna otra EROs) de su sustrato glucosa, su producto D-glucunolactona es metabólicamente inerte, GOx funciona bien a pH fisiológico de 7.4, presenta una alta especificidad por su sustrato, es estable y permanece activa completamente por encima de 24 h a 37°C, y GOx no interfiere con la expresión de enzimas endógenas porque ella no existe en células de mamíferos (Gonzalez-Ramos et al., 2013).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es continuamente producido *in vivo* y permanece en un “estado semi-estacionario” (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sub>ss</sub>), su concentración cambia a un ritmo más lento que su reemplazo. El nivel estacionario es mantenido usando un sistema de dos enzimas que acopla la GOx para consumir el oxígeno y producir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y catalasa (CAT) que consume el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mientras parcialmente reemplaza al oxígeno. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel celular depende de la relación de actividades de GOx y CAT que son adicionadas al medio de cultivo. Las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, constituye un método superior de liberación del oxidante que mimetiza los ajustes fisiológicos (Andrade et al., 2013; Sobotta et al., 2013).

El sistema GOx/CAT provee una alternativa al tratamiento de adición a pulso en los cultivos celulares que permite el mantenimiento de un nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cercano al estacionario en los cultivos por más de 24 h. Mediante mezclas definidas de concentraciones (actividades) de las dos enzimas y ajustando el volumen del medio (la distancia de difusión del oxígeno molecular), una concentración de estado estacionario del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el rango de 0.15 a 10 μM y niveles de oxígeno de 0.5 a 21% pueden ser ajustados. Matemáticamente, la generación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acoplamiento de las actividades de GOx y CAT puede seguir una cinética de pseudo-cero-orden para GOx (asumiendo un suministro ilimitado de glucosa y oxígeno) y una clásica conducta de primer-orden para la catalasa (Andrade et al., 2013; Sobotta et al., 2013).

### **II.3.3. Método endógeno de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

El peróxido de hidrógeno puede ser producido endógenamente por inhibición del complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial usando antimycin A. Este selecto inhibidor estimula la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial a nivel de estado estacionario. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por antimycin A dentro de la mitocondria en células de carcinoma de pulmón (U1810) no indujo aparentes cambios en la viabilidad durante largos tiempos de incubación. Esto sugiere que el sitio de generación influye en el efecto potencial sobre la viabilidad celular (Panieri et al., 2013).

### **II.4. *Bucida buceras***

Desde hace varios años se ha incrementado el uso de plantas medicinales, con el propósito de disminuir la incidencia de enfermedades (Calderón, 2013). Las plantas son fuente de nuevos y más eficientes antioxidantes, a los que la farmacología puede recurrir para neutralizar los radicales libres, producidos por el metabolismo celular y que están vinculados a diversas enfermedades (Kumar y Kumar, 2006). Esto ha resurgido la búsqueda de nuevas terapias alternativas, evaluándose extractos de plantas con resultados satisfactorios (Calderón, 2013).

La familia Combretaceae que comprende desde hierbas, arbustos y árboles, se distribuye aproximadamente en 20 géneros con 600 especies (de Morais Lima et al., 2012). Reúne numerosas especies que han sido estudiadas por su empleo con fines medicinales. En estudios anteriores se ha reportado que algunas especies de esta familia tienen actividad antioxidante (Cheng et al., 2003), así como se ha revelado poseer un gran número de compuestos bioactivos y actividad antimicrobiana. (Coulidiati, 2009).

Todavía hay mucho para dilucidar de la actividad biológica de extractos crudos y compuestos activos de estas plantas (Fyhrquist, 2007). Lo que deja un amplio campo para investigar en los géneros de la familia Combretaceae.

Bucida es un género perteneciente a la familia de las Combretaceae, el cual cuenta con 6 especies. Una de ellas es *Bucida buceras*, nombrada comúnmente como bucida, úcar u olivo negro. Es un árbol que puede llegar a medir hasta 25 metros de altura y unos 100 cm de diámetro, es de hojas semiredondeadas-ovaladas y a veces cóncavas. Cuenta con flores chicas, amarillas y se producen en primavera y verano. Da fruto de julio a septiembre. Su distribución va desde México hasta Guyana. Es principalmente usado como árbol de sombra y es muy resistente a plagas y enfermedades

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El deterioro de la homeostasis redox normal y la consecuente acumulación de biomoléculas oxidadas ha sido vinculada a una gran variedad de enfermedades oculares (cataratas, glaucoma uveítis, fibroplasia retroental, degeneración macular senil y varias formas de retinopatía). Una de las causas de pérdida de visión ocurre a través del daño oxidativo a las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) dado a su elevada vulnerabilidad al estrés oxidativo. Grupos investigativos, incluyendo el nuestro, estamos centrados en entender los mecanismos del daño celular inducido por especies reactivas del oxígeno en las células del EPR y desarrollar estrategias antioxidantes para disminuir o revertir este proceso.



#### **IV. HIPÓTESIS**

Si el peróxido de hidrógeno ocasiona daño celular por el estrés oxidativo, entonces, la dinámica de los métodos de inducción sobre las células ARPE-19 presentará diferencias en su cinética de exposición, en la respuesta celular y en el efecto retino-protector del antioxidante.

## V. OBJETIVOS

### V.1. General

Evaluar y comparar la modulación de indicadores redox y de viabilidad celular del extracto de *Bucida buceras* sobre células humanas del epitelio pigmentario de la retina inducido a un estrés oxidativo.

### V.2. Específicos

Evaluar el efecto cinético de degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sistema a pulso.

Evaluar la producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima GOx.

Determinar la influencia de la concentración celular sobre la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Medir la respuesta celular a través de viabilidad celular por el método de MTT y de la actividad de la caspasa-3 en los dos modelos de inducción.

Evaluar el potencial antioxidante del extracto de *Bucida buceras* mediante el secuestro del radical DPPH, la inhibición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el poder reductor del hierro férrico (FRAP).

Cuantificar la concentración de proteínas totales, caracterizar el perfil electroforético en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en los lisados celulares.

Valorar el efecto redox sobre el nivel de glutatión reducido (GSH), la concentración de peróxido de hidrógeno, el poder reductor y la actividad de las enzimas antioxidante catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

Determinar la capacidad protectora al estrés oxidativo y a la muerte celular del extracto de *Bucida buceras* en un modelo celular ARPE-19.

## **VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **VI.1. Cultivo Celular**

Las células del epitelio pigmentario de retina normal humano (ARPE-19) se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, MA, EUA). Se cultivaron en medio Modificado Dubelcco Eagle (DMEM) a pH 7.2 a 7.4, el cual fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich, EUA), penicilina/estreptomicina (1%), glutamina (0.75%) y piruvato de sodio (1%) (Sigma-Aldrich). A este medio se le llama medio D10. Las células se resembraron una vez por semana, levantándose con tripsina- EDTA al 0.25% (Sigma). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C en una incubadora (Binder) con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Se procedió a realizar los experimentos una vez que el cultivo celular alcanzó un 80 a 90% de confluencia.

### **VI.2. Diseño Experimental para la Inducción del Estrés Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

#### **VI.2.1. Método de Adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al Medio de Cultivo**

Una vez alcanzada la confluencia necesaria las células fueron contadas en una cámara de Neubauer en dilución 1:10 con el colorante de exclusión Azul Tripán (Sigma-Aldrich). El colorante es excluido activamente por las células vivas, mientras que en las células muertas, el colorante difunde fácilmente hacia el citoplasma.

Las células fueron depositadas (100 µL) en una densidad de 50,000 células por pozo en placas de 96 pocillos y pre-incubadas durante 24 horas para su adherencia. Al día siguiente, se reemplazó el medio por 100 µL de diferentes concentraciones (12.5, 25, 50,

100, 200, 400, 800, 1200 y 1600  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma) recién preparado y células sin peróxido como control, en medio sin suero (DMEM) y con 10% de SFB (D10). La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio de cultivo fue monitoreada y la velocidad de eliminación fue determinada durante un intervalo de tiempo (0, 30, 60, 90, 120 min, 24 y 48 horas). Para determinar la potencia citotóxica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue evaluada la viabilidad celular a las 4 y 24 horas por el método de MTT.

Paralelamente fue monitoreado el mismo gradiente de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia de células durante el mismo tiempo de exposición con el oxidante para evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la cinética del peróxido. La concentración de peróxido fue medida por la oxidación del hierro ferroso a férrico por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que forma un complejo intensamente coloreado con el xilenol-naranja (ensayo de FOX).

Para evaluar el efecto citotóxico de la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con tiempos de exposición cortos las células fueron depositadas (100  $\mu\text{L}$ ) en una densidad de 50,000 células por pozo en placas de 96 pocillos y pre-incubadas durante 24 hrs para su adherencia. Al día siguiente, se reemplazó el medio por 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 mM) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma) recién preparado y se dejó en contacto durante 30 min y 1 hora con el oxidante.

La determinación de la influencia de la concentración celular sobre la eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y del potencial citotóxico fue evaluado con diferentes números de células. Las células fueron cosechadas y subcultivadas en placa de cultivo de 48 pozos a una densidad de 200,000, 400,000, 800,000 células/pozo en 0.5 ml de DMEM con 10% SFB. Tres concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (800, 1000, 1600  $\mu\text{M}$ ) adicionados en pulso o 12.5, 25, 50 mU/mL de GOx fueron evaluadas para cada concentración celular, células sin  $\text{H}_2\text{O}_2$  sirvieron como controles. La eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue determinado en un intervalo de tiempo de 0-60 min.

### **VI.3. Método de Generación Enzimática Continua Exógena del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por Glucosa Oxidasa (GOx)**

Para la generación enzimática continua de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los cultivos (5x10<sup>4</sup> cel/pozo) fueron realimentados con medio DMEM con y sin 10% SFB. La glucosa oxidasa fue adicionada al medio para iniciar la generación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la oxidación de la glucosa contenida en DMEM (4 mg/ml D-glucosa). Una solución stock de GOx fue preparada por solubilización de la enzima en 50 mM de buffer de acetato de sodio, pH 5.1, a una concentración de 10 kU/ml y almacenada en alícuotas a -20°C.

Inmediatamente antes del uso una alícuota fue descongelada, diluida y adicionada al medio de cultivo para producir concentraciones finales de 3, 5, 8, 12.5, 25, 50 y 100 mU/mL. Glucosa oxidasa fue también adicionada al medio de cultivo con y sin suero carente de células para determinar la producción en ausencia de la monocapa células de ARPE-19.

Después de la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pulso) o de GOx (generación enzimática) alícuotas del medio de cultivo fueron retiradas a intervalos para determinar los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las células fueron cosechadas en diferentes tiempos para el ensayo de citotoxicidad (MTT).

#### **VI.3.1. Medición de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio celular**

Las concentraciones de peróxidos fueron medidas por modificación del ensayo de oxidación del hierro ferroso a férrico y la formación del complejo con el xilenol naranja (Gil et al., 2003). Este ensayo está basado en la habilidad de los peróxidos de oxidar los iones ferroso Fe<sup>2+</sup> a iones férrico Fe<sup>3+</sup>, el cual reacciona con el xilenol naranja para formar un complejo coloreado intenso.

Una alícuota (50 µL) de medio con o sin suero en presencia o ausencia de células ARPE-19 fue retirado del cultivo y mezclado con 500 µL del reactivo de FOX (listo para usar). El reactivo de FOX contiene 25 mM de sulfato de amonio ferroso en 3.5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (solución A) y 0.125 mM de xilenol-naranja sal disódica (solución B).

Inmediatamente antes del uso 1 volumen de solución A se añade a 100 volúmenes de solución B para producir el reactivo de FOX. Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída espectrofotométricamente en un lector de placas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum) a 560 nm contra un blanco reactivo. Una curva de calibración fue preparada a partir de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.125 a 25 mM) y los resultados fueron expresados como mM ± desviación estándar.

### **VI.3.2. Ensayo de proliferación celular (MTT)**

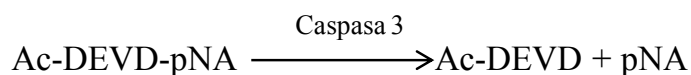
Transcurrido los tiempos de exposición con el tóxico (4, 24 y 48 horas), o (0, 30, 60, 120 min), las células se lavaron suavemente con buffer fosfato salino (PBS) y se les añadió medio fresco para determinar mediante una curva de proliferación celular la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) por el método de MTT (Mossman, 1983).

Los ensayos fueron llevados a cabo añadiendo 10 µL de solución de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (SIGMA-Aldrich) (5 mg/mL) a cada pozo, luego fueron incubados a 37°C durante 4 horas. Los cristales de formazán formados fueron disueltos con 100 µL de alcohol isopropílico con HCl 0.05N, y las medidas de absorbancia fueron registradas a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum) usando una longitud de onda de 655 nm como referencia. Los datos resultantes fueron procesados en un SkanIt Software 2.4.2 para determinar la actividad anti-proliferativa de las diferentes concentraciones de peróxido en los tiempos evaluados.

### **VI.3.3. Medición de Apoptosis / Ensayo Caspasa-3**

1x10<sup>6</sup> cel/ml fueron depositadas en placas de 12 pozos tratadas con los diferentes tratamientos del oxidante, células con peróxido en presencia del extracto de *Bucida*

*buceras*, y células control (ausencia de peróxido) fue evaluada la actividad de caspasa-3 usando el Kit del ensayo colorimétrico reportado por Bai et al., 2011. 15µL de proteína citosólica de los lisados celulares fueron mezclados con el sustrato específico caspasa-3 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitronilide (concentración final 200 µM) e incubado a 37°C durante 90 min. La absorbancia fue leída a 405 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum). Los lisados celulares apoptóticos conteniendo caspasa-3 activa rinden una considerable actividad comparado a lisados celulares no-apoptóticos. Para confirmar que la ruptura del sustrato es debido a la actividad de caspasa se empleó un control positivo de caspasa-3. La actividad de caspasa-3 fue reportada en veces de incremento en unidades arbitrarias de absorbancia.



#### **VI.4. Actividad Antioxidante del Extracto de *Bucida buceras***

##### **VI.4.1. Capacidad de secuestro del radical DPPH**

La actividad de secuestro del radical estable DPPH (0.1 mM) del extracto de *Bucida* fue evaluado por el método descrito por Lewis et al., 2014. Un gradiente de concentración de 2.5 a 25 µg/ml de extracto fue usado para secuestrar el radical libre DPPH y se calculó la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) a partir del % de secuestro mediante la ecuación:

% actividad =  $(A_c - A_s) / A_c * 100\%$ . A<sub>s</sub> y A<sub>c</sub> son las absorbancias a 517 nm de la mezcla de reacción con muestra y control respectivamente.

#### **VI.4.2. Ensayo de Inhibición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La actividad de inhibición del extracto de Bucida fue evaluado por el método del ensayo de FOX reportado por Gil et al., 2003. 100  $\mu$ L de 1600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o GOx 50 mU/mL y 100  $\mu$ L de varias concentraciones de extracto (400, 800 y 1600  $\mu$ g/ml) fueron mezclados. Después de 1 h, 50  $\mu$ L fueron mezclados con 500  $\mu$ L del reactivo de FOX incubado por 30 min y cuantificada la concentración de peróxido a partir de la curva de calibración y calculado el porcentaje de peróxido residual.

#### **VI.4.3. Poder reductor del hierro férrico (FRAP)**

La capacidad antioxidante total del extracto fue evaluada usando el ensayo de FRAP reportado por Iloki et al., 2013. El reactivo de FRAP es preparado en buffer de acetato (pH 3.6), 10 mM de solución de 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) en 40 mM de HCL y 20 mM de una solución de cloruro de hierro (III) en proporciones 10:1:1 (v/v), respectivamente. El reactivo de FRAP fue preparado inmediatamente antes de usarse. 5  $\mu$ L de muestra diluida con 15  $\mu$ L de PBS fueron añadidas a 150  $\mu$ L de reactivo de FRAP. La absorbancia de la mezcla fue medida usando un espectrofotómetro lector de placa (Thermo Scientific Multiskan Spectrum) a 595 nm después de 5 min de incubación. Una curva de calibración fue preparada a partir de una solución de sulfato de hierro en un gradiente de 100 a 2000  $\mu$ M.

#### **VI.4.4. Preparación de lisados celulares de ARPE-19**

1 millón de células/ pozos fueron transferidas a placas de 12 pozos, adhiriéndose durante toda la noche. Al día siguiente fue re-emplazado el medio y adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio en diferentes concentraciones o GOx para inducir el estrés oxidativo respectivamente. El medio fue cuidadosamente removido y lavado con buffer fosfato frío, tripsinizado y



centrifugado a 1500 rpm por 5 min. Para obtener un completo lisado, las células fueron re-suspendidas en buffer de lisado (10 mM Tris, pH 10, 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1% Triton x305, 10% Dimetil). El homogenado fue centrifugado por 15 min a 10 000 rpm.

A partir de las condiciones obtenida en los experimentos de inducción del estrés oxidativo se establecieron diferentes grupos de lisados: el grupo de células ARPE-19 control (no tratadas), el grupo de células tratadas con 800, 1000, 1600  $\mu$ M, y el grupo células más GOx (12.5, 25, 50 mU/mL) y los mismos grupos tratados con peróxido de hidrógeno más el extracto de *Bucida buceras*.

## **VI.5. Indicadores del Balance Redox Celular**

### **VI.5.1. Cuantificación del glutatión reducido (GSH)**

El GSH reducido se evaluó según el método descrito por Sedlak y Lindsay (1969). El sobrenadante de los lisados de ARPE-19 de los diferentes experimentos se hizo reaccionar con el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)  $10^{-2}$ M. Se utilizaron patrones de GSH (Sigma-Aldrich) de concentraciones conocidas (300-1300 mg/L). Los resultados fueron expresaron como mg/L de GSH.

### **VI.5.2. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT)**

La actividad de la catalasa fue medida usando el protocolo adaptado de Gil et al., 2003. La actividad fue evaluada por adición de 50  $\mu$ L de muestra a 450  $\mu$ L de 50 mM de buffer fosfato, pH 7.0, y 250  $\mu$ L de 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un volumen final de 750  $\mu$ L. La disminución de la absorbancia en 1 min fue medido a 240 nm en un espectrofotómetro (Cary). Los cálculos fueron realizados usando un coeficiente de extinción molar de  $0.043 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

La actividad de la catalasa fue expresada en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  /min\*ml. Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos 3 pruebas independientes con triplicado en cada muestra.

### **VI.5.3. Ensayo de actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)**

GSH (200  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ) fueron incubados a 37 °C por 60 min en PBS conteniendo varios lisados de ARPE-19. El volumen de la reacción enzimática fue 120  $\mu\text{L}$ . El peróxido residual fue medido espectrofotométricamente a 560 nm por el método modificado de la oxidación ferrosa -xilenol naranja (FOX).

### **VI.5.4. Determinación de la proteína total por el método de Bradford**

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Como curva patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de concentración de 0.25 a 1.5 mg/mL (Sigma). Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de la proteína total extraída, y se colocaron en placa de 96 pozos. Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford a cada pozo y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Las medidas de absorbancia fueron registradas a 595 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum) y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

### **VI.5.5. Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

La electroforesis fue llevada a cabo en un gel separador 12 % (w/v) poliacrilamida-SDS (3.00 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8), dodecilsulfato de sodio (SDS)

al 0.4%, 4 mL de ac

-tetrametiletilendiamina (TEMED) y un gel concentrador al 4% (5.0 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%, 1.3 mL de acrilamida/bis (30%/0.8%), 50  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10%, 10  $\mu$ L de TEMED). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Bio-Rad. En tubos Eppendorf se colocó aproximadamente 40  $\mu$ L (20  $\mu$ g de proteínas) de cada muestra de lisado con 40  $\mu$ L de buffer muestra 2X (Tris-HCl 0.125 M, 2-mercaptoetanol 10%, SDS 4%, azul de bromofenol y glicerol 20%).

Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 3 minutos para relajar la estructura secundaria de las proteínas. Posteriormente, el marcador de bajo peso molecular y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel.

Para el corrimiento electroforético se utilizó un buffer de corrida (Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó con un voltaje de 80 V en los primeros 30 min y posteriormente a 100 V durante 1.5 horas. Transcurrido el tiempo de corrimiento el gel se tiñó con azul Comassie para verificar el corrimiento de la electroforesis e identificar los cambios en los perfiles según los tratamientos.

#### **VI.5.6. Imágenes microscópicas**

Muestras de células ARPE-19 tratadas o no con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y extracto de Bucida fueron observadas usando un microscopio invertido (Faga-Lab-Labomed, TCM 400) para detectar cambios estructurales. Unas series de imágenes estructurales fueron tomadas con una cámara digital acoplada para evaluar morfológicamente los diferentes tratamientos.

#### **VI.5.7. Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). La significancia entre los grupos experimentales fueron determinados por un GLM-ANOVA

seguido por una prueba de Tuckey usando el programa NCSS versión 7. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Las figuras fueron realizadas usando el programa Origin 8 y las barras de error representan la DE.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Evaluación Cinética y Tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un Modelo de Adición en Pulso

#### VII.1.1. Efecto del suero fetal bovino (SFB) sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Experimentos preliminares fueron conducidos para evaluar si la presencia de suero en el medio afecta la medición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se muestra en la Figura 1, las determinaciones de peróxido de hidrógeno en un rango de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10-200 μM) adicionado al DMEM sin suero o conteniendo un 10% de SFB no difieren. Por lo tanto, el suero presenta poco efecto sobre la cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo estos valores son menores que las absorbancias obtenidas en PBS.

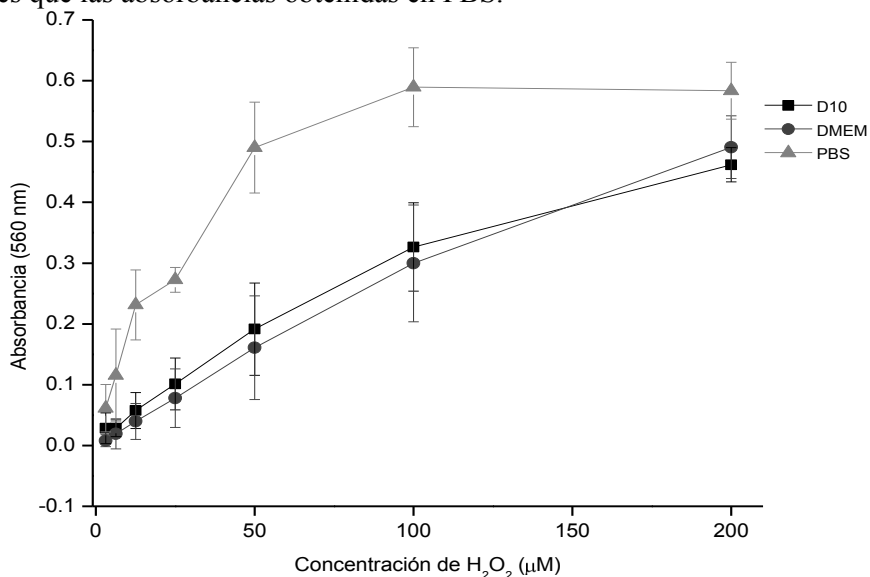


Figura 1 Determinaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en DMEM en presencia (D10) y ausencia de suero (DMEM) y en PBS utilizando el ensayo de xilenol-naranja-férrico (FOX). Regresión lineal:  $y = 0.0025x + 0.0157$ ,  $R^2 = 0.9864$  (DMEM) y con 10% SFB  $y=0.0022x+0.0149$ ,  $R^2=0.9861$  (D10). Datos expresados como las medias  $\pm$  D.E. de al menos 3 experimentos independientes.

### VII.1.2. Efecto del tiempo sobre estabilidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pulso

La respuesta del cultivo celular a oxidantes químicos tales como el peróxido de hidrógeno es determinado por la concentración del agente y el tiempo de exposición. El método más común para liberar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un cultivo es la adición de una cantidad de oxidante en el medio (pulso o bolo), pero el tiempo de exposición no está bien controlado debido a que la concentración inicial no es sostenida (Fig. 2).

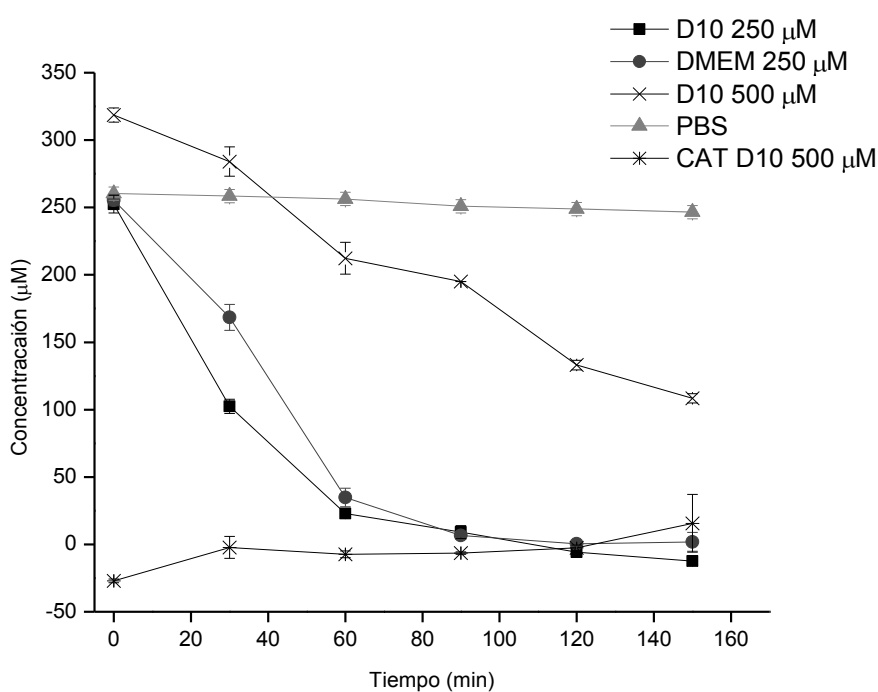


Figura 2 Reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado en pulso a un medio de cultivo D10 y DMEM sin presencia de células ARPE-19. Regresión exponencial en D10  $y = 245.54e^{-0.029x}$ ,  $R^2 = 0.9644$ . Datos expresados como las medias  $\pm$  D.E. de al menos 3 experimentos independientes.

En ausencia de células la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo declina exponencialmente con el tiempo (Fig. 2), permaneciendo casi constante la concentración de peróxido en el PBS. Como se ilustra para una concentración inicial de 250 µM, la velocidad de disminución hacia las 2 horas a temperatura ambiente con o sin suero muestra un comportamiento similar, siendo más acentuada la disminución en el medio con suero.

La mayor disminución en el medio con 10% de SFB en los primeros 30 minutos pudiera ser debido a una aportación de antioxidantes del propio suero. A 500  $\mu\text{M}$  de peróxido en el medio con suero el agotamiento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  muestra similar tendencia.

### VII.1.3. Actividad enzimática de la catalasa (CAT)

Debido a que la oxidación de iones ferroso a férrico en muestras biológica puede también resultar de la interacción de iones ferroso con hidroperóxidos orgánicos, la especificidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue confirmada por medición de la concentración en 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en D10 sin y con catalasa a una concentración final de 200 U/ml en la mezcla de ensayo (Fig. 2 y 3). Estudios iniciales confirmaron que la concentración de 200 U/ml de catalasa ofrece una descomposición total de 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  desde el instante inicial, mientras que concentraciones de actividades enzimáticas de 100, 50 y 25 U/ml requirieron de 1, 2, 4 horas respectivamente para lograr el mismo efecto (Fig. 3).

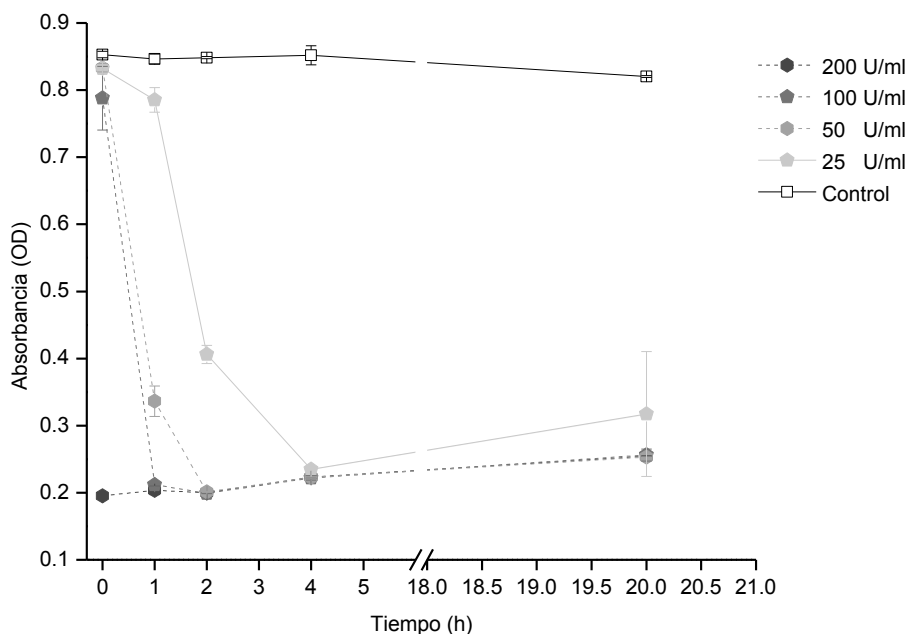


Figura 3 Descomposición del peróxido de hidrógeno (1000  $\mu\text{M}$ ) en PBS por la catalasa en un rango de actividad enzimática de 200, 100, 50, 25 U/ml. Datos expresados como las medias  $\pm$  D.E. de al menos 3 experimentos independientes.

### VII.1.4. Velocidad de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La relación entre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el tiempo de incubación muestra una caída exponencial (Fig. 4). El decline exponencial fue más rápido en el medio con suero en presencia de células ARPE-19, con un valor máximo de constante de velocidad ( $k_d = -0.065 \text{ min}^{-1}$ ). Valores similares en las constantes de velocidad de degradación del peróxido se presentaron para el medio con 10% de suero ( $k_d = -0.041 \text{ min}^{-1}$ ) y el DMEM en presencia de células ARPE-19 ( $k_d = -0.037 \text{ min}^{-1}$ ), debido al aporte de las células ( $k_{\text{cel}}$ ) en la descomposición del peróxido. La menor velocidad de eliminación se alcanzó en el medio DMEM ( $k_d = -0.026 \text{ min}^{-1}$ ) donde los propios componentes del medio aminoácidos y piruvato contribuyen a la descomposición.

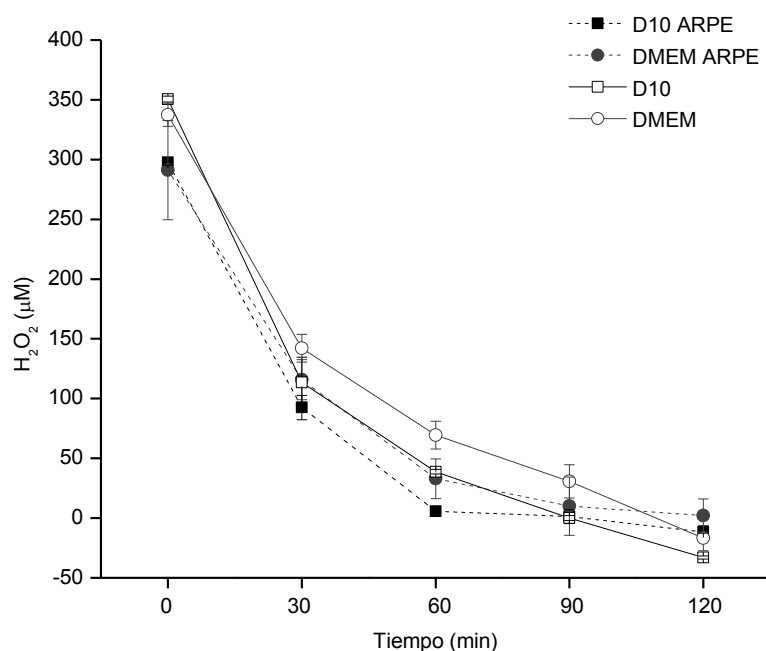


Figura 4 Descomposición del peróxido de hidrógeno (400 μM concentración nominal) en ausencia o presencia de células ARPE-19 (50,000 cel/pozo) en medio con suero y sin suero. Las constantes de velocidad son  $k_d = -0.065, -0.041, -0.037, -0.026 \text{ min}^{-1}$  para D10+ARPE-19, D10, DMEM+ARPE-19 y DMEM respectivamente. Regresión lineal para D10+ARPE-19  $y = 378.07e^{-0.065x}$   $R^2 = 0.9764$ . Datos expresados como las medias  $\pm$  D.E. de al menos 3 experimentos independientes.



La casi perfecta degradación exponencial mostrada para 400  $\mu\text{M}$  en adición a pulso (Fig. 4) demuestra que la eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sigue una cinética de primer-orden con dependencia sobre la concentración del sustrato. El adecuado modelo de la medición de la concentración en función del tiempo se expresa a través de la ecuación:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ini}} \times e^{-kt}$$

Donde  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ini}}$  corresponde a la concentración inicial y  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) es la constante de velocidad de primer orden obtenida experimentalmente. Estos parámetros cinéticos son usados para calcular el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y el tiempo de eliminación del 99% del  $\text{H}_2\text{O}_2$  del sobrenadante.

Para el cultivo celular de ARPE-19 mantenido en D10 usando la constante de velocidad específica  $k_d = -0.065 \text{ min}^{-1}$  obtenida experimentalmente de la relación entre la concentración de peróxido y el tiempo (Fig. 4), se puede estimar un tiempo de vida medio de eliminación ( $t_{1/2}$ ) de 10.67 min y un tiempo de eliminación total de 70.85 min. Para este tiempo la concentración en el medio de cultivo ha disminuido más de 10 veces.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k, \quad t_{1/2} = \ln 2 / 0.065, \quad t_{1/2} = 0.693 / 0.065 \quad t_{1/2} = 10.67 \text{ min}$$

$$t = \ln(0.01) / -k; \quad t = \ln(0.01) / -0.065; \quad t = 70.85 \text{ min}$$

### VII.1.5. Influencia del número de células (ARPE-19) sobre el $\text{H}_2\text{O}_2$

Para evaluar el efecto de varias concentraciones nominales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el cultivo celular ARPE-19 el oxidante fue liberado por adición una sola vez en un medio libre de suero (Fig. 5 A) y con 10 % de suero (Fig. 5 B). La relación concentración-tiempo muestra que la respuesta del cultivo celular probablemente es determinada por ambos factores, la concentración del agente y el tiempo de exposición (Fig. 5).

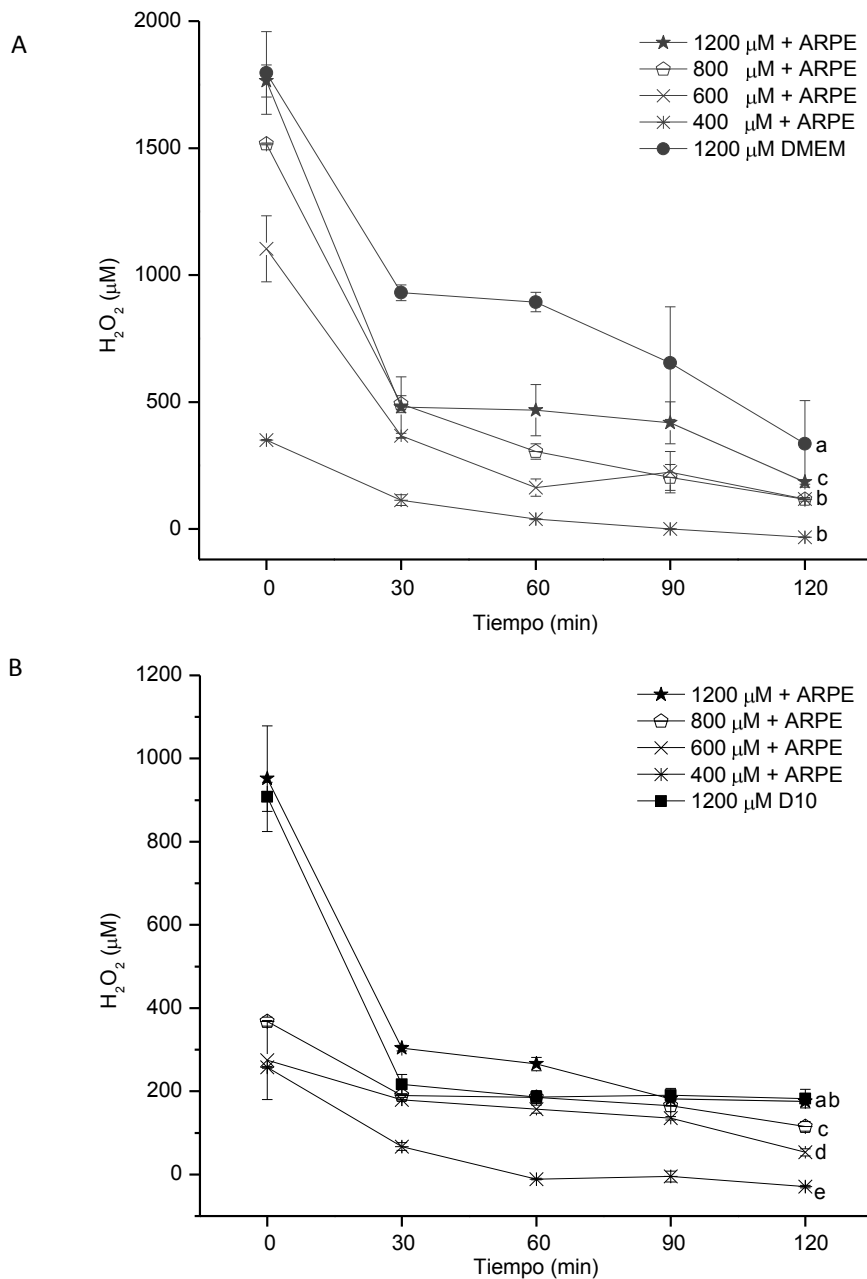


Figura 5 Concentración de  $H_2O_2$  contra el tiempo, las curvas conteniendo diferentes concentraciones nominales de 400, 600, 800 y 1200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  en medio libre de suero (A) y con 10% SFB (B) en presencia de células ARPE-19. Los datos representan la media de mediciones en triplicado de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  D.E. 1200  $\mu M$  of  $H_2O_2$  en ausencia de células ARPE-19 en sus respectivos medios fue determinado en un cultivo en paralelo. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

En presencia de células la concentración de  $H_2O_2$  en el medio de cultivo sin suero (DMEM) y con suero 10% (D10) presenta diferencias, experimentando una rápida y profunda caída en los cultivos con suero (Fig. 5B). La concentración de  $H_2O_2$  en el medio con células ARPE-19 en presencia de suero comienza a disminuir inmediatamente después de la administración del peróxido. Al menos en los primeros 10-15 min de incubación una apreciable cantidad del oxidante es eliminado del cultivo. Hacia las 2 h las concentraciones de peróxido en el medio ha disminuido drásticamente.

Como se aprecia en ausencia de células para una concentración inicial de  $1200 \mu M$   $H_2O_2$  sin suero el tiempo medio de depleción es de 69 min, mientras que con suero se logra en 49 min. Sin embargo, en presencia de ARPE-19 cultivada en D10 para todas las concentraciones de peróxido evaluadas se observa un marcado agotamiento del  $H_2O_2$ , los tiempos medio de depleción son de 43 y 46 min sin suero y con suero respectivamente dado el aporte de las células (kcel) a la degradación del peróxido. Hacia las 2 h la concentración de  $H_2O_2$  en el medio de cultivo disminuyó totalmente en presencia de células como era de esperar por la actividad celular de la catalasa y glutatión peroxidasa. En general, concentraciones  $\leq 400 \mu M$   $H_2O_2$  fueron completamente eliminadas durante los primeros 60 min tras la administración. A concentraciones iniciales  $\geq 600 \mu M$   $H_2O_2$  después de una rápida fase inicial la eliminación se convierte más lenta y la concentración de  $H_2O_2$  se estabiliza. Esta inhabilidad desarrollada por células para eliminar el peróxido muy probablemente refleja el comienzo de efectos citotóxicos que manifiesta tempranamente con el incremento de la concentración del peróxido.

Cultivos celulares de ARPE-19 con diferentes números de células ( $2, 4, 8 \times 10^5$  cel/pozo) fueron sometidos a varias concentraciones nominal de  $H_2O_2$  ( $400, 800, 1600 \mu M$ ) en un volumen de medio constante para evaluar el efecto de la concentración celular sobre la eliminación del peróxido del medio de cultivo. La figura 6 muestra que al incrementar la concentración celular se acelera la degradación del peróxido.

Un incremento en la concentración celular por incremento del número de células resultó en un cambio a las curvas en relación al efecto de la concentración nominal en los niveles altos del peróxido donde resultó significativo el número de células (Fig. 6 A, B). Sin embargo el efecto de la eliminación es casi independiente de la concentración de células en  $400 \mu M$   $H_2O_2$  de peróxido (Fig. 6C) donde el número de células/ $\mu M$   $H_2O_2$  es más elevado ( $500$  a  $2000$  cel/ $\mu M$   $H_2O_2$ ). Alta dosis celular calculado de la concentración nominal de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado al número de células (cel/ μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) indica que es la dosis más que la concentración celular la que determina la eliminación del peróxido del medio.

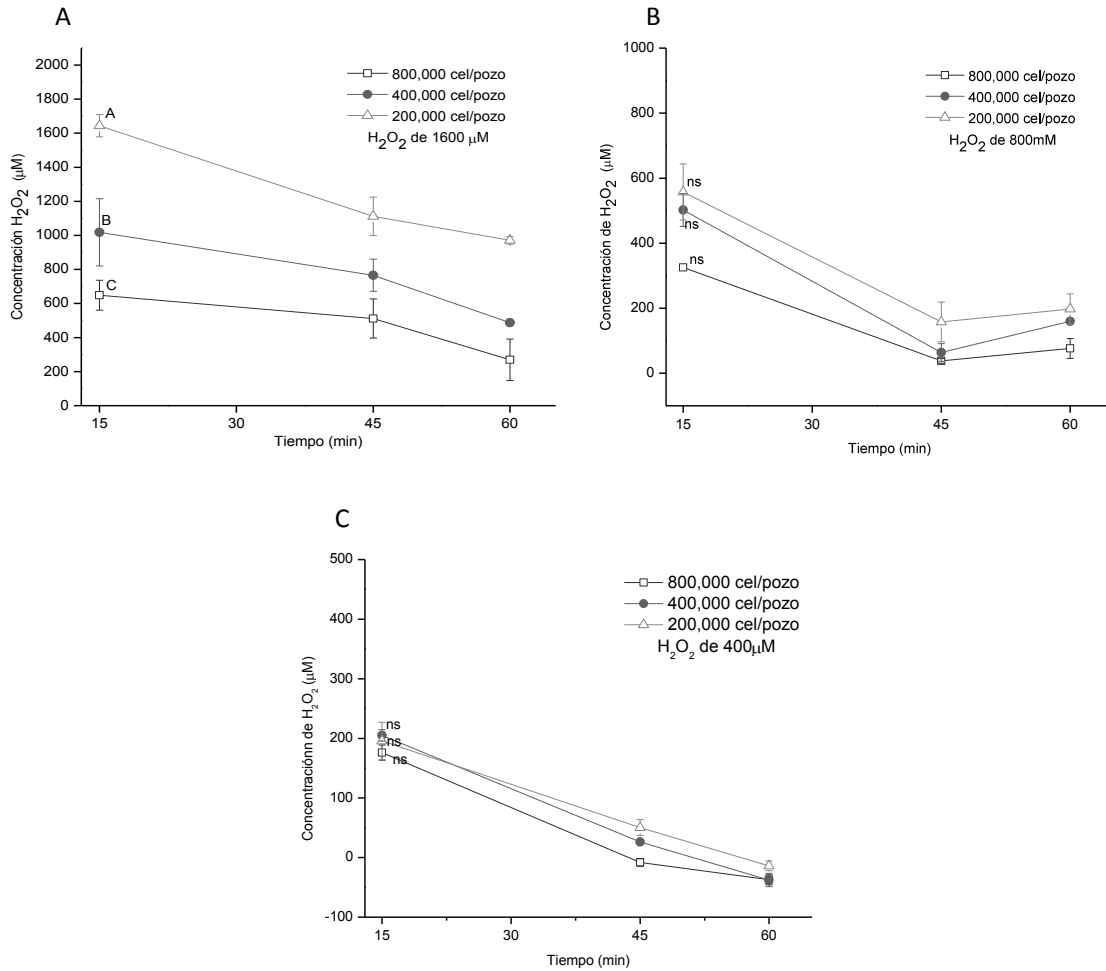


Figura 6 Influencia de la concentración celular sobre la eliminación del peróxido de hidrógeno en células ARPE-19, las células fueron incubadas en diferentes concentraciones iniciales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1600 μM (A), 800 μM (B) y 400 μM (C) durante el intervalo de tiempo de 0-60 min. Los datos corresponden a valores medios ± D.E. de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0.05, ns diferencias no significativas

### VII.1.6. Citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pulso por MTT

Está bien establecido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado al medio de cultivo de ARPE-19 en un pulso simple produce una citotoxicidad dependiente de la dosis del oxidante que puede ser detectado por el ensayo del MTT (Fig 7). En nuestro estudio las células ARPE-19 no mostraron sensibilidad a las bajas concentraciones de peróxido (12.5-200 μM). Presumiblemente porque su mecanismo de defensa antioxidante contrarrestó el efecto dañino de estas concentraciones aplicadas, no resultando tóxicas cuando son adicionadas en un solo pulso a las 24 horas. Además en estas concentraciones el oxidante es eliminado rápidamente del medio de cultivo como fue discutido anteriormente.

Sin embargo a altas concentraciones de 400-1600 μM el mecanismo antioxidante celular parece ser insuficiente para hacer frente a tan alto daño oxidante. Lo que resulta en un elevado porcentaje de muerte celular, a pesar de que las células del EPR no son muy sensibles, dado el ambiente oxidativo a que están adaptadas. Sin embargo concentraciones superiores a 400 μM evidencian daño celular alcanzándose una concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>=948.03 μM) a las 24 horas sin remplazo de medio.

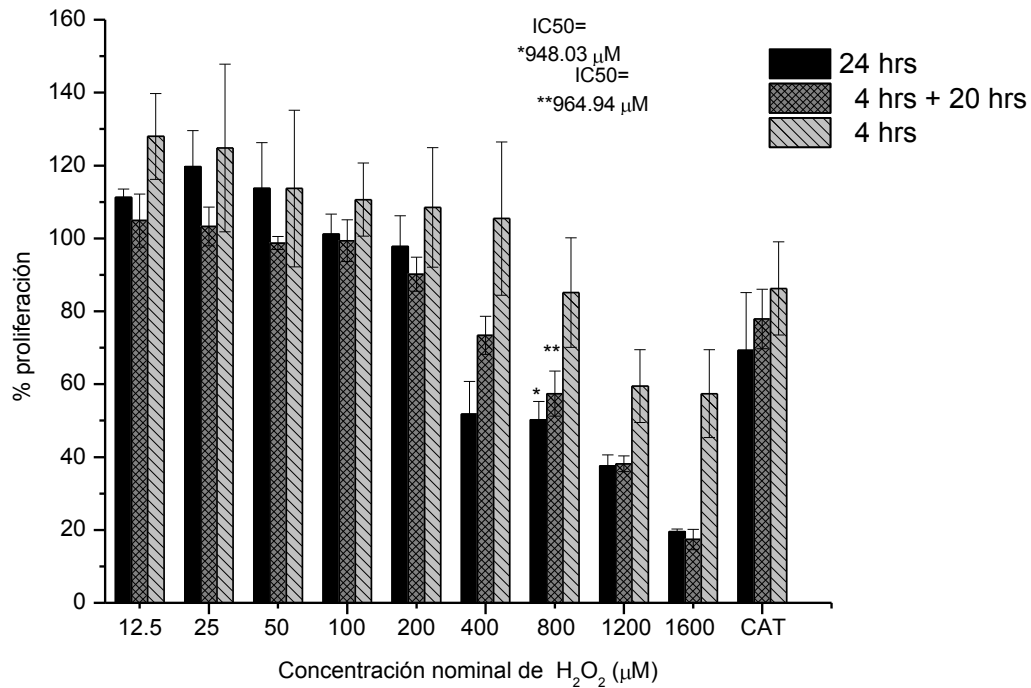


Figura 7 Citotoxicidad por MTT en un cultivo confluyente de células ARPE-19 después de 24 horas de adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un rango de concentración de 12.5 a 1600 µM adicionados al DMEM con 10% de suero. Datos expresados como el porcentaje del control no tratado y presentados como medias ± D.E. de al menos 3 experimentos independientes. Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos por regresión lineal en 24 horas\* ( $y = -0.061x + 107.83$   $R^2 = 0.874$ ), y en 4 horas de eliminación de peróxido + 20 h de medio fresco\*\* ( $y = -0.0542x + 102.3$   $R^2 = 0.989$ ).

Debido a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado al medio de cultivo en pulso es extremadamente agotado dentro de 2 horas (Fig. 2), se pudiera esperar similar citotoxicidad cuando el medio fue reemplazado por medio fresco a las 4 horas después de la adición del oxidante o quedar sin alterar hasta el tiempo final del ensayo (24 horas). Como se muestra similares resultados fueron obtenidos (Fig. 7) con valor de IC<sub>50</sub> = 964.94 µM cuando se realizó el reemplazo de medio. Sin embargo la toxicidad a las 4 horas solo alcanzó un 40% de muerte celular en las concentraciones más altas evaluadas. Estimándose una concentración media inhibitoria de 1612.64 µM. La manifestación de la incipiente citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 4 horas

significa que el efecto tóxico tiene lugar varias horas después que la exposición al peróxido de hidrógeno.

Para evaluar el efecto que produce el acortamiento del tiempo de incubación sobre el potencial citotóxico del peróxido de hidrógeno sobre las células ARPE-19. Se pusieron en contacto las células con el oxidante por tiempos de 30, 60 y 120 min con y sin suero para encontrar la concentración inhibitoria media. La cantidad de  $H_2O_2$  que tiene que ser añadido a cultivos de células ARPE-19 para producir el 50% de citotoxicidad aumentó alrededor de 10 veces por la disminución en el tiempo de incubación (Fig. 8).

La exposición a concentraciones de  $H_2O_2 \leq 0,5$  mM mostró poco efecto en las dos condiciones de cultivo (con y sin suero), sin embargo, la exposición a  $H_2O_2$  5 mM durante 60 y 120 minutos resultó en una pérdida significativa de la viabilidad celular mayor al 50% en el cultivo libre de suero (Fig. 8A) en comparación con los 10 mM requeridos para las células ARPE-19 mantenidas en medio con suero en los mismos períodos de tiempos (Fig. 8B). El aumento de la exposición a 25 mM dio lugar a una pérdida mayor del 50% para los 3 tiempos alcanzando el 80% de muerte celular en ambas condiciones de cultivos a los 120 min. Sin embargo se observa que en presencia de suero para el tiempo de 30 min solo se alcanza un 30% de muerte. La exposición a corto plazo a altos niveles de  $H_2O_2$  induce una marcada toxicidad, lo que sugiere que en estas condiciones experimentales la necrosis es el modo predominante de la muerte celular. La duración de la incubación con  $H_2O_2$  es importante para la determinación de la concentración de  $H_2O_2$  requerida para inducir la muerte celular.

El valor  $IC_{50}$  reveló que la potencia citotóxica en medio de cultivo libre de suero se aumentó casi el doble con respecto al cultivo de ARPE-19 mantenido en 10% de SFB (Fig. 8). Esta alta sensibilidad a la oxidación se produce por la apoptosis inducida por inanición del suero debido a la falta de antioxidantes del mismo. Cuando las células neuronales se cultivaron en medio libre de suero durante 48 h experimentaron una muerte celular alrededor del 40%. La población de células mostró una disminución de la fase S y una aparición de sub-G0 / G1 fase, en comparación con las cultivadas en medio con suero normal. La privación de suero bloqueó con éxito la progresión de las células de la fase G0 / G1 a la fase S e indujo a las células hacia la apoptosis (Kwok et al., 2010; Su et al., 2012).

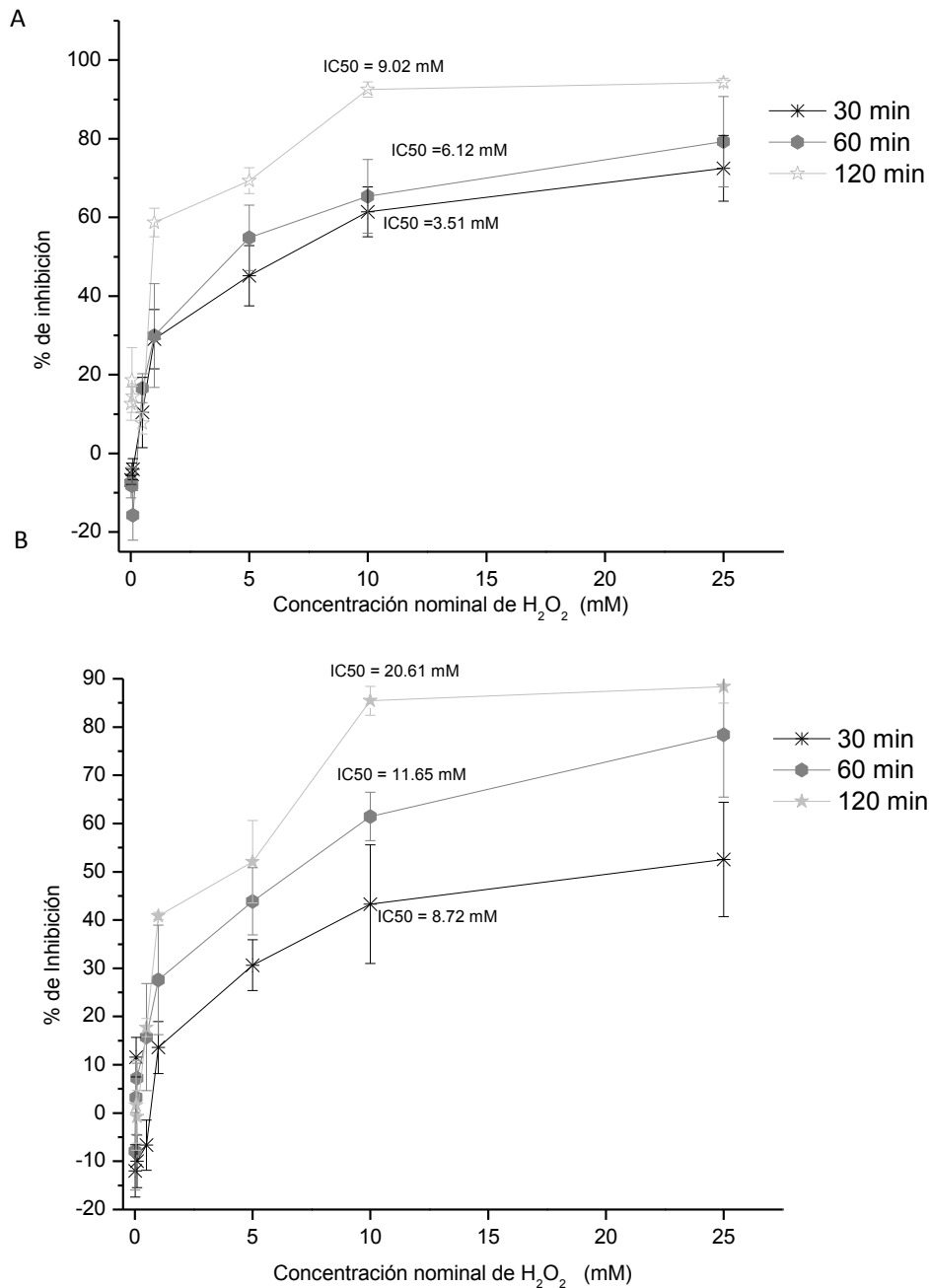
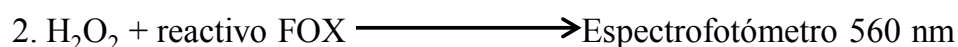
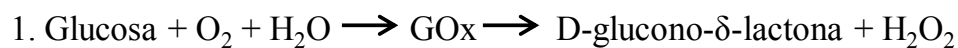


Figura 8 Influencia del tiempo de incubación (30, 60 y 120 min) sobre la acción citotóxica del peróxido de hidrógeno en los cultivos celulares de ARPE-19. Las células fueron incubadas con varias concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01-25 mM en un medio libre de suero (A) y con 10 % de suero (B). Los datos representan las medias ± D.E. de como mínimo tres experimentos independientes en triplicado.



## VII.2. Evaluación Cinética y Tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un Modelo de Generación Enzimática Continúa con Glucosa oxidasa (GOx)

### VII.2.1. Comportamiento de la GOx en el medio en ausencia y presencia de ARPE-19



Reactivo FOX (ferroso (Fe<sup>2+</sup>) – xylenol-orange)

La adición de GOx al medio de cultivo D10 (DMEM+10%SFB) produce una velocidad lineal de acumulación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función de la concentración de la enzima durante la primera hora de incubación en ausencia y presencia de células ARPE-19 (Fig. 9), aunque la velocidad de acumulación en ausencia de células es superior que cuando las células están presentes.

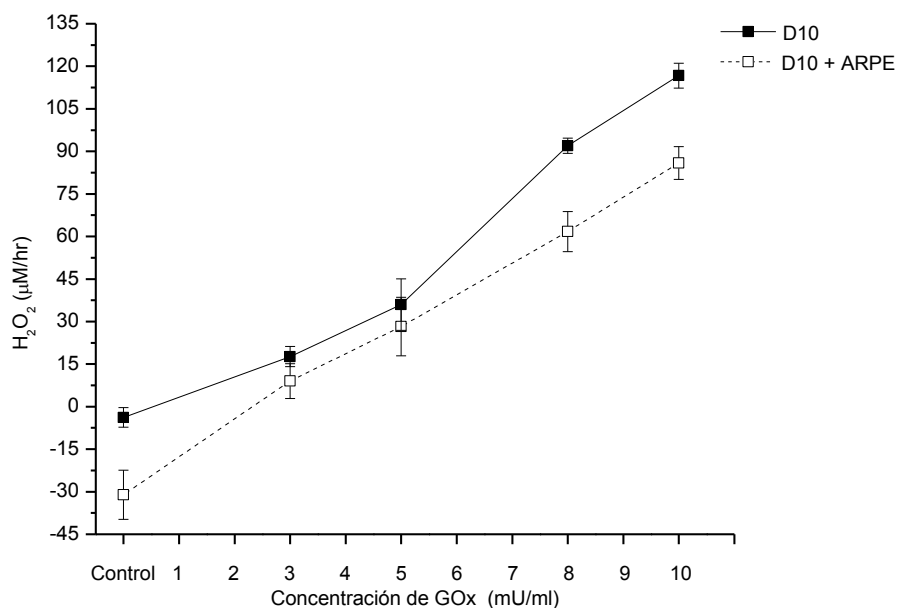


Figura 9 Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo en presencia o ausencia de células ARPE-19 generado a partir de D-glucosa después de 1 hora de adición de glucosa oxidasa (GOx) en concentraciones de 0, 3, 5, 8 y 10 mU/mL. Datos expresados como las medias ± D.E. de al menos 3 experimentos independientes.

En ausencia de células, la concentración de  $H_2O_2$  en el medio es muy superior y continúa el incremento hacia las 48 horas, con un despunte a partir de las 6h (Fig. 10A), sin una aparente inhibición de la GOx por los productos de oxidación como el peróxido de hidrógeno durante ese tiempo. Una cinética de pseudo-cero orden es asumida para la GOx con un suministro ilimitado de glucosa y oxígeno. En presencia de células (Fig. 10 B), la concentración de  $H_2O_2$  en el medio de cultivo después de adición de GOx con el tiempo es sorprendentemente diferente a la de ausencia de células y el perfil difiere con la concentración de la enzima. Con baja concentración de GOx (ejemplo 5 mU/mL) la concentración de  $H_2O_2$  en el medio es casi estacionario en presencia de células. Esta consecuencia probablemente resulta de la condición en la cual las velocidades de producción y descomposición del  $H_2O_2$  son aproximadamente iguales. Con cantidades superiores de GOx (ejemplo 8 o 10 mU/mL), la concentración de  $H_2O_2$  exhibe una dinámica compleja. La concentración continúa el incremento después de la primera hora de adición de la enzima, alcanzando un máximo a aproximadamente a las 6 h, y luego decrece al final. En la adición de 10 mU/mL de GOx al cultivo de ARPE-19 la concentración de  $H_2O_2$  logra un máximo de 60  $\mu$ M a las 6 h y luego declina a 20  $\mu$ M en las 24 h (Fig. 10B). Similar tendencia se observa en 25 mU/mL donde se alcanza un valor máximo de 225  $\mu$ M, una ligera disminución hacia las 24 h y un incremento pequeño hacia las 48 h. Este comportamiento puede estar relacionado al efecto tóxico que esta concentración puede tener sobre las células.

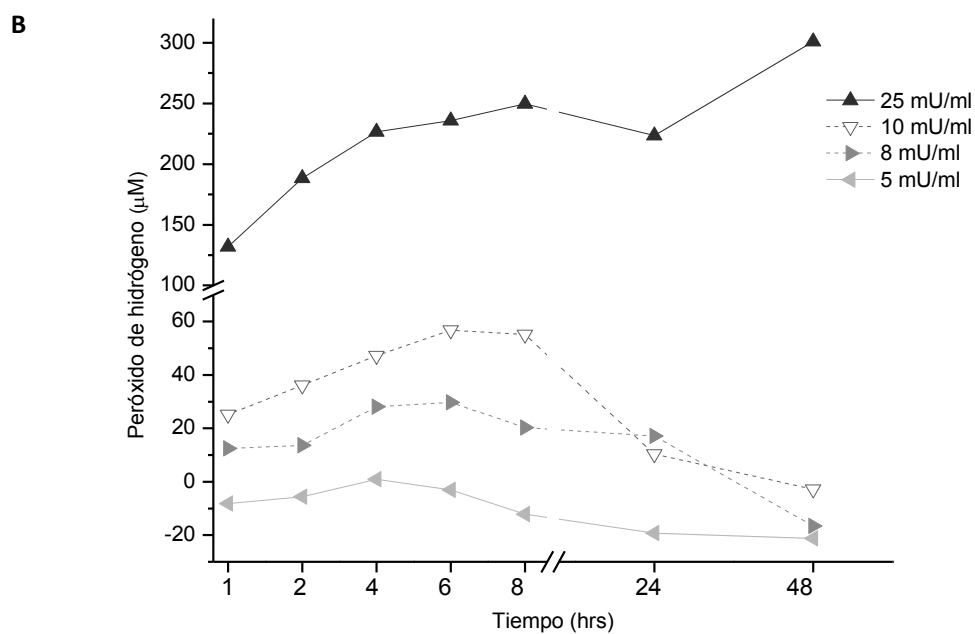
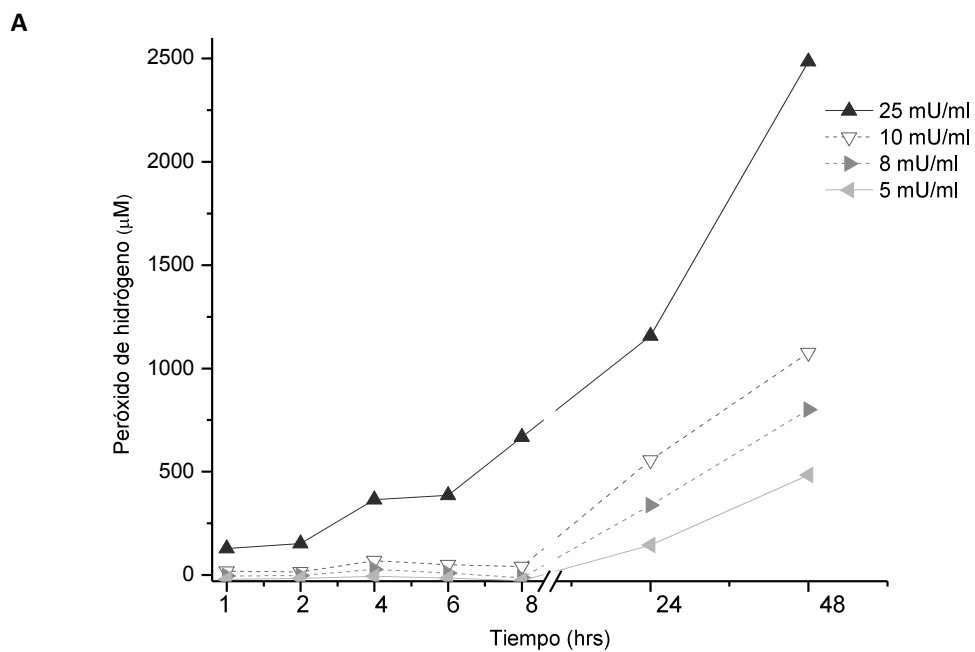


Figura 10 Concentración de  $H_2O_2$  en el medio de cultivo en ausencia (A) o presencia de cultivo confluyente de ARPE-19 (B) generado a partir de D-glucosa después de 24 horas de adición de glucosa oxidasa (GOx) en concentraciones de 0, 5, 8, 10 y 25 mU/mL.

## VII.2.2. Citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzimático por MTT

Similar a la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un solo pulso (Fig. 7), la adición de GOx al medio de cultivo también produce una respuesta citotóxica dependiente de la concentración en el cultivo confluyente de ARPE-19 cuantificado por el ensayo de MTT a las 48 h post-adición (Fig. 11). Bajas cantidades de enzima adicionadas (3 a 8 mU/mL) tienen poco efecto, pero la citotoxicidad fue substancial a concentraciones altas (25 y 50 mU/mL). Esta observación es notable porque las máximas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> logradas a las 6 h después de la adición de las altas actividades de la enzima (Fig. 10B), fueron relativamente bajas comparada a la concentración inicial que produce citotoxicidad cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue adicionado en un solo pulso.

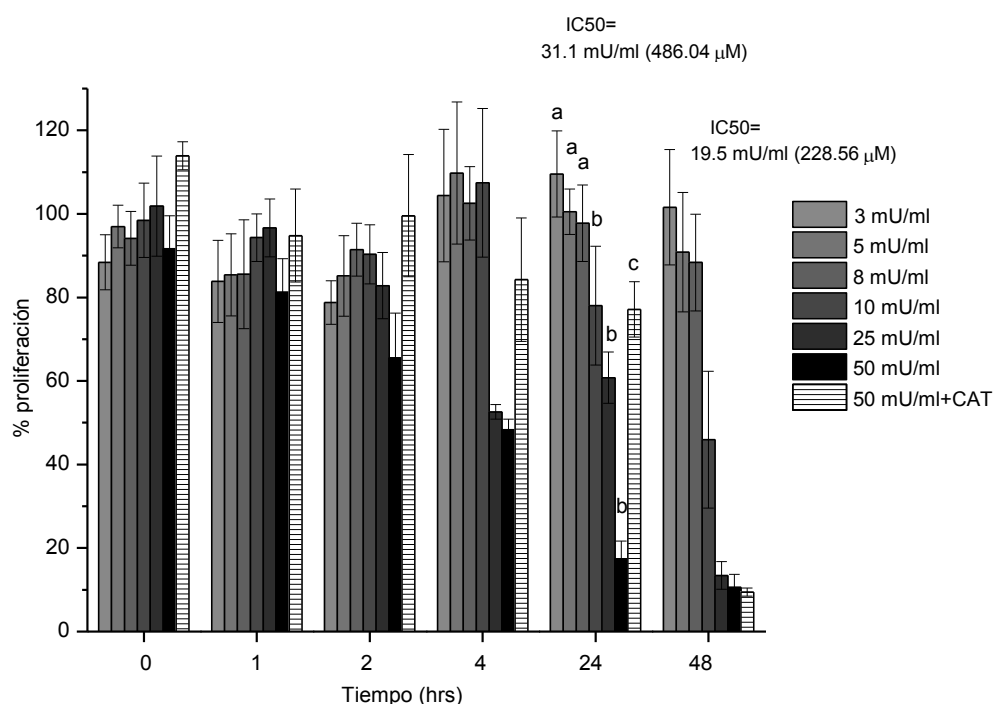


Figura 11 Citotoxicidad en un cultivo confluyente de células ARPE-19 después de 48 h de la adición de glucosa oxidasa (GOx) en un rango de concentraciones de 3, 5, 8, 10, 25 y 50 mU/mL. La citotoxicidad fue estimada por el ensayo del MTT y reportada como un porcentaje de la célula control sin GOx. Una concentración de 200 mU/ml de catalasa fue utilizado como control. Valores de IC<sub>50</sub> 31.1 mU/mL y 19.5 mU/mL a 24 h y 48 h respectivamente. Los datos son las medias de al menos 3 experimentos independientes con sus triplicados por grupos, la barra de error indica la D.E. Letras diferentes en 24 h indican diferencias significativas p<0.05.

El pico de concentración de 225  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por 25 mU/mL de enzima reduce la proliferación celular en un 40% a las 24 h (Fig. 11). Alcanzándose una concentración efectiva media de 486.04  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivalente a una actividad de GOx de 31.1 mU/mL, sin embargo 948.03  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue requerido para producir una comparable reducción del MTT cuando el oxidante fue liberado como un solo pulso (Fig. 7). El daño mitocondrial inducido por el peróxido de hidrógeno con 50 mU/mL de GOx resultó en un potente efecto tóxico donde las deshidrogenasas mitocondriales apenas alcanzaron a reducir el 20 % del MTT.

La adición de catalasa (200 U/ml) al medio de cultivo como control de la degradación del peróxido de hidrógeno generado por 50 mU/mL de GOx muestra que hasta las 24 h la enzima antioxidante catalasa es capaz de contrarrestar la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , brindando una protección mayor del 80%. Sin embargo, se observa que esta supresión en la generación del oxidante disminuye drásticamente hacia las 48 h (Fig. 11). Este resultado puede estar dado por inhibición de la actividad de la catalasa por los productos de oxidación como el peróxido de hidrógeno y el ácido glucónico durante ese tiempo. En nuestras condiciones de estudio la adición de 50 mU/mL de GOx provocó una acumulación del ácido glucónico que acidificó ligeramente el medio de cultivo. Evidenciado por el cambio de color de la sal de sodio del rojo de fenol presente en el medio como indicador.

### **VII.3. Evaluación de la Defensa Antioxidante Intracelular por *Bucida buceras***

El nivel de oxidante y la capacidad antioxidante se midió simultáneamente para evaluar el estrés oxidativo y determinar el poder antioxidante en las células control, en células expuestas al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (pulso o enzimático) y un último grupo en que las células inducidas al estrés oxidativo fueron tratadas con un extracto de *Bucida buceras*. Previamente se evaluó la actividad de inhibición del peróxido de hidrógeno en un sistema a pulso (1600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y enzimático (GOx 50 mU/mL), la capacidad de secuestro del radical DPPH y el poder reductor del hierro férrico (FRAP) por la *Bucida buceras* (12).

La capacidad de inhibir el peróxido de hidrógeno por la *Bucida buceras* en 1h depende del sistema para inducir la oxidación. Como se observa en la Figura 12A la disminución de  $H_2O_2$  es dependiente de la concentración del antioxidante. En el sistema a pulso se logra alcanzar hasta un 60% de inhibición del peróxido mientras que en el sistema de generación continua esta inhibición es de casi el 40% dado a la sostenida producción del oxidante. La concentración media inhibitoria de la *Bucida buceras* fue de 1356.29  $\mu\text{g/ml}$  en el pulso y de 2050.09  $\mu\text{g/ml}$  estimada en el modelo enzimático en 1 h (Fig. 12 A). Estos resultados, muestran que la *Bucida buceras* inhibe al peróxido de hidrógeno dependiente de la concentración y este efecto fue mayor en el sistema de entrega a pulso comparado a la generación continua.

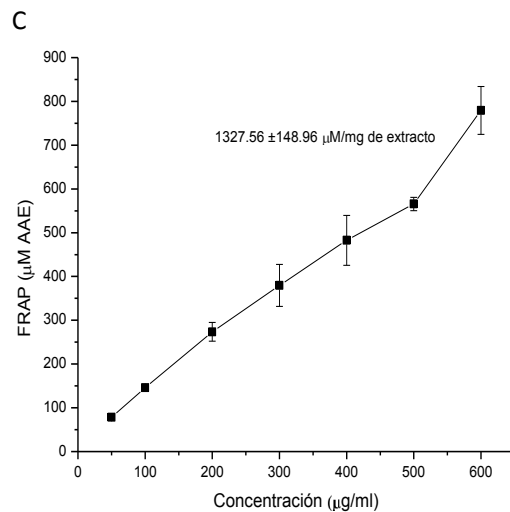
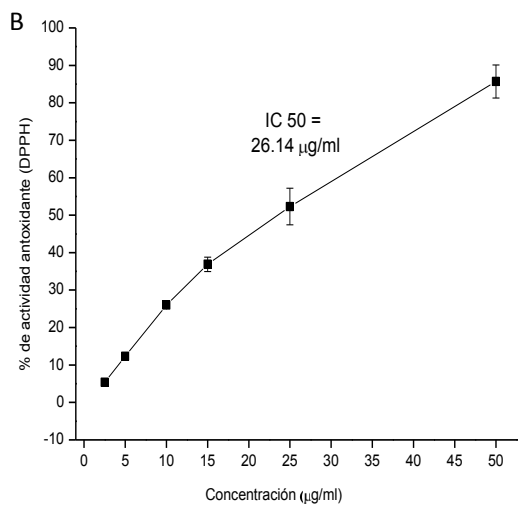
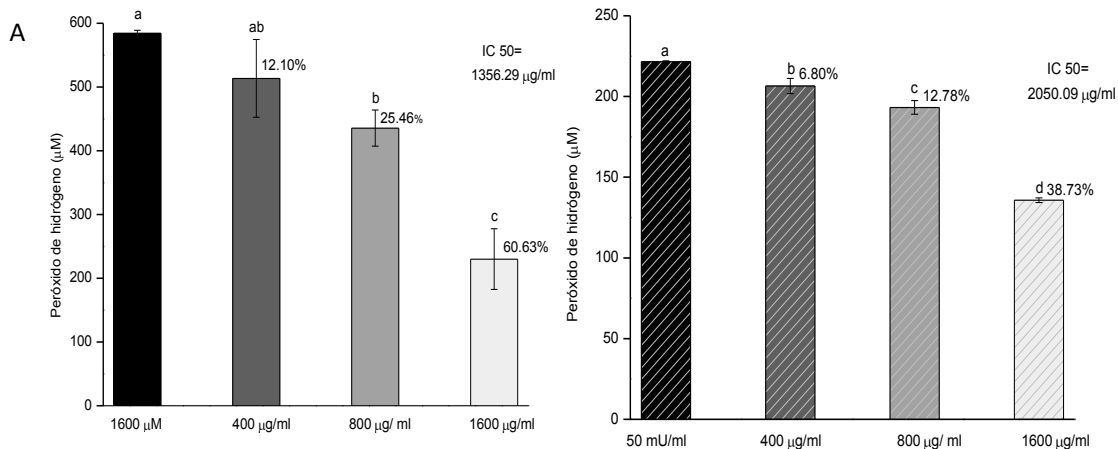


Figura 12 Poder Antioxidante de *Bucida buceras* (A) Inhibición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un sistema a pulso (1600 μM, IC<sub>50</sub> = 1356.29 μg/ml) y enzimático por GOx (50 mU/mL, IC<sub>50</sub> = 2050.09 μg/ml). Cada valor es expresado como la media ± D.E (n=3). Los valores encima de las barras indican porcentajes de inhibición. (B) Actividad de secuestro del radical DPPH concentración de *Bucida buceras* (5 a 50 μg/ml), y = 1.6486x + 6.8934, R<sup>2</sup> = 0.976 IC<sub>50</sub> = 26.14 μg/ml. (C) Poder Reductor del Hierro Férrico (FRAP) concentración de *Bucida buceras* (100 a 800 μg/ml). Datos expresados como las medias ± D.E. de al menos 3 experimentos independientes.

La actividad antioxidante evaluada por la capacidad de secuestro del radical libre DPPH (radical de nitrógeno estable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) es un ensayo fácil, rápido, sensible que permite evaluar el poder antioxidante de compuestos y extractos. En la Figura 12 B se muestra que a mayor concentración de *Bucida buceras* mayor porcentaje de decoloración de la solución de DPPH. El resultado muestra que la actividad antirradical es dependiente de la concentración. Mientras mayor fue la decoloración dada por la capacidad del compuesto de estabilizar el radical libre DPPH más potente es su actividad antioxidante.

La concentración inhibitoria de 26.14  $\mu\text{g/ml}$  calculada a partir de la regresión lineal, indica el fuerte poder antioxidante que presenta este extracto. El secuestro del radical libre DPPH representa la habilidad de los grupos hidroxilos presentes en el extracto para secuestrar los radicales libres a través de mecanismos de donación de hidrógeno o electrón. Esta actividad antioxidante puede estar relacionada con compuestos fenólicos y carotenos presentes en la *Bucida buceras* detectados en los tamizajes fitoquímicos realizados previamente. Compuestos antioxidantes puros como el ácido ascórbico, catequina, rutina presentan valores de  $\text{IC}_{50}$  de 7.88, 7.24 y 13.6  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

El poder reductor del hierro férrico (FRAP) refleja el poder antioxidante total involucrando la transferencia de un electrón. El principio del ensayo del FRAP es basado en la fortaleza antioxidante en la reducción del complejo férrico-TPTZ a su forma ferrosa. La intensidad de formación del color azul es proporcional a la concentración de la forma ferrosa y de la capacidad antioxidante del extracto. El poder reductor muestra un incremento lineal con el aumento de la concentración (Fig. 12C). El poder reductor de 1327.56  $\mu\text{MAAE/mg}$  señala que el extracto posee una excelente capacidad reductora. Ambos métodos confirman que *Bucida buceras* presenta una potente actividad antioxidante.



## **VII.4. Evaluación del glutatión reducido (GSH), enzimas antioxidantes: catalasa y glutatión peroxidasa y Poder reductor (FRAP)**

### **VII.4.1. GSH**

Las células eliminan intracelularmente el  $H_2O_2$  principalmente por antioxidantes endógenos como el glutatión reducido (GSH) y por antioxidantes enzimáticos como la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Para evaluar el efecto de los métodos de inducción por pulso o enzimático y la acción generada por la *Bucida buceras* frente al reto oxidativo fueron medidos los niveles intracelular del GSH en los lisados del cultivo celular de ARPE-19.

La incubación de células de retina con peróxido de hidrógeno causó una disminución del glutatión reducido dependiente de la concentración. Los resultados revelaron que las células tratadas con glucosa oxidasa poseen concentraciones de glutatión reducido significativamente menores (40-60  $\mu\text{g/ml}$ ) con reducciones del 40-50% respecto a las células ARPE-19 control (sin peróxido) (Fig. 13 A). Sin embargo, tratamientos con adición del  $H_2O_2$  en forma de pulso muestran ligero agotamiento del GSH en las concentraciones de 800-1000  $\mu\text{M}$ , aunque una concentración de 1600  $\mu\text{M}$  alcanza una depleción significativa comparada con el sistema de generación continua por glucosa oxidasa. Las células control catalasa (50mU/mL GOx + 200 U/ml de CAT) mostraron contenidos de GSH a nivel de células control lo que evidencia la eliminación del peróxido por la enzima antioxidante.

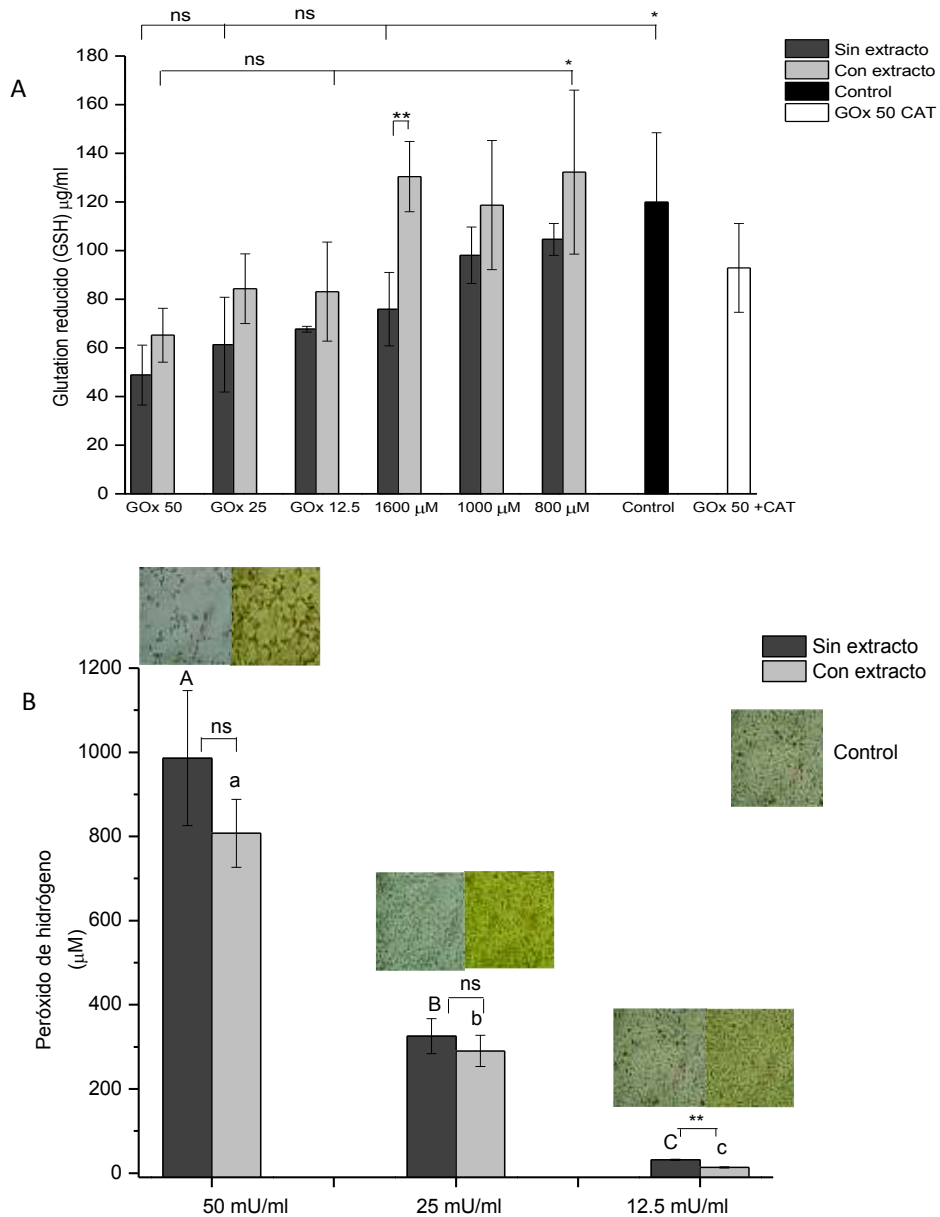


Figura 13 Efectos de GOx y adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el glutatión reducido (GSH) en 24 h (A). Células ARPE-19 tratada con 12.5, 25 and 50 mU/mL de GOx o pulso de 800, 1000, 1600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ARPE-19 tratada con 1600 µg/ml de extracto de *Bucida, buceras*, control celular y control catalasa GOx (50 mU/mL)+200 U/ml CAT; (B) Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en GOx a 24 h, fueron cuantificados usando el reactivo de FOX. Valores son expresados como media ±DE en µM (n=3 experimentos independiente). Morfología celular es presentada (aumento original 40x). \*p<0.05 diferencias significativas entre valores de control de células vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tratadas. \*\* p<0.05 diferencias significativas entre valores con tratamientos antioxidantes vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tratadas, ns diferencias no significativas.

Para explorar los efectos de la *Bucida buceras* sobre la homeostasis redox de células ARPE-19 fue medida la concentración intracelular de glutatión reducido. Los niveles de GSH fueron incrementados en los cultivos de ARPE-19 expuestos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia del extracto. Como se observa en la Figura 13 A el contenido de GSH incrementó entre el 20 al 70% sobre las células tratadas solamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo significativa la reversión de la depleción del GSH para el tratamiento en pulso a 1600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La recuperación del contenido de glutatión en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en forma de pulso alcanzó el nivel del control celular, no así para los tratamientos del método enzimático donde el porcentaje de recuperación se encontró entre el 50-70%. Estos resultados indican la posible participación del GSH en la cito-protección inducido por la *Bucida buceras*.

Un menor contenido del glutatión reducido indica un incremento en el consumo de antioxidantes por parte de las células ARPE-19 para contrarrestar la elevada concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta conducta resultó principalmente por el incremento de la acumulación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 24 h en función de la actividad de la GOx (Fig. 13B), mientras que la entrega de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un solo pulso no se sostiene para ese tiempo. El contenido de peróxido generado en las diferentes actividades de la glucosa oxidasa disminuyó cuando el cultivo celular fue incubado en presencia del extracto antioxidante, siendo estadísticamente significativa esta diferencia en 12.5 mU/mL. Estos resultados reafirman la capacidad antioxidante que presenta la *Bucida buceras* y su potencial efecto protector en las células epiteliales de retina para preservar la visión.

Cambios significativos en la morfología celular con el incremento de la concentración del oxidante y la capacidad protectora del antioxidante fueron apreciados (Fig. 13 B). Las células ARPE-19 control presentan forma de huso alargado característico de una morfología epitelial de retina. Al someter estas células a tratamientos con peróxido estas adoptan un aspecto muy diferente que se va acentuando con la graduación del estrés oxidativo. Se observó que el soma celular pierde el aspecto fusiforme y se hace globuloso dificultando la percepción de los núcleos celulares. Efectivamente se observó que el co-tratamiento con *Bucida buceras* es capaz de reducir el grado del daño oxidativo al preservar en alguna medida sus características morfológicas.

El GSH sirve como un antioxidante por el secuestro de EROs, que oxidan el residuo de cisteína. La oxidación de GSH impulsa la formación de disulfuro de glutatión

(GSSG); que luego se puede reciclar directamente a través de la enzima glutatión disulfuro reductasa-GSH, una reacción que requiere NADPH (Fig. 14). La relación GSH/GSSG se utiliza a menudo como un indicador del estado redox intracelular; un elevado estado oxidado está asociado con la diferenciación y la apoptosis. El GSH también puede actuar como un cofactor en enzimas antioxidantes, tales como GSH peroxidasa, glutaredoxina y glutatión S-transferasas.

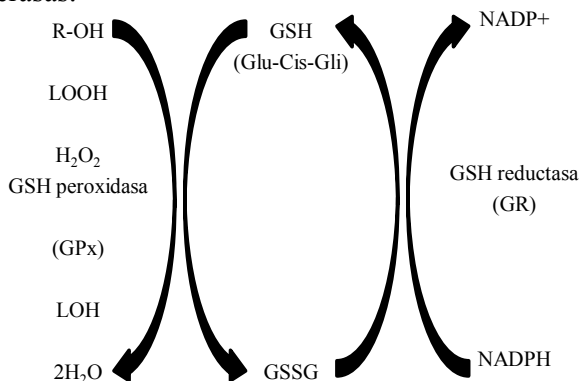


Figura 14 Diagrama del sistema redox del glutatión. Glutatión es un tripéptido de cisteína, glutamato y glicina, el cual sufre oxidación y forma su homodímero GSSG. GSSG (glutatión oxidado) puede participar en modificaciones postranslacional de proteínas. GSSG puede ser reciclado a su forma reducida por GSH reductasa en una reacción que utiliza NADPH.

#### VII.4.2. CAT y GPx

Está bien establecido que en las células el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es eliminado intracelularmente principalmente por enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). El efecto de diferentes tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GOx y pulso) sobre la actividad de la CAT y GPx es mostrado en la Figura 15 A y B. La actividad de la catalasa resultó ser ligeramente menor en células ARPE-19 expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparada a las células control (sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Aunque se encontró que co-tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con *Bucida buceras* incrementa la actividad de la enzima con respecto a las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y control (Fig. 15A) manifestando la naturaleza antioxidante y protectora del extracto. La catalasa es de especial relevancia cuando las células son expuestas a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

debido a sus esencialmente no saturable cinética de primer orden. La catalasa ejerce una función de "filtro" que impide de manera muy eficiente la acumulación de niveles altos intracelular de  $H_2O_2$  por dismutación en  $H_2O$  y  $O_2$ .

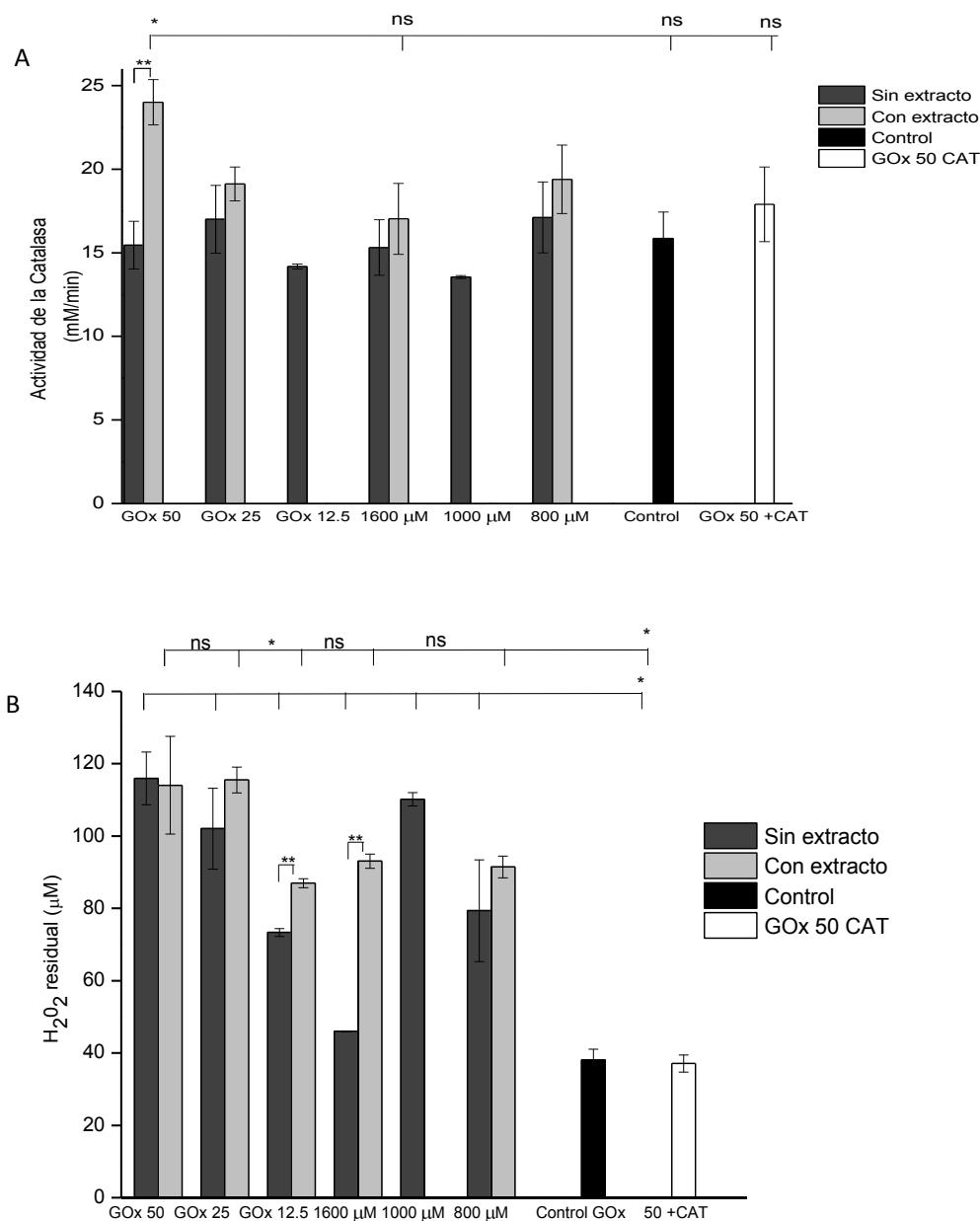


Figura 15 El efecto del peróxido de hidrógeno por generación enzimática (GOx 50, 25 y 12.5 mU/mL) y pulso (1600, 1000, 800  $\mu$ M) en co-tratamiento con *Bucida buceras* (1600 ug/ml) sobre la actividad de la catalasa (A) y la actividad de GSH-peroxidasa (B),  $H_2O_2$  (inicialmente, 200  $\mu$ M en PBS en presencia de 500  $\mu$ M GSH fue incubado por 1h, a 37 °C con diferentes lisados de ARPE-19, control GOx 50 mU/mL+ catalasa 200 U/ml. Valores expresados como media  $\pm$  DE en  $\mu$ M (n=3 experimentos independiente). \*p<0.05 indica diferencias significativas por el test de Tuckey entre valores de control de células vs  $H_2O_2$  de células vs  $H_2O_2$  tratadas, ns diferencias no significativas.

La actividad GSH-peroxidasa se evidencia por la medición del  $H_2O_2$  residual durante la incubación de 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  y 500  $\mu M$  GSH con lisados de ARPE-19 sometidos a diferentes tratamientos. Hemos evaluado si los lisados de ARPE-19 tratados con  $H_2O_2$  o GOx tuvieron diferente efecto en el agotamiento del peróxido dado por la actividad de la glutatión peroxidasa (Fig. 15 B). Los controles (células sin peróxido o GOx (50 mU/mL + catalasa 200 U/ml)) tuvieron un contenido residual de peróxido menor a los tratamientos con oxidantes. En los tratamientos enzimáticos con GOx el peróxido residual disminuyó dependiente de la actividad de la enzima no mostrándose esa misma relación en los tratamientos a pulso. En la concentración más alta probada (50 mU/mL), se obtuvo la menor actividad de la GSH-peroxidasa como se indica por el mayor residual de  $H_2O_2$ . No se observó efecto del extracto de *Bucida buceras* sobre la actividad de glutatión peroxidasa.

La elevada actividad de la CAT y las altas concentraciones de GSH parecen actuar como la primera línea de defensa contra la formación de  $H_2O_2$  y el daño oxidativo en las células ARPE-19 co-tratados con *Bucida buceras*. Sin embargo la actividad de la GPx es bastante baja en las células ARPE-19 con extracto, lo que sugiere que la GPx tiene un papel menor en la desintoxicación de  $H_2O_2$ . Una explicación de la importancia relativa de catalasa y no de la GPx en la desintoxicación de  $H_2O_2$  en las células ARPE-19 puede ser la localización intracelular y la cinética de estas enzimas. La enzima catalasa se encuentra en los peroxisomas y su acceso al citosol es limitado. Sin embargo la GPx, a diferencia de la catalasa, está presente principalmente en el citosol y puede ser saturada primero por el  $H_2O_2$ .

#### **VII.4.3. FRAP**

La capacidad antioxidante evaluada por el poder reductor del hierro férrico (FRAP) disminuyó significativamente casi 4 veces después del tratamiento con adición o generación enzimática del  $H_2O_2$  durante 24 h en comparación al control basal del cultivo celular (Fig. 16). Como la *Bucida buceras* ha mostrado capacidad para proteger la homeostasis redox de las células epiteliales pigmentaria de retina frente al daño oxidativo,

se midió el poder reductor del hierro férrico (FRAP) en diferentes retos. El co-tratamiento con *Bucida buceras* aumentó significativamente la capacidad antioxidante basal de 48.5 a 345.15  $\mu\text{M}$ . Nuestros resultados mostraron que células ARPE-19 tratada con extracto exhibió un aumento significativo en la protección oxidativa en ambos tratamientos (enzimático y pulso). De manera similar, aumentó 3 veces la capacidad antioxidante de GOx-50 mU/mL+ CAT con respecto a de GOx-50 mU/mL, comparable a las células control, pero menor que los tratamientos con *Bucida buceras*.

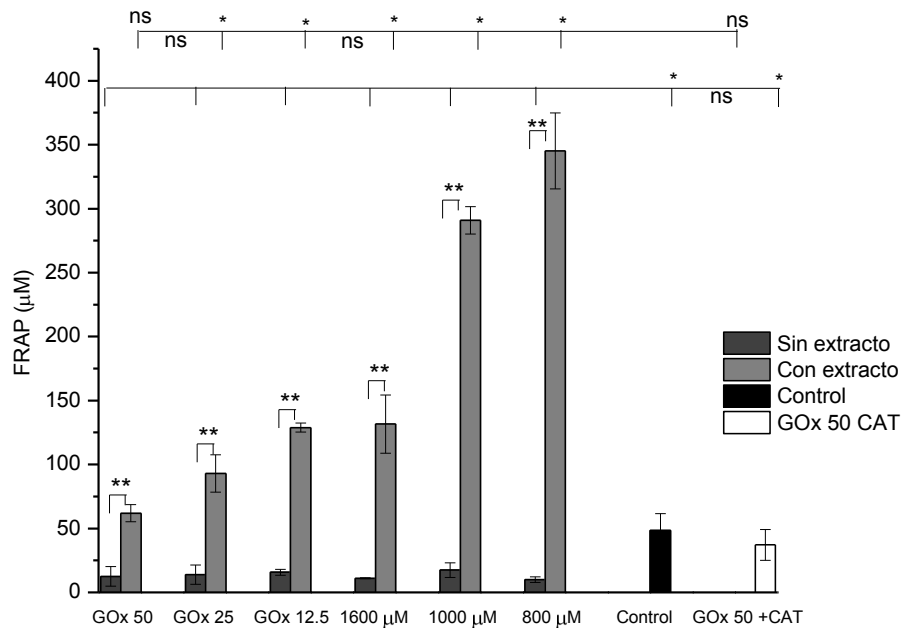


Figura 16 Efecto del co-tratamiento de *Bucida buceras* en el cultivo de ARPE-19 tratado con (GOx) o adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la capacidad antioxidante evaluada por el poder reductor (ensayo de FRAP). Valores expresados como media  $\pm$  DE en  $\mu\text{M}$  (n=3 experimentos independiente). \* $p < 0.05$  diferencias significativas por el test de Tuckey entre valores de control de células vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratadas, \*\* $p < 0.05$  diferencias significativas entre valores con tratamiento antioxidante vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratadas, ns diferencias no significativas.

## VII.5. Efecto protector de *Bucida buceras* sobre el daño tóxico inducido por la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En este estudio la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue usado para inducir el estrés oxidativo en células ARPE-19. Después de 24 h de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la viabilidad fue reducida de una manera dependiente de la concentración del oxidante (Fig. 17). A una concentración  $\approx 1000\mu\text{M}$  la viabilidad celular fue reducida en un 50% evaluada por el método de MTT. Co-tratamientos con *Bucida buceras* en un rango de concentración de 50 a 1600  $\mu\text{g/ml}$  no comprometen la viabilidad celular del cultivo (Fig. 17 inserto) por la baja toxicidad presentada hasta la concentración de 1600  $\mu\text{g/ml}$ .

La Figura 17 muestra que co-tratamientos con el antioxidante puede atenuar la muerte celular inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> principalmente en las concentraciones de 1200 y 1600  $\mu\text{M}$  lográndose casi un 20% de incremento en la proliferación celular en las concentraciones de mayor toxicidad con recuperación en la morfología celular. Similar resultado fue obtenido para los tratamientos con GOx (Fig. 13 B) discutidos anteriormente. Estos resultados apuntan al efecto retino-protector ejercido por *Bucida buceras* inducido a un reto oxidativo.



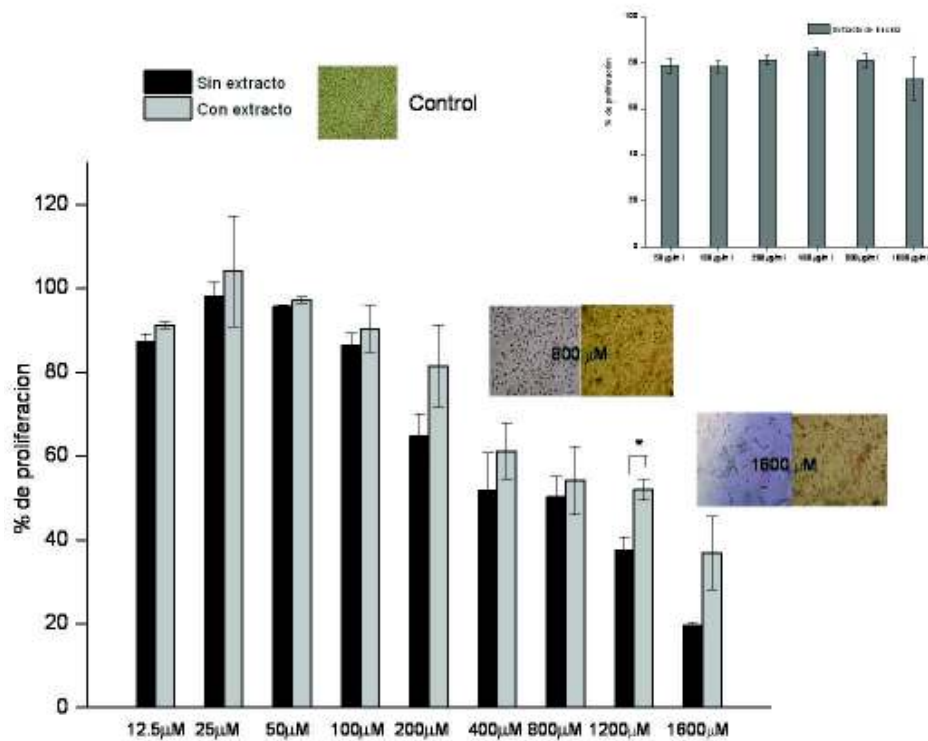


Figura 17 Efecto protector de *Bucida buceras* (1600 µg/ml) sobre la muerte celular inducido por adición de 12.5 a 1600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de en un cultivo de ARPE-19 a las 24 h. Inserto corresponde al estudio de toxicidad celular de *Bucida buceras* en un rango de concentración de 50 a 1600 µg/ml. Valores expresados como media ± DE en µM (n=3 experimentos independiente). \*p<0.05 indica diferencias significativas por el test de Tuckey. Morfología celular es presentada (aumento original 40x).

El cambio significativo en la morfología celular con el aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células ARPE-19 se asoció con una disminución en la concentración de proteínas dependiente de la dosis del peróxido. Sin embargo, el tratamiento con *Bucida buceras* permitió un aumento significativo de la proteína celular (Fig. 18 A). A partir de estos resultados es evidente que el tratamiento del antioxidante ejerce un efecto beneficioso sobre la tolerancia al estrés oxidativo. La pérdida de proteína a partir de la capa de células en comparación con los cultivos controles fue relacionado con la acción citotóxica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Debido a que la disminución en la concentración de proteína podría representar un efecto citostático o citotóxico; el ensayo de MTT fue realizado en los diferentes modelos de inducción. Considerando que tratamientos con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 5 mU/mL GOx resultaron no tóxico a las 24 h un incremento a 900 µM en pulso de ó 32.5mU/ ml de GOx

resultó en un 50% de la fracción de supervivencia alcanzando un 80% de muerte celular en 1600  $\mu\text{M}$  o 50 mU/mL de GOx (Fig. 18 B).

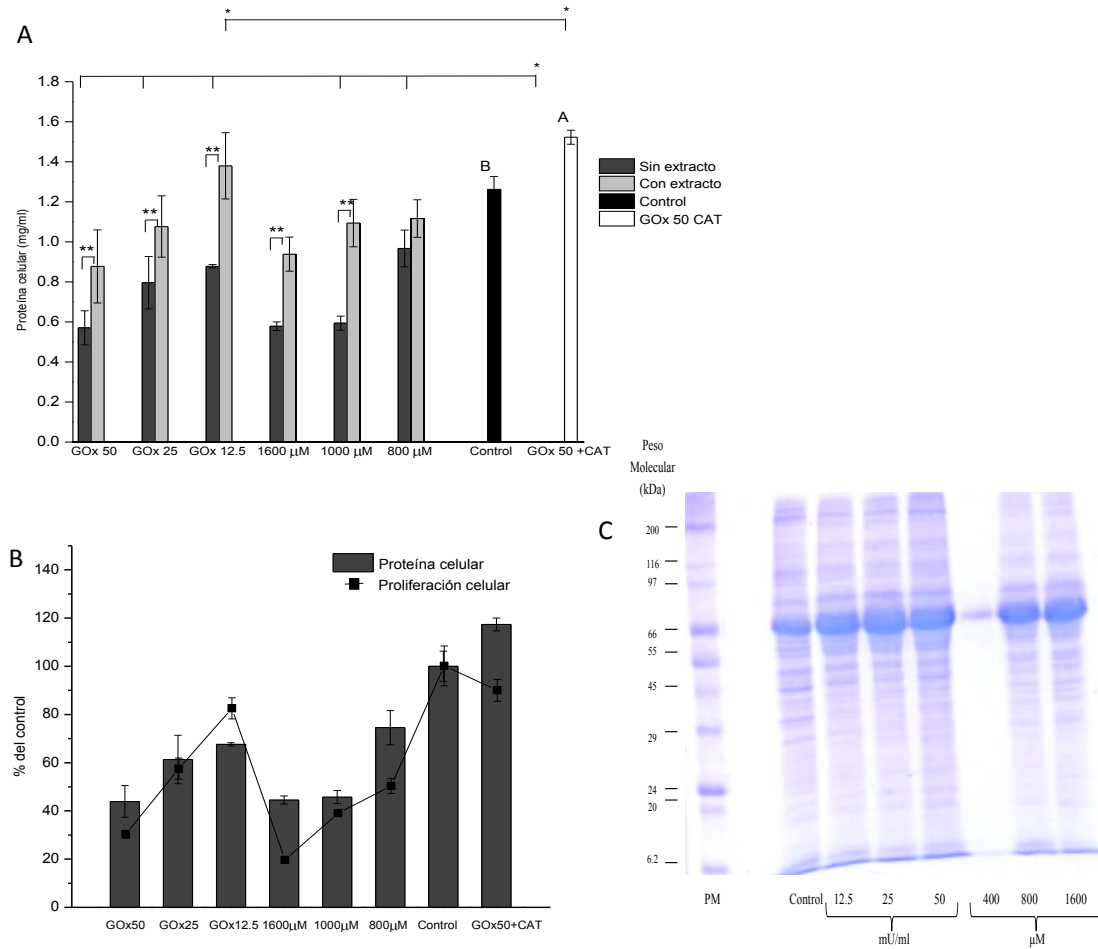


Figura 18 Efecto de la *Bucida buceras* sobre el daño a la proteína celular inducido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado enzimáticamente por GOx (50, 25, 12.5 mU/mL) o por adicción (1600, 1000 y 800  $\mu\text{M}$ ) (A). Relación entre la concentración de proteína celular y la acción citotóxica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (B). Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.(C). Valores expresados como media  $\pm$  DE en  $\mu\text{M}$  (n=3 experimentos independiente). \* $p < 0.05$  diferencias significativas por el test Tuckey entre valores de control de células vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratadas, \*\* $p < 0.05$  diferencia significativa entre valores con tratamiento antioxidante vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratadas.

En la Figura 18 B es claramente visible que las células tratadas con peróxido de hidrógeno están perdiendo su capacidad de dividirse de una manera dependiente de la concentración. La capacidad de proliferación en 1600  $\mu\text{M}$  no se pudo recuperar después de 24 h después del inicio del desafío oxidativo. Esta inhibición permanente en la proliferación podría atribuirse a la persistente presencia de agregados de proteínas en las células ARPE-19.

Los lisados celulares de ARPE-19 procedentes de los tratamientos experimentales se evaluaron para determinar la actividad funcional de la caspasa utilizando la caspasa-3-específica del sustrato Ac-DEVD, este conjugado péptido-PNA es un no-cromóforo hasta que el PNA se escinde del péptido por una caspasa activa y en consecuencia, el aumento de la absorbancia es indicativo de la actividad de la misma.

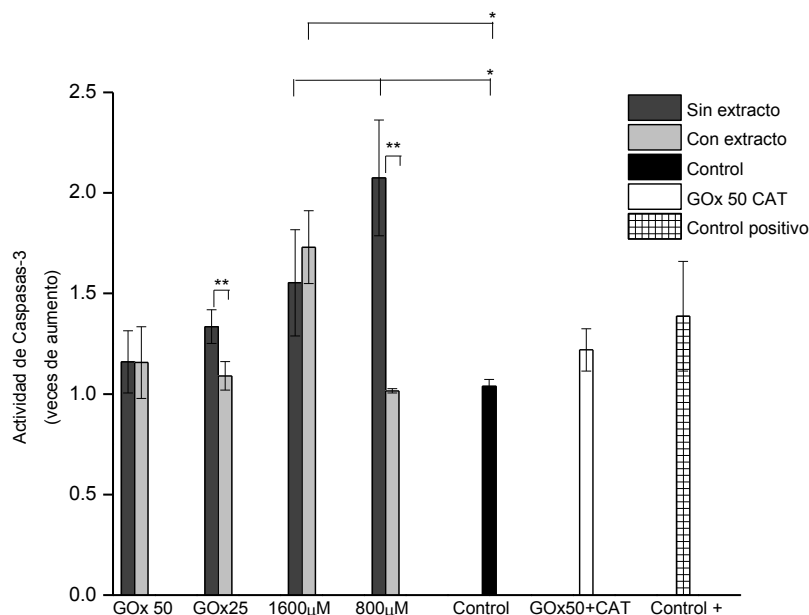


Figura 19 Actividad de Caspasa-3 inducida por adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (800 o 1600  $\mu\text{M}$ ) y GOx (25 o 50 mU/mL) sobre células ARPE-19 a las 24 horas. Las células control, y células control positivo ( $\text{C}^+$ ) no fueron tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{C}^+$  (control específico de caspasa-3). Las células fueron co-tratadas con 1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de extracto de *Bucida buceras*. GOx50 mU/mL+ CAT (200 U/ml). Valores expresados como media  $\pm$  DE en  $\mu\text{M}$  ( $n=3$  experimentos independientes). \* $p<0.05$  diferencias significativas por el test de Tuckey entre valores de control de células vs células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , \*\* $p<0.05$  diferencias significativas entre valores con tratamiento antioxidante vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratadas.

Dado que el tratamiento con *Bucida buceras* inhibió el efecto citotóxico generado por estrés oxidativo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se estudió el efecto directo sobre la actividad caspasa-3. La Figura 19 muestra que el antioxidante ejerció una disminución significativa en la actividad de la caspasa-3, principalmente cuando se estudiaron concentraciones moderadas. El extracto fue capaz de prevenir el aumento en actividad de caspasa-3 inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tratamientos de GOx 25 mU/mL y 800 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con reducciones del 13 y 51% respectivamente.

El envejecimiento de la retina y del EPR está asociado con un incremento en el nivel del daño oxidativo. Es generalmente asumido que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en el desarrollo o la progresión de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y de otras retinopatías. La pérdida de la función de los fotorreceptores es una consecuencia del daño oxidativo al EPR (Miranda et al., 2010; Yu et al., 2012). En este estudio se empleó varios métodos para determinar si el tratamiento concomitante con el extracto puede alterar la respuesta de muerte celular y la homeostasis redox sobre un cultivo de ARPE-19 expuesto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos presentados muestran que el extracto de *Bucida buceras* puede proteger parcialmente al cultivo celular de la muerte celular inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El cambio intracelular en el estado redox contribuye a incrementar la capacidad de las células para soportar el estrés oxidativo. Por otro lado, el tratamiento con el antioxidante fue capaz de prevenir el daño inducido debido a un aumento en el poder reductor, un incremento el nivel de glutatión, y de la actividad de la catalasa (Fig. 20). Los hallazgos, llevan a la conclusión de que la regulación del estado redox celular puede ser la principal acción de *Bucida buceras* para proteger las células del estrés oxidativo y prevenir o curar patologías oculares asociadas al estrés oxidativo.

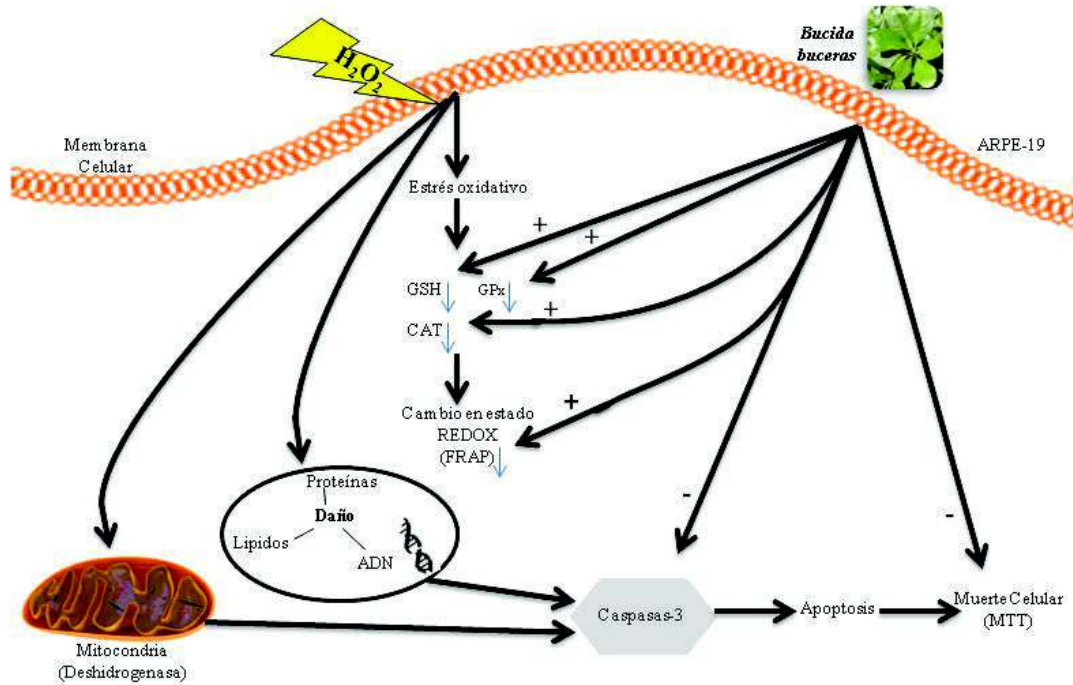


Figura 20 Visión esquemática de los efectos protectores del extracto de *Bucida buceras* sobre ARPE-19. Células con el extracto durante 24 horas protegidas contra la toxicidad de  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  puede causar estrés oxidativo en ARPE-19 como se indica por un agotamiento de GSH, GPx y en CAT, también se ve un daño a la enzima mitocondria deshidrogenasa. Este agotamiento y daño puede verse reducido con el tratamiento del extracto. El “+” y “-” indican un aumento o disminución, respectivamente, de la actividad enzimática o contenido molecular bioquímico.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Evaluación Cinética y Tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un Modelo de Adición en Pulso

#### VIII.1.1. Efecto del suero fetal bovino (SFB) sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Numerosos estudios han analizado la respuesta de los cultivos celulares al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando es adicionado al medio de cultivo como simple o repetidos pulsos. Usualmente el propósito de estos experimentos es investigar la respuesta celular al estrés oxidativo como puede ocurrir naturalmente en condiciones de patologías crónicas. Muchos de estos estudios han sido conducidos por adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido al medio de cultivo celular (tratamientos por pulsos o bolos) asumiendo que estos al menos parcialmente mimetizan condiciones y respuestas que pueden ocurrir in vivo.

No está claro cuales componentes del medio pudieran ser responsables por la disminución observada. Quizá aminoácidos presentes en el DMEM tales como: metionina, cisteína y triptófano interactúan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduciendo a su consumo (Kim et al., 2001; Kaczara, 2010). Además la suplementación diferente al medio de cultivo con antioxidantes, precursores y distintos aditivos consumidores de peróxidos tales como piruvato y albúmina de suero son conocidos como secuestradores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### VIII.1.2. Efecto del tiempo sobre estabilidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pulso

Kaczara et al., 2010 y Gulden et al., 2010 reportaron una ligera declinación con el tiempo en la concentración de peróxido (100 y 200 μM) en ausencia de células (ARPE-19 y C6). Aunque el medio reportado en sus experimentos fueron MEM/10% SFB y DMEM libre de piruvato y de suero. Sin embargo Kaczara et al., 2010 reportaron que la ligera, pero medible descomposición del peróxido es un orden de magnitud mayor que en PBS.

Diferencias en los medios de cultivo o en la suplementación del medio con antioxidantes y precursores, así como diferentes contenidos de aditivos consumidores de peróxidos tales como piruvato y albúmina de suero conllevan a variabilidad en la eliminación del peróxido.

#### **VIII.1.4. Velocidad de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La contribución intracelular de la actividad de la catalasa aportada por las células ( $k_{\text{cel}}$ ) es importante en la eliminación del peróxido. Sobotta et al., 2013 reportaron que cultivos celulares de Jurkat T presentaron valores de  $k_{\text{cel}}$  entre 0.0006 a 0.0015 s<sup>-1</sup>. Por lo tanto, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue menor dado a la contribución de las células. Aunque muchas líneas celulares tienden a exhibir  $k_{\text{cel}}$  de entre 1-1.5 x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, estas pueden ser diferentes entre cultivos celulares y/o células primarias por ejemplo células primarias del hígado muestran 10 veces mayor  $k_{\text{cel}}$  que líneas celulares de hepatomas.

Una rápida caída exponencial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es consistente con los resultados reportados para otros tipos de células (Gulden et al., 2010; Sobotta et al., 2013) y para EPR (Kim et al., 2003; Kaczara, et al., 2010).

#### **VIII.1.5. Influencia de las células (ARPE-19) sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La concentración nominal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un cultivo de células se corresponde con concentraciones iniciales que son eliminadas rápidamente del medio de cultivo (Dringen y Hamprecht, 1997; Antunes y Cadenas, 2000; Makino et al., 2008; Gulden et al., 2010; Kaczara et al., 2010; Panieri et al., 2013). Un decaimiento exponencial es consistente con los resultados para otros tipos de células (Gulden et al., 2010; Hohnholt y Dringen, 2014) y con lo reportado por Kaczara, et al., 2010 en cultivo de ARPE-19. La cinética de reacción indica una reacción de primer orden con dependencia sobre la concentración de sustrato, lo

que significa que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es mantenido cuando la concentración del agente oxidante es liberado como pulso.

Hohnholt y Dringen, 2014 en ensayos con cultivos de neuronas reportó que la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incubado en concentraciones hasta  $100 \mu\text{M}$  tuvieron tiempos medios de depleción de 7.8, 10.9 y 14.5 min en función de la concentración del peróxido (30, 60 y  $100 \mu\text{M}$  respectivamente).

La disminución del  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado al cultivo en forma de pulso en presencia de células ARPE-19 comparado a su ausencia depende del gradiente establecido a través de la membrana celular. Varios factores determinan la disponibilidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio a través del tiempo: la concentración extracelular del oxidante, la permeabilidad de la membrana al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la cantidad y disponibilidad de enzimas que descomponen el peróxido de hidrógeno, entre las que se incluyen la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Liu y Gaston, 2010).

La adición exógena del  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene un corto tiempo de vida media debido a su rápida degradación por catalasa y peroxidasas celulares y las aportadas por el suero enriquecido al medio. Aunque estudios basados en pulsos son usualmente llevado a cabo con concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de micromolar o milimolar para provocar una respuesta celular. Esto es en contraste con las muy bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  encontradas en condiciones pato-fisiológicas in vivo donde concentraciones exógenas raramente exceden el bajo rango micromolar (Sobotta et al., 2013). No está claro que extensión del tratamiento en pulso puede mimetizar situaciones fisiológicamente relevantes. La adición exógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser considerada una vía razonable de aproximación a eventos fisiológicos si cuestiones de cinéticas y dependencia de la concentración es tomado en cuenta.

Gulden et al., 2010 en células de astroglioma de rata (C6) reportaron que el tiempo medio de eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuyó de 26 a 7 min con el incremento de la concentración celular. Por lo que incrementando la concentración celular se acelera la eliminación del peróxido.



### VIII.1.6. Citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pulso por MTT

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula pequeña, sin carga que fácilmente atraviesa las membranas celulares y se localiza en múltiples compartimentos sub-celulares. La reactividad química es relativamente baja, pero su exposición a metales de transición descompone el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al radical OH muy reactivo (Hartwig, 2013) el cual se presume sea el responsable de la citotoxicidad del peróxido de hidrógeno.

El tiempo de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es equivalente al tiempo de exposición cuando el oxidante se libera como adición simple. Las mediciones de degradación revelan que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se elimina rápidamente, obviamente, la muerte celular no es de inmediato y la ventana entre la exposición inicial y la muerte celular es relevante porque es en este paso que el antioxidante podría funcionar para aumentar la cantidad de células supervivientes. Cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se entrega o genera fuera de las células, se establece un gradiente a través de la membrana celular que depende no sólo de la concentración extracelular del oxidante, sino también de la permeabilidad de la membrana al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de la cantidad y disponibilidad de enzimas que descomponen al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Antunes y Cadenas, 2000;. Makino et al., 2008;. Panieri et al., 2013). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido encontrado distribuido en diferentes compartimentos subcelulares, es decir, el citosol, la mitocondria y el núcleo (Panieri et al., 2013).

Diferencias en la sensibilidad de las células al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son debido al tipo de célula en particular, a los tiempos de incubación y puede estar influenciado además por las condiciones de los medios cultivos. Gulden et al., 2010 reveló que la potencia citotóxica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la células de astroglioma (C6) aumentó aproximadamente 17 veces al prolongar el tiempo de incubación, por otra parte la desprivatización del suero en el medio reduce fuertemente o incluso detiene el crecimiento de células C6. Además el reportó que el efecto tóxico del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está en función de los µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/cel. Antunes y Cadenas, 2000 observaron que las células Jurkat necesitan 12 h después de una 1 h de exposición a una concentración de estado estacionario de 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para desarrollar la máxima citotoxicidad. De igual manera, Kaczara et al., 2010 observó que células ARPE-19 necesitaron de 24 h para desarrollar un efecto citotóxico con una concentración efectiva media de 300 µM a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio sus células crecieron en un medio esencial mínimo (MEM).

Zhang et al., 2014 reportaron que 300  $\mu\text{M}$  indujo aproximadamente un 50% de pérdida en la viabilidad celular a las 24 h, aunque en esta investigación sometieron a las células a una desprivatización del suero al 1% durante toda la noche previo al ensayo en un medio de mezcla DMEM/F-12. Similar resultado fue reportado por Yu et al., 2013 en células epiteliales de lente humano que fueron sometidas a crecimientos en MEM libre de suero en el momento de la exposición con el peróxido. Como se discutió en la Figura 4 y 5 la velocidad de eliminación del peróxido en medio con suero es mayor que ausencia de este, dado por su mayor valor de  $k$  y su menor  $t_{1/2}$ . Este comportamiento está relacionado con la capacidad que tiene la albúmina de suero y el piruvato como secuestradores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo que se traduce en un mayor requerimiento de la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para lograr el efecto tóxico. Por otro lado la alta sensibilidad de las células a la oxidación producida por la apoptosis inducida por la desprivatización del suero, propio de la carencia de los antioxidantes séricos han sido reportado por Kwok et al., 2010; Su et al., 2012; Zhang et al., 2014.

Resultados ligeramente diferentes fueron reportados por Kim et al., 2003 sobre la misma línea celular. Concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 100 y 300  $\mu\text{M}$  no presentaron cambios apoptóticos utilizando el ensayo de kit detección de apoptosis (ISEL), sin embargo una concentración de 500  $\mu\text{M}$  provocó una condensación y marginalización de la cromatina con cambios apoptóticos. A una concentración de 600  $\mu\text{M}$  un mayor número de células mostraron signos de apoptosis y concentraciones superiores a esta aparecieron células necróticas identificadas por la presencia de orgánulos inflamados y ruptura de membrana.

En la línea celular humana de leucemia de células-T (Jurkat J16) y la línea celular resistente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HJ16) una concentración moderada de 0.5 mM disminuyó dramáticamente el porcentaje de células vivas (evaluado por citometría de flujo) a las 24 h. Sin embargo, en su policlonal HJ16 el mismo tratamiento no afectó la proliferación celular. Una concentración de 3 mM presentó un 70% de células viva en la policlonal HJ16, mientras en la Jurkat J16 un 0.37% de células vivas estuvieron presentes (Qenaei et al., 2014).

La concentración de peróxido de hidrógeno es de significancia debido a que los efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$  son dependientes de la concentración y varían desde señalizaciones fisiológicas hasta la muerte celular (Kim et al., 2003; Kaczara et al., 2010; Kwok et al., 2010; Sobotta, 2013; Andrade et al., 2013; Zhang et al., 2014). Mientras niveles

nanomolares de peróxido de hidrógeno es un estimulante del crecimiento y proliferación celular, a concentración micromolar causa transitorias paradas del crecimiento e induce a alteraciones en la expresión de genes que conlleva a adaptaciones protectoras (Pickering et al., 2013). A niveles milimolar es un oxidante tóxico que causa un significativo estrés oxidativo. Moderadas concentraciones de  $H_2O_2$  (400-600  $\mu M$ ) pueden producir apoptosis mientras que altas dosis (superior a 600  $\mu M$ ) preferencialmente inducen necrosis (Kim, 2003; Gulden et al., 2010; Pickering et al., 2013). El ADN es especialmente sensible al  $H_2O_2$  como daño oxidativo provoca la ruptura de simples y dobles cadenas (Barbouti et al., 2002; Ott et al., 2007; Zhang et al., 2014). La extensión del daño al ADN induce muerte celular.

Los ojos están en riesgo particular de daño oxidativo debido a su alta exposición al oxígeno, una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en la retina y una alta exposición a la luz, los contaminantes ambientales y a los rayos ultravioletas (Wu et al., 2006; Kaczara et al., 2010; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2014). El epitelio pigmentario de retina (EPR) está en alto riesgo de estrés oxidativo porque reside en un ambiente de alta tensión de oxígeno y se expone a la luz azul fototóxica (Wu et al., 2006). En el EPR, el  $H_2O_2$  se produce además durante la fagocitosis diaria de los segmentos externos de los fotorreceptores y se genera como consecuencia de la irradiación de la luz al pigmento melanina afectando directamente el epitelio pigmentario retiniano (Korytowski et al., 1987; Kaczara et al., 2010; Miranda et al., 2010; Zhang et al., 2014). El EPR es también una fuente importante de citocinas que regulan la respuesta inflamatoria en la retina (Bian et al., 2012).

El estrés oxidativo en la capa celular del EPR con el tiempo produce disfunción del tejido que contribuyen al desarrollo de la patogénesis de muchas enfermedades del aparato visual, como la degeneración macular relacionada con la edad (DMA), retinopatía diabética y degeneraciones hereditarias de la retina (Gaspar et al., 2013; Zhang et al., 2014; Cano et al., 2014). El  $H_2O_2$  es el oxidante principal involucrado en la formación de cataratas. El nivel de  $H_2O_2$  en el humor acuoso en los ojos normales humanos está en el rango de 14-31  $\mu M$ . Sin embargo, en condiciones patológicas como la existente en los ojos con cataratas, el nivel de  $H_2O_2$  en el humor acuoso difiere entre 33 a 324  $\mu M$ , con una media de 189  $\mu M$  (Spector, 1998).

## **VIII.2. Evaluación Cinética y Tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un Modelo de Generación Enzimática Continua con Glucosa Oxidasa (GOx)**

### **VIII.2.1. Comportamiento de la GOx en el medio en ausencia y presencia de células ARPE-19**

Debido a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es lábil en un medio de cultivo, la exposición sostenida a una concentración dada es difícil de lograr cuando el agente es deliberado en un simple pulso. Un método alternativo para sostener los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cultivo es una generación continua del producto desde la glucosa del medio usando glucosa oxidasa (GOx). Este enfoque está siendo usado para tratamientos de cortos tiempos en cultivos celulares, incluyendo lo reportado por Zhang et al., 2008; Sobotta et al., 2013; González-Ramos et al., 2013; Kaczara et al., 2010 en cultivo de ARPE-19. La oxidación de la glucosa del medio en presencia de GOx genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y D-glucono- $\delta$ -lactona.

Kaczara et al., 2010 reportaron concentraciones de peróxido producido por la GOx en similar rango de actividades ligeramente mayores que las obtenidas en nuestras condiciones de experimentación. Este resultado puede estar dado por la influencia que puede ejercer el medio y la suplementación de aditivos en la degradación del oxidante en nuestras condiciones. Similares resultados en la conducta de producción del peróxido por la enzima en ausencia o presencia del cultivo celular fueron obtenidos comparado a lo reportado por Kaczara et al., 2010.

González-Ramos et al., 2013 reportaron que la adición de 2 mU/mL de GOx en un cultivo primario de células mesangial humana (HMC) produjo un incremento del peróxido de hidrógeno casi estacionario en 24 h. Similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio en concentraciones de 3 y 5 mU/mL de enzima.

## VIII.2.2. Citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzimático por MTT

La disminución en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se discutió anteriormente (Fig. 10B) puede ocurrir como una consecuencia de la ruptura de membrana causado por la oxidación de los lípidos de membrana. Este fenómeno ocasiona la salida del contenido celular que produce una aceleración en la depleción del peróxido, probablemente relacionadas con las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y catalasa. Claramente, la dinámica de exposición del oxidante a las células difiere bajo estas dos condiciones. Cuando el oxidante es entregado como pulso, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es agotado con bastante rapidez (Fig. 5). Mientras que las células tratadas con GOx fueron expuestas a más sostenida moderada concentración durante todo el tiempo de incubación.

Una prolongación en el tiempo de incubación hasta las 48 h incrementa la actividad citotóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado enzimáticamente. El valor de IC<sub>50</sub> derivado de la relación de concentración-proliferación disminuyó a la mitad alcanzando un valor de 228.56 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una sostenida liberación del peróxido por la GOx durante un mayor tiempo de incubación agota la capacidad de las células a contrarrestar el efecto oxidativo, haciéndola más vulnerable al efecto tóxico. Comparando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que produce citotoxicidad en el cultivo de ARPE-19 después de adicionado como pulso contra la generación continua concluimos que las células del epitelio pigmentario de retina pueden tolerar alta concentración en un corto tiempo de exposición necesitando de una elevada concentración en un solo pulso para producir la citotoxicidad comparado a una menor concentración necesaria en una situación crónica sostenida.

Pickering et al., 2013 reportó que las células embrionarias de fibroblastos murino (MEF) crónicamente expuestas a una continua producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por GOx aumentó la respuesta adaptativa a bajas velocidades de generación, pero pierde casi completamente la adaptación al estrés a altas cantidades de producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cortos tiempos de supervivencia son negativamente influenciados a la adaptación al estrés oxidativo crónico.

González-Ramos et al., 2013 encontraron que el efecto de la GOx sobre la habilidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para estimular la síntesis del factor de crecimiento transformante tipo β (TGF-β1) en células HMC es prevenido por la pre-incubación con catalasa. El TGF-β1 es uno de

las principales citocinas involucradas en enfermedades cardiovascular, hepática, pulmonar o renal crónica.

Existen varias razones por lo cual GOx es una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segura para la aplicación en los cultivos celulares, a diferencia a otras oxidasas como la xantina oxidasa, (a) glucosa oxidasa exclusivamente convierte el oxígeno a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación estequiometrica simple (1:1), (b) GOx genera continuamente bajos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente (ninguna otra EROs) de su sustrato glucosa, (c) su producto D-glucunolactona es metabólicamente inerte, (d) GOx funciona bien a pH fisiológico de 7.4, (e) presenta una alta especificidad por su sustrato, (f) es estable y permanece activa completamente activa por encima de 24 h a 37°C, y (g) GOx no interfiere con la expresión de enzimas endógenas porque ella no existe en células de mamíferos (Gonzalez-Ramos et al., 2013).

### **VIII.3. Evaluación del Glutati6n Reducido (GSH), Enzimas Antioxidantes: Catalasa y Glutati6n Peroxidasa y Poder Reductor (FRAP)**

#### **VIII.3.1. GSH**

El GSH un tripéptido que contiene un grupo tiol, es el principal antioxidante intracelular y es adem6s el principal sustrato de peroxidasas en la reducci6n de hidroper6xidos. El grupo sulfhidrilo (SH) sirve como un donador de electrones y reacciona con EROs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH, O<sub>2</sub>.) en el mantenimiento de un entorno celular reductor. La disminuci6n del contenido de GSH est6 muy íntimamente relacionado con la susceptibilidad celular al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se discuti6 anteriormente (Fig. 7 y Fig. 11) la concentraci6n de 1600 µM empleada como pulso result6 en una elevada citotoxicidad, lo cual se corresponde con una menor concentraci6n de GSH. De igual forma una actividad de GOx (50 mU/mL) present6 un 80% de muerte celular alcanzando una depleci6n del 50% del contenido del glutati6n reducido. De ah6 la gran importancia de mantener altos los niveles de glutati6n reducido para preservar la supervivencia celular.

El parámetro clave de la supervivencia celular durante un tratamiento moderado con  $H_2O_2$  es mantener la concentración mínima de GSH. Esta concentración es esencial para proteger el núcleo contra el daño oxidativo y preservar la función nuclear. Una concentración alta de GSH ( $> 1mM$ ) preserva todas las funciones celulares de la inhibición oxidativa. Como resultado las enzimas de la maquinaria de detoxificación son inducidas y el  $H_2O_2$  intracelular es rápidamente degradado. A concentración menor ( $\approx 0.1 mM$ ), el glutatión reducido pierde su efecto protector citosólico, pero aún queda suficiente para la protección del núcleo contra el daño oxidativo. A pesar de la inducción transcripcional de genes de respuesta al estrés, la maquinaria de detoxificación se mantiene a bajo nivel debido a la inhibición translacional. Por lo tanto, el  $H_2O_2$  es lentamente degradado y las proteínas oxidadas se acumulan en el citosol. A pesar del aumento del estrés, la función nuclear puede soportar la reanudación del crecimiento. En concentraciones menores de  $0.03 mM$  los componentes nuclear y citosólico son altamente sensibles al daño oxidativo conduciendo a la muerte celular.

Las células ARPE-19 presentaron una capacidad mayor en la retención de la disminución del contenido celular de GSH comparado a la línea celular humana leucemia células-T (Jurkat J16). En esta línea celular una concentración superior de  $0.1 mM$  disminuyó casi completamente el contenido intracelular del glutatión, mientras que en su línea clonada resistente al peróxido esta disminución solo alcanzó la mitad (Qenaei et al., 2014). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuando el tratamiento de  $H_2O_2$  fue aplicado en 8 generaciones de cepas mantenida a en depleción de GSH un incremento significativo en la frecuencia de mutación fue observado. Este resultado mostró que la estabilidad nuclear del ADN es fuertemente afectada por el tratamiento del  $H_2O_2$  bajo muy pequeñas concentraciones de GSH (Hatem et al., 2014).

En cultivos de neuronas sometidos a concentraciones de  $H_2O_2$  hasta  $100 \mu M$  una sostenida exportación del GSH indujo a una pérdida del glutatión reducido intracelular que contribuyó a la vulnerabilidad celular en condiciones de incremento del estrés oxidativo (Hohnholt and Dringen, 2014). Por otra parte, se reportó que una reducida cantidad de GSH parece ser suficiente para el ciclaje redox del GSH y el mantenimiento de la viabilidad celular en ausencia de estresores adicionales (oxidantes).

### VIII.3.2. CAT y GPx

Kwok et al., 2010 reportaron que 0.35 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> marcadamente disminuye la actividad de GPx, pero no de GR en células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVECs). Similar a nuestros resultados se encontró que el ginsenosido protopanaxatriol (PPT-componentes químico del Ginseng) puede modular los niveles del glutatión afectando principalmente la actividad de la glutatión reductasa, mientras que un breve incremento de la GPx fue observado. Por otro lado, Qenaie et al., 2014 no encontraron correlación entre la actividad enzimática de la catalasa y la resistencia de las células al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células-T de leucemia mientras que indicó que la superior actividad de la GPx en células resistentes al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HJ16) puede desarrollar un rol importante en la resistencia al oxidante para este tipo de células.

### VIII.4. Efecto protector de *Bucida buceras* sobre el daño tóxico inducido por la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Similar a nuestros resultados el tratamiento con 8 mM, GSH incrementó la viabilidad celular en ≈ 15% después de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y redujo ≈ 75% de las mutaciones microsatélites oxidativas en células de cáncer colorrectal humano. Sin embargo N-acetilcisteína (NAC) a 10 mM no afectó la viabilidad celular en 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aunque NAC suprimió las mutaciones que inactivan al sistema reparador de desajustes del ADN (sistema MMR). Este sistema MMR mantiene la estabilidad genómica por corrección y deleciones/ inserciones que se producen con frecuencia en los microsatélites durante la replicación del ADN (Li et al., 2014). De otra manera el pre-tratamiento con ginsenosido protopanaxatriol (PPT-componentes químico del Ginseng) revirtió completamente el efecto tóxico inducido por 0.35 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HUVECs (Kwok et al., 2010).

Castro et al., 2012 encontraron, en las células Jurkat que la agregación disminuye la actina celular funcional, afectando principalmente la proliferación. El ataque oxidativo conduce primero a una oxidación ligera de las proteínas, causando un mal plegamiento en el estado nativo de las proteína; si el estrés persiste, la oxidación adicional tiene por objeto



los residuos hidrófobos que normalmente están en el interior de las proteínas y estas se convierten en gran medida en oxidadas, lo que favorece la formación de agregados de proteínas. La acumulación de proteínas oxidadas normalmente se degrada por el proteosoma, sin embargo este proceso puede verse afectado cuando la velocidad de formación de proteínas oxidadas excede la capacidad proteosomal o cuando la propia actividad del proteosoma ha disminuido. Los agregados formados interactúan con el proteosoma, inhibiendo su actividad, y conduciendo a una pérdida de funcionalidad, por ejemplo, la proliferación.

La progresión al estímulo de muerte celular por apoptosis o necrosis depende del daño mitocondrial y de los niveles de ATP. El tratamiento con  $H_2O_2$  puede significativamente incrementar la actividad. La presencia de ATP es esencial para la activación de apoptosis dependiente de proteasas y la subsecuente activación de caspasas que inducen la apoptosis. Es bien conocido que la caspasa-3 tiene un papel primordial en el desencadenamiento de la cascada de eventos que conducen a la apoptosis (Bai et al, 2011; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Similar a nuestro estudio, Zhang et al., 2014 encontraron que el extracto acuoso de la raíz de *Salvia miltiorrhiza* (ácido salvianólico A) inhibió la escisión de caspasa-3 inducida por el  $H_2O_2$  en células del EPR. El efecto cito-protector de la sal ácido salvianólico se debió además a la activación del factor de transcripción Nrf2 y su elemento de respuesta de genes antioxidante-dependiente (ARE).

Nuestros datos confirman que la caspasa-3 podría ser un objetivo parcialmente involucrado en la apoptosis inducida por el  $H_2O_2$  en el epitelio pigmentario de la retina. Por otro lado, la baja correlación entre actividad de caspasa-3 y el nivel de muerte de las células indica que las concentraciones de  $H_2O_2$  influyen en el modo de muerte celular, por ejemplo, apoptosis frente a necrosis. Las concentraciones más altas de  $H_2O_2$  inducen una toxicidad grave, con una muerte celular del 90%, lo que sugiere que en bajo estas condiciones experimentales necrosis fue el modo predominante de muerte celular.

Yu et al., 2013 encontraron que el daño celular inducido por 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  en células humanas epiteliales de lentes (HLE B3) estuvo mediado principalmente por apoptosis dependiente de caspasa. Estas células se cultivaron en MEM privatizado de suero antes de la exposición a una adición de  $H_2O_2$ .

Los cambios en el ciclo celular causados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eventualmente conducen a la apoptosis debido a un incremento en la fase sub-G1 y una parada en el incremento de la fase G2/M. Cuando las células HT-22 fueron tratadas con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 h, se reportó una disminución en la fase G1 y un aumento en la G2/M. La cantidad de Bax (proteínas antiapoptóticas) disminuyó gradualmente, mientras que Bcl-2 (proteínas proapoptóticas) aumentó gradualmente (Kim et al., 2014).

El estrés oxidativo inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de inducir la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis; un moderado estrés oxidativo causa apoptosis mientras que un severo estrés oxidativo provoca necrosis (Eno et al., 2013). El grado de estrés oxidativo determina el nivel de daño a la membrana lisosomal. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interactúa con el hierro intralisosomal para generar radicales hidroxilo altamente reactivos que inician la peroxidación lipídica de las membranas lisosomas y la posterior permeabilización de la membrana.

La ruptura de la membrana de los lisosomas libera enzimas hidrolíticas (nucleasas, proteasas, fosfolipasas, lipasas, fosfatasas, sulfatasas, y glicosidasas) normalmente se encuentran en el interior de los lisosomas hacia el citosol, lo que activa a su vez la señalización apoptótica por hidrólisis de sus sustratos. Sin embargo, un daño severo a la membrana lisosomal conduce a una salida masiva de las enzimas lisosomales hacia el citosol, degradando componentes celulares indiscriminadamente, provocando la acidificación citoplasmática perjudicial, y en última instancia la inducción de la necrosis en lugar de la apoptosis (Berndt et al., 2010; Eno et al., 2013).

## IX. CONCLUSIONES

En ausencia de células ARPE-19 la degradación del  $H_2O_2$  sigue una cinética de primer orden con una mayor declinación en medio con suero. Sin embargo, en presencia de células ARPE-19 la concentración de  $H_2O_2$  disminuyó exponencialmente más rápido en medio con suero, alcanzando un tiempo de eliminación de 2 horas con una constante de velocidad mayor en este medio.

La adición de GOx al medio de cultivo en ausencia de células ARPE-19 durante 24 h produce una acumulación lineal de  $H_2O_2$  superior, dependiente de la concentración de la enzima, mientras que en presencia de células el perfil de acumulación difiere con la concentración de la enzima.

La concentración celular es un factor determinante en la eliminación del  $H_2O_2$ . A mayor concentración celular más rápido ocurre la depleción.

El efecto tóxico evaluado por MTT sobre el cultivo de ARPE-19 por inducción con adición de  $H_2O_2$  o GOx mostró una citotoxicidad dosis-dependiente y una dinámica diferente. Una concentración más alta del peróxido es tolerado por las células cuando es adicionado como pulso, mientras exhibe una susceptibilidad mayor a bajas dosis generadas continuamente.

El acortamiento del tiempo de contacto células/  $H_2O_2$  a 2 h en el sistema a pulso conlleva a un requerimiento de 10 veces mayor de concentración del oxidante.

*Bucida buceras* presentó un fuerte poder antioxidante dado por su inhibición del  $H_2O_2$ , alta capacidad de secuestro del radical DPPH, y un elevado poder reductor.

La concentración de proteínas disminuye en relación al aumento del nivel de peróxido y es directamente proporcional a la proliferación celular.

El estado redox celular evaluado por las variables (GSH, catalasa, glutatión peroxidasa y poder reductor) presentaron una disminución en los dos modelos de inducción del estrés oxidativo.

*Bucida buceras* presenta capacidad retino-protectora dado su potencial de disminuir la muerte celular y el efecto tóxico y al recuperar sistemas de defensa no-enzimático (GSH, eliminación del peróxido y poder reductor) y enzimáticos (catalasa y glutatión peroxidasa).

## **X. RECOMENDACIONES**

Someter al extracto de *Bucida buceras* a un fraccionamiento químico para aislar, purificar e identificar el o los metabolitos activos responsables de la actividad farmacológica.

Evaluar la protección del extracto sobre el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células ARPE-19 usando marcadores moleculares del daño oxidativo.

## XI. LITERATURA CITADA

- Alghadysan, A. 2011. Diabetic retinopathy. *Saudi Journal of Ophthalmology*. 25:2, 99-111.
- Andrade, S. S., A. C. Azevedo, I. C. G. Monasterio, G. Paredes, E.J. Goncalves, G.A. Bonetti, T.C. Albertoni, G. Schor, E. Barreto. 2013. 17  $\beta$ -Estradiol and steady-state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: antiapoptotic effect in endometrial cells from patients with endometriosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 60:63-72.
- Antunes, F., E. Cadenas. 2000. Estimation of gradient across biomembranes. *Federation of European Biochemical Societies. Lett.* 475:121-126.
- Aon, M. A., S. Cortassa, B. O'Rourke. 2010. Redox—optimized, ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:865-877.
- Back, M. 2009. Leukotriene signaling in atherosclerosis and ischemia. *Cardiovascular Drugs and Theraoy* 23:41-48.
- Bai, Y. P., C. P. Hu, Q. Yuan, J. Peng, R. Z. Shi, T. L. Yang, Z. H. Cao, Y. J. Li, G. Cheng, G. G. Zhang. 2011. Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 51; 1492-1500.
- Barbouti, A., P. T. Doulias, L. Nouis, M. Tenopoulou, D. Galaris. 2002. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radical Biology and Medicine*. 33:691-702.
- Bedard, K., K. H. Krause. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 87:245-313.
- Berlett, B. S., E. R. Stadtman. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 272:20313-20316.
- Berndt, C., T. Kurz, M. Selenius, A. P. Fernandes, M. R. Edgren, U. T. Brunk. 2010. Chelation of lysosomal iron protects against ionizing radiation. *Biochemical Journal*. 432:295-301.
- Bian Q., S. Gao, J. Zhou, J. Qin, A. Taylor, E. J. Johnso, G. Tang, J. R. Sparrow, F. Shang. 2012. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 53: 1298-1307.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Burdon, R.H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*. 18: 775-794.
- Burke, J.M., L.M. Hjelmeland. 2005. Tissue Mosaicism in the RPE. *Molecular Inventions*. vol. 54.
- Calderón, A., P. Torres. 2013. Effect of Hydroalcoholic extract of *Terminalia Catappal*. (Combretaceae) on free radicals induced in rat brain. *The Biologist*. 267-275
- Cardenas, E., K.J. Davies. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 222-230.

- Castro J. P., C. Ott, T. Jung, T. Grune, H. Almeida. 2012. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free radical Biology & Medicine* 53: 916-925.
- Cano, M., L. Wang, J. Wan, P.B. Bradley, K. Ebrahimi, J. Qian, T. Handa. 2014. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction and a protective unfolded protein response in RPE cells. *Free radical Biology & Medicine* 69; 1-14.
- Chance, B., H. Sies, A. Boveris. 1979 Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59; 527-60.
- Channon, K. M. 2004. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 14:323-327.
- Cheng H. Y., T.C. Lin, K.H. Yu, C.M. Yang, C.C. Lin. 2003. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Terminalia chebula*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26:1331–1335.
- Cheng, L.C., K.H. Su, Y. R. Kou, S.K. Shyue, L.C. Ching, Y.B. Yu, Y.L. Wu, C.C. Pan, T.S. Lee. 2011.  $\alpha$ -Lipoic acid ameliorates foam cell formation via liver X receptor  $\alpha$ -dependent upregulation of ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *Free Radical Biology and Medicine*. 50; 47-54.
- Cohen, G. 1994. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 738:8–14.
- Connolly, E.E., S. Beatty, J. Loughman, A.N. Howard, M.S. Louw, J.M. Nolan. 2011. Supplementation with all three macular carotenoids: response, stability, and safety. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 52:9207-9217.
- Coulidiati, T.H., H. Millongo-Koné, A. Lamien-Méda, C.E. Lamien, M. Lompo, M. Kiendrébéogo, S. Bakasso, M. Yougbaré-Ziébrou, J. Millogo-Rasolodimby, y O.G. Nacoulma. 2009. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Combretum niroense* Aubrév. Ex Keay (Combretaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12 (3): 264-269
- D'Autreaux , B., M.B. Toledano. 2007. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8:813-824.
- D'Souza, F. M., R.L. Sparks, H. Chen, P.J. Kadowitz, Jr.J.R. Jeter. 2003. Mechanism of eNOS gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*. 284: 191-199.
- Dedon, P. C. 2008. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chemical Research in Toxicology*. 21:206-219.
- de Moraes Lima, G. R., I.R. de Sales, M.R. Caldas Filho, N.Z. de Jesus, H. de Sousa Falcão, J.M. Barbosa-Filho, A.G. Cabral, A.L. Souto, J.F. Tavares, L.M. Batista. 2012. Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. *Molecules Journal*. 17 (8), 9142-9206.
- Desurmont, M. 1983. Carcinogenic effect of metals. *Semin Hop Paris*. 59:2097-2099.

- Dickinson, B.C., C.J. Chang. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*. 7:504-511.
- Dringen, R., B. Hammrecht. 1997. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Research*. 759:67-75.
- Dunn KC, A.E. Aotaki-Keen, F.R. Putkey, L.M. Hjelmeland. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*. 62(2):155-69.
- Edmondson, D. E., A. Mattevi, C. Binda, M. Li, F. Hubálek. 2004. Structure and mechanism of monoamide oxidase. *Current Medicinal chemistry*. 11:1983-1993.
- Eno, C.O., G. Zhao, A. Venkatanarayan, B. Wang, E.R. Flores, C. Li. 2013. Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress. *Free radical Biology and Medicine* 65; 26-37.
- Esterbauer, H. 1993. Citotoxicity and genotoxicity of lipid-peroxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57:779S-785S.
- Faraci, F. M. 2006. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *Journal of Applied Physiology*. 100:739-743.
- Feng, Q., X. Lu, D.L. Jones, J. Shen, J.M. Arnold. 2001. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* 104:700-704.
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*. 194:7-15.
- Forman, H. J., K.J.A. Davies, F. Ursini. 2014. How do nutritional antioxidant really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 66: 24-35.
- Forman, H. J., M. Torres. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 166: 4-8.
- Fong, D.S., L. Aiello, T.W. Gardner, G.L. King, G. Blankenship. 2004. Retinopathy in Diabetes. *Diabetes Care*. 27:1,83-S87.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press. Washington, DC.
- Freedman, J. E. 2008. Oxidative stress and platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 28:s11-16.
- Freeman, B. A., J.D. Crap. 1982. Biology and disease: free radicals and disease injury. Laboratory investigation. 47:412-426.
- Fonham E.T.H. 1994. Natural antioxidants in Human Health and Disease. 157-197. Frei, B. (Eds.) Academic Press, San Diego.

- Funk, C., X.S. Chen, E.N. Johnson, L. Zhao. 2002. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*. 68-69:303-312.
- Funk RH, K.G. Schmid. 2004. Characteristics features of optic nerve ganglion cells and approaches for neuroprotection. *Ophthalmologie*. 101(11):1062-70.
- Fyhrquist, P. 2007. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loefl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 149: 89-118.
- Gardner, A. M., F. Xu, C. Fady, F.J. Jacoby, D.C. Duffey, Y. Tu. Lichtenstein, A. 1997. Apoptotic us nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free radical Biology and Medicine* 22:73-83.
- Gaspar, J.M., A. Martins, R. Cruz, C.M. Rodrigues, A.F. Ambrosio, A.R. Santiago. 2013. Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience*. 253,3,380-388.
- Geering, B., H.U. Simon. 2011. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death and Differentiation*. 18: 1457-1469.
- Gil. A. 2010. Producción de radicales libres de oxígeno en los sistemas biológicos. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. *Tratado de nutrición* Vol. 1 459.
- Gil, L.; G. Martinez, I. González, A. Tarinas, A. Alvarez, R. Giuliani, R. Tápanes, J. Pérez, O.S. León. 2003. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients, *Pharmacological Research* 47(3): 217-224.
- Gonzalez-Ramos, M., S. de Frutos, M. Griera, A. Luengo, G. Olmos, D.P. Rodriguez, L. Calleros, M.P. Rodriguez. 2013. Integrin-linked kinase mediates the hydrogen peroxide-dependent transforming growth factor-B1 up-regulation. *Free radical Biology & Medicine* 61; 416-427.
- Gulden, M., A. Jess, J. Kammann, E. Masr, H. Seibert. 2010. Cytotoxic potency of in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine* 49; 1298-1305.
- Hafsi, H., P. Hainaut. 2011. Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in thr regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. *Antioxidants and Redox Signaling*. 15:1655-1667.
- Halliwell, B., J.M. Gutteridge. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hartley, D. P., D.J. Kroll. D.R. Petersen. 1997. Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde protein adducts. *Chemical Research in Toxicology*. 10:895-905.
- Hartwig A. 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis?. *Free Radical Biology and Medicine*. 55; 63-72.
- Hatem, E., V. Berthonaud, M. Dardalhon, G. Lagniel, P.B. Cornu, M.E. Huang, J. Labarre, S. Chedin. 2014. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 67; 103-114.



- Hohnholt M.C., R. Dringen. 2014. Short time exposure to hydrogen peroxide induces sustained glutathione export from cultured neurons. . Free radical Biology and Medicine. May; 70:33-44
- Iloki A.S.B., L.L.M. Lewis, C.E. Rivera, S.A. Gil, A.L. Acosta, C.C. Meza, J.L Rubio. 2013. Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Morinda citrifolia* L. (noni) grown in Mexico. African Journal of Biotechnology.1229: 4630-4639.
- Jaquet, V., L. Scapozza, R.A. Clark, K.H. Krause, J.D. Lamberth. 2009. Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. Antioxidants and Redox Signal. 11:2535-2552.
- Kaczara, P., T. Sarna, J.M. Burke. 2010. Dynamics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability to ARPE-19 culture in models of oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 48: 1064-1070.
- Kim, Y. H., A.H. Berry, D.S. Spencer, W.E. Stites. 2001. Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. Protein Engineering. 14:343-347.
- Kim, M-H., C. Jin, J.W. Yang, S.M. Chung, J.S. Yoo. 2003. Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death in a Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line, ARPE-19. Korean Journal of Ophthalmology. 17(1):19-28
- Klinke, A., C. Nussbaum, L. Kubala, K. Friedrichs, T.K. Rudolph. 2011. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. Blood. 117:1350-1358.
- Knowles, R. G., S. Moncada. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochemical Journal. 298:249-258.
- Kodama, M., M. Kaneko, M. Aida, F. Inoua, T. Nakajamat. 1999. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implications in human cancer. Anticancer Research. 17 (1A):433-7
- Kohen, R. I. Gati. 2000. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. Toxicology 148:149-157.
- Komeima, K., B.S. Rogers, L. Lu, P.A. Campochiaro. 2006. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. Proceedings of National Academy of Sciences. 103:11300-11305.
- Korytowski, W., B. Pilas, T. Sarna, B. Kalyanaraman. 1987. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. Photochemistry and Photobiology. 45:185-190.
- Kuhlencordt, P. J., S. Hotten, J. Schodel, S. Rutzel, K. Hu, J. Widder, A. Marx, P.L. Huang, G. Ertl. 2006. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 26:1539-1544.
- Kuiper, H.C., R.S. Bruno, M.G. Traber, J.F. Stevens. 2011. Vitamin C supplementation lowers urinary levels of 4-hydroperoxy-2-nonenal metabolites in humans. Free Radical Biology and Medicine. 50; 848-853.

- Kumar, S., and V. Kumar. 2006. Plants as natural antioxidant. *Natural Product Radiance*. 5:326-334
- Kwok, H.H., M.S.M. Yang, N.K. Mak, R.N. Shum, P.Y.K. Yue. 2010. The ginsenoside protopanaxatriol protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell injury and cell death by modulating intracellular redox status. *Free Radical Biology and Medicine*. 48:437-445.
- Lambeth, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. 4:181-189.
- Lane, D. J. R., A. Lawen. 2009. Ascorbate and plasma membrane electron transport-enzymes vs efflux. *Free Radical Biology and Medicine*. 47:485-495.
- Lassègue, B., K.K. Griending. 2010. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 30:653-661.
- Lebold, K. M and M.G. Traber. 2014. Interactions between  $\alpha$ -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 66: 13-19.
- Lee, J. C., Y.O. Son, P. Pratheeshkumar, X. Shi. 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 53:742-757.
- Leonarduzzi, G; P. Gamba, S. Gargiulo, F. Biasi, G. Pol. 2012. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 52:19-34.
- Lewis, L.L.M. S.B. Iloki, E.G. Rivera, A.A. Gil, A.L. Acosta, C.Y. Meza, J.L. Rubio. 2014. Nutritional and Phenolic composition of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit at different ripeness stages and seasonal patterns harvested in Nayarit, Mexico. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3(5) 421-429
- Li, B., F. Ahmed, P.S. Bernstein. 2010. Studies on the singlet oxygen scavenging mechanism of human macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 504:56-60.
- Li, I.C., C.Y. Chiu, C.L. Wu, Y. Chi, J. S.R. Jian, S.W. Wang, C.L. Chang. 2014. A dual-fluorescent reporter facilitates identification of thiol compounds that suppress microsatellite instability induced by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 69; 86-95.
- Li, Z., Y. Yahg, M. Ming, B. Liu. 2011. Mitochondrial, R.O.S. generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 414: 5-8.
- Liu, R. M., P.K. Gaston. 2010. Oxidative stress and glutathione in TGF- $\beta$ -mediated fibrogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 48:1-15.
- Maia, L., A. Vala, L. Mira. 2005. NADH oxidase activity of rat liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase-contribution for damage mechanisms. *Free Radical Research*. 39:979-986.
- Makino, N., T. Mise, J. Sagara. 2008. Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells: analysis based on a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:927-936.

- Marletta, M. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927-930.
- Martin, H. M., J.T. Hancock, V. Salisbury, R. Harrison. 2004. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and Immunity*. 72: 4933-4939.
- Maydata, A.G. 2007. Estrés oxidativo, alimentación y suplementación antioxidante en patología ocular: historia breve y visión futura. *Revista Cubana de Oftalmología*. vol.20
- Mazière, C., J.C. Mazière. 2009. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*. 46:127-137.
- Miranda, M., E. Arnal, A. Ahuja, R. Alvarez, R. López, P. Ekstrom, F. Romero. 2010. Antioxidants rescue photoreceptors in rd1 mice: Relationship with thiol metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 48:216-222.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulachev, F. Van Breusegem. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*. 16: 300-309.
- Moller, I.M., A. Rogowska-Wrzesinska, R.S. Rao. 2011. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics* 74:2228-2242.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Murphy, M. P., A. Holmngren, N.G. Larsson, B. Halliwell, C.J. Chang. 2011. The biological roles of reactive oxygen species . *Cell Metabolims*. 13:361-366.
- Nathan, C. 1995. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 82:873-876.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. 47:469-484.
- Niki, E., N. Noguchi. 2004. Dynamics of antioxidants of vitamin E. *Accounts of Chemical Research*. 37:45-51.
- Niki, E. 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*. 66:3-12.
- Nishino, T., K. Okamoto, B.T. Eger, E.F. Pai, T. Nishino. 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase-mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 275:3278-3289.
- Niture, S. K., R. Khatri, A.K. Jaiswal. 2014. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radical Biology and Medicine*. 66:36-44.
- Nystrom, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *European Molecular Biology Organization Journal*. 24:1311-1317.
- Okado-Matsumoto, A., I. Fridovich. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutase (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 276:38388-38393.

- Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12:913-922.
- Pan, J.S., M.Z. Hong, J.L. Ren. 2009. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World Journal Gastroenterology*. 15:1702-1709.
- Panieri, E., V. Gogvadze, E. Norberg, R. Venkatesh, S. Orrenius, B. Zhivotovsky. 2013. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radical Biology and Medicine* 57; 176-187.
- Peters, D., B. Bengtsson, A. Heijl. 2013. Lifetime Risk of Blindness in Open-Angle Glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*. 156,4:724-730.
- Pickering A. M., R.A. Linder, H. Zhang, H.J. Forman, K.J. Davies. 2012. *Nrf2 dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha$  $\beta$  regulator are required for adaptation to oxidative stress*. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 10021-10031.
- Pickering A. M., L. Vojtovich, J. Tower, K.J. Davies. 2013. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 55:109-118.
- Pierce, A., H. Mirzaei, F. Muller, E. De Waal, A.B. Taylor. 2008. GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Biology*. 382:1195-1210.
- Podrez, E. A., D. Schmitt, H.F. Hoff, S.L. Hazen. 1999. Myeloperoxidase generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 103: 1547-1560.
- Poli, G., R.J. Schur, W.G. Siems, G. Leonarduzzi. 2008. 4-hydroxynonenal: membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal Research Reviews*. 28: 569-631.
- Powis, G., W.R. Monfort. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure*. 30:421-455.
- Qenaie, A. A., A. Yiakouvaki, O. Reelfs, P. Santambrogio, S. Levi, N.D. Hall, R.M. Tyrrell, C. Pourzand. 2014. Role of intracellular labile iron, ferritin, and antioxidant defense in resistance of chronically adapted Jurkat T cell to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 68; 87-100.
- Quigley, H. A. 2011. Glaucoma. *The Lancet*. 377;9774, 1367-1377.
- Ray, P. D., B.W. Huang, Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 24:981-990.
- Rebillard, A., L.O. Lefevre, J. Gueritau, J. Cillard. 2013. Prostate cancer and physical activity: Adaptive response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 60:115-124.
- Rhee, S.G., Y.S. Bae, S.R. Lee, J. Kwon. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science Signaling*.
- Rice-Evans C. A., J.M. Miller, y G. Paganga. 1996. Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 933-956

- Saccà, S.C., A.M. Roszkowska, A. Izzotti. 2013. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutation Research*. 752(2):153-71.
- SanGiovanni. J.P., E.Y. Chew. 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina, *Progress in Retinal and Eye Research*. 24; 87–138.
- Sanchez-Gallego, J.I., A.R. López, J.L. Sardina, H.A. Hernández, Y.J. Sánchez, M. Llanillo. 2010. Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*.48:1444-1454.
- Sarsour, E. H., M.G. Kumar, L. Chaudhuri, A.L. Kalen, P.C. Goswami. 2009.Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11:2985-3011.
- Schneider, C., N.A. Porter, A.R. Brash. 2008. Routes to 4-hydroxynonenal: fundamental issues in the mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 283:15539-15543.
- Sedlak, J., R.H. Lindsay. 1969. Estimation of total protein bound and non sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*.25: 192-205.
- Shaeib F., J. Banerjee, D. Maitra, M.P. Diamond, H.M. Abu-Soud. 2013. Impact of hydrogen peroxide-driven Fenton reaction on mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*. 58:154-9.
- Sobotta, M. C., A.G. Barata, U. Schmidt, S. Mueller, G. Millonig, T.P. Dick. 2013. Exposing cells H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : A quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments. *Free Radical Biology and Medicine* 60; 325-335.
- Sparrow, J.R., M. Boulton. 2005. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Experimental Eye Research*. 80:595-606.
- Spector, A., W. Ma, R.R. Wang. 1998. The aqueous humor is capable of generating and degrading H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Investogative Ophthalmology amd Visual Scienc*.39:1188-1197.
- Stadtman, E. R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 40:1250-1258.
- Strauss, O. 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physioal Review* vol. 85, 845-854.
- Stone, J. R., S. Yang. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling Messenger. *Antioxidants and Redox Signaling* 8: 243-270.
- Sturrock, A., T.P. Huecksteadt, K. Norman, K. Sanders, T.M. Murphy, P. Chitano, K. Wilson, J.R. Hoidal, T.P. Kennedy. 2007. Nox 4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physioogy*. 292: 1543-1555.
- Styskal, J. L., H. Van, A. Richardson, A.B. Salmon. 2012. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?. *Free Radical Biology and Medicine*. 52:46-58.

- Su, J. D., J.H. Yen, S. Li, C.Y. Weng, M.H. Lin. 2012. 3, 4-Dimethylthiobutylamine induces phase II detoxification gene expression and modulates P13K/Akt signaling in PC12 cells. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 126-141.
- Subczynski, W. K., A. Wisniewska, J. Widomska. 2010. Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 504:61-66.
- Tamer, F. 2012. Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. [www.doctorslounge.com](http://www.doctorslounge.com/primary/articles/freeradicals/freeradicals11.htm). Submitted by Dr. Tamer Fouad, M.D., 2012. <http://www.doctorslounge.com/primary/articles/freeradicals/freeradicals11.htm>
- Tanito, M., A. Nishiyama, T. Tanaka, H. Masutani, H. Nakamura, J. Yodoi, A. Ohira. 2002. Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photo-oxidative damage. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43:2392-2400.
- Thomas, S. R., P.K. Witting, G.L.R. Drummond. 2008. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling* 10:1713-1765.
- Traber, M. G. Vitamin E In: Bowman, B. A., Russell, R. M. editors. 2006. *Present Knowledge in Nutrition*. 9<sup>th</sup> ed. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press. 211-219.
- Treberg, J. R., C.L. Quinlan, M.D. Brand. 2010. Hydrogen peroxide efflux from muscle mitochondria underestimates matrix superoxide production- a correction using glutathione depletion. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 277: 2766-2778.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39:44-84.
- Veal, E., A.M. Day, B.A. Morgan. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell* 26: 1-14.
- Vignais, P.V. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:1428-1459.
- Vlachodimitropoulou. E., R. Naftalin, P. Sharp. 2010. Quercetin is a substrate for the transmembrane oxidoreductase Dcytb. *Free Radical Biology and Medicine*. 48:1366-1369; 2010.
- Vurusane, B., G. Poli, H. Basaga. 2012. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 7-18.
- Wiese, A.G., R.E. Pacifici, K.J. Davies. 1995. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophys*. 318: 231-240.
- Wood, Z. A., R. Schroder, J. Robin Harris, L.B. Poole. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*. 28:32-40.

- Wu, L. L., C.C. Chiou, P.Y. Chang, J.T. Wu. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 339:1-9.
- Yoshida, Y., E. Niki, N. Noguchi. 2003. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*. 123:63-75.
- Yoshida, Y., E. Niki, N. Noguchi. 2003. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem. Phys. Lipids* 123:63-75.
- Yu, C.C., E.F. Nandrot, Y. Dun, S.C. Finnemann. 2012. Dietary antioxidants prevent age-related retinal pigment epithelium actin damage and blindness in mice lacking  $\alpha\beta 5$  integrin. *Free Radical Biology and Medicine* 52; 660-670.
- Yu, Y., K. Xing, R. Badama, C.A. Kuszynski, H. Wu. M.F. Lou. 2013. Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 57; 92-104.
- Zhang, R., Z. Shen, W.M. Nauseef, S.L. Hazen. 2002. Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrate for myeloperoxidase in plasma. *Blood* 99:1802-1810.
- Zhang, H., Y.Y. Liu, Q. Jiang, K.R. Li, Y.K. Zhao, C. Cao, J. Yao. 2014. Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 69; 219-228.
- Zhu, Y., S.H. Park, O. Ozden, H.S. Kim, H. Jiang, A. Vassilopoulos, D.R. Spitz, D. Gius. 2012. Exploring the electrostatic repulsion model in the role of Sirt3 in directing MnSOD acetylation status and enzymatic activity. *Free Radical Biology and Medicine*. 53:828-833.
- Zimniak, P. 2011. Relation of electrophilic stress to aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 51:1087-1105.