



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE *Bucida buceras* EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIANGIOGÉNICA EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE RETINA (ARPE-19).

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

DANIELA FERNÁNDEZ ANGULO

Hermosillo, Sonora, México

Diciembre de 2017

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

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Daniela Fernández Angulo

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE *Bucida buceras* EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIANGIOGÉNICA EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE RETINA (ARPE10).

T E S I S

que para obtener el grado:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

DANIELA FERNÁNDEZ ANGULO

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis intitulada "Efecto de la composición fitoquímica de *Bucida buceras* en la actividad antioxidante y anti-angiogénica en células del epitelio pigmentario de retina (ARPE-19)" presentada por Daniela Fernández Angulo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Biociencias con opción en Biociencias Moleculares.



Dr. Simon Bernard Iloki Assanga
Director



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Co-director y Presidenta



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Secretario y Sinodal interno



M.C. Lidianys María Lewis
Lujan Sinodal externo

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
I. INTRODUCCIÓN ANTECEDENTES	1
I.1 El globo ocular	1
I.1.1 Anatomía y fisiología	1
I.1.2 Retina y epitelio pigmentario de la retina	2
I.1.3 Estrés oxidativo y sistema antioxidante en la retina	5
I.1.4 Angiogénesis y angiogénesis ocular	7
I.1.4.1 Factores pro-angiogénicos o factores de crecimiento	10
I.1.4.2 Factores anti-angiogénicos	14
I.1.5 Patologías retinianas y tratamientos	15
I.1.5.1 Patologías retinianas	15
I.1.5.2 Tratamientos antioxidantes y antiangiogénicos	18
I.2 Modelos celulares en patologías asociadas al epitelio pigmentario de retina (EPR)	22
I.2.1 Fuentes de células del EPR	23
I.2.2 Propiedades de las líneas celulares y condiciones del cultivo	24
I.2.3 Ventajas y desventajas de los cultivos celulares	26
I.2.4 Propósitos del cultivo de células humanas del EPR	27
I.3 Métodos de inducción al reto oxidativo con H ₂ O ₂	28
I.3.1 Métodos de adición al medio o pulso	29
I.3.2 Métodos enzimáticos extracelulares de generación del H ₂ O ₂	30
I.3.3 Método endógeno de producción de H ₂ O ₂	32
I.4 Metabolismo en plantas	32
I.4.1 Terpenos	34
I.4.2 Alcaloides	34
I.4.3 Compuestos fenólicos	35
I.4.3.1 Flavonoides	37
I.4.3.2 Ácidos fenólicos	39
I.5 <i>Bucida buceras</i>	41
II. HIPÓTESIS	43
III. OBJETIVOS	44
III.1 General	44
III.2 Específicos	44
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	45
IV.1 Selección de la muestra y elaboración de extractos	45
IV.2 Determinación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos	45
IV.2.1 Fenoles totales	45

IV.2.2	Flavonoides método cloruro de aluminio (AlCl ₃)	46
IV.2.3	Flavonoides y flavonoles método 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP).	46
IV.2.4	Flavonoides totales	47
IV.3	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC	47
IV.3.1	Condiciones cromatográficas	47
IV.3.2	Preparación de estándares y curva de calibración	48
IV.3.3	Método de validación	49
IV.3.4	Métodos de extracción e hidrólisis	51
IV.3.4.1	Método de extracción e hidrólisis para flavonoides	51
IV.3.4.2	Método de extracción e hidrólisis para ácidos fenólicos.	51
IV.4	Evaluación de la actividad antioxidante	52
IV.4.1	Capacidad de secuestro del radical libre DPPH•	52
IV.4.2	Ensayo del poder reductor del hierro férrico (FRAP)	52
IV.5	Efecto retino protector de <i>Bucida buceras</i>	52
IV.5.1	Cultivo celular	52
IV.5.2	Diseño experimental para la inducción del estrés oxidativo	53
IV.5.2.1	Método de adición o pulso del H ₂ O ₂ al medio de cultivo.	53
IV.5.2.2	Método de generación enzimática continua exógena del H ₂ O ₂ por glucosa oxidasa (GOx)	53
IV.5.3	Inhibición del H ₂ O ₂ y viabilidad celular	54
IV.5.3.1	Ensayo de proliferación celular (MTT)	54
IV.5.3.2	Diseño experimental para evaluar la toxicidad del extracto de <i>Bucida buceras</i>	54
IV.5.3.3	Ensayo de inhibición del H ₂ O ₂	54
IV.5.3.4	Determinación de la proteína total por el método de Bradford	55
IV.5.4	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para determinar el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).	55
IV.6	Análisis estadístico	56
V.	RESULTADOS	57
V.1	Cuantificación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos	57
V.1.1	Cuantificación de fenoles totales	57
V.1.2	Cuantificación de flavonoides	58
V.1.2.1	Flavonoides (AlCl ₃) flavonas y flavonoles	59
V.1.2.2	Flavonoides (DNP) flavonas y flavonoles	61
V.1.2.3	Flavonoides totales	62
V.2	Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC	65
V.2.1	Validación del método cromatográfico para la identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos	65
V.2.2	Identificación y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos en las muestras de <i>Bucida buceras</i>	69
V.3	Evaluación de la actividad antioxidante de <i>Bucida buceras</i>	78
V.3.1	Capacidad de secuestro del radical libre DPPH•	78
V.3.2	Ensayo del poder reductor del hierro férrico (FRAP)	80
V.4	Capacidad retinoprotectora de <i>Bucida buceras</i>	82

V.4.1 Efecto retino-protector de <i>Bucida buceras</i> a la muerte celular inducida por el estrés oxidativo con H ₂ O ₂	83
V.4.2 Actividad moduladora de la angiogénesis por <i>Bucida buceras</i>	87
VI. DISCUSIONES	90
VI.1 Cuantificación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos	90
VI.1.1 Cuantificación de fenoles totales	90
VI.1.2 Flavonoides (AlCl ₃), flavonas/flavonoles (DNP), flavanonas/flavanoles y cuantificación fenólica por HPLC	92
VI.2. Evaluación de la actividad antioxidante: secuestro del radical libre DPPH• y poder reductor del hierro férrico (FRAP)	93
VI.3. Capacidad retinoprotectora de <i>Bucida buceras</i>	94
VI.4. Efecto modulador de la angiogénesis de <i>Bucida buceras</i>	95
VII. CONCLUSIONES	98
VIII. LITERATURA CITADA	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Anatomía del globo ocular	2
2	Capas de la retina y coroides	4
3	Representación de la hipótesis oxidativa	6
4	Etiología neovascular de la retina en la degeneración macular	9
5	Representación esquemática de la proteína dimérica VEGF y sus isoformas	12
6	Estimulo angiogénico con VEGF	13
7	Neovascularización patológica	16
8	Estructura química de subclases de flavonoides	38
9	Estructura química de subclases de ácidos fenólicos	40
10	Contenido de fenoles totales en la muestra de <i>Bucida buceras</i>	58
11	Contenido de flavonas y flavonoles en la muestra de <i>Bucida buceras</i>	60
12	Contenido de flavanonas y flavanoles en la muestra de <i>Bucida buceras</i>	62
13	Contenido de flavonoides totales en la muestra de <i>Bucida buceras</i>	64
14	Cromatograma de la mezcla de estándares y tiempos de elución. Flavonoides	70
15	Cromatograma de flavonoides en las muestras de <i>Bucida buceras</i> ..	71
16	Cromatograma de la mezcla de estándares y tiempos de elución. Ácidos fenólicos	72
17	Estructuras químicas de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos	73
18	Cromatograma de ácidos fenólicos en las muestras de <i>Bucida buceras</i>	74
19	Capacidad de secuestro del radical libre DPPH en <i>Bucida buceras</i> ..	80
20	Poder antioxidante evaluada por poder reductor en <i>Bucida buceras</i> ..	82
21	Efecto protector de <i>Bucida buceras</i>	85
22	Efecto de <i>Bucida buceras</i> sobre el daño a la proteína	86
23	Efecto de <i>Bucida buceras</i> sobre VEGF	89

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Características de fármacos anti-VEGF	21
2	Líneas celulares humana del epitelio pigmentario de retina (EPR) ...	24
3	Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica	35
4	Ordenamiento de las especies fenólicas, basado en la cantidad de átomos de carbono	36
5	Sistema de gradientes empleado en la identificación y cuantificación de flavonoides	48
6	Sistema de gradientes empleado en la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos	48
7	Estándares para la curva de flavonoides y su rango de concentración	49
8	Estándares para la curva de ácidos fenólicos y su rango de concentración	49
9	Concentraciones finales en mezcla de estándares	50
10	Límite de detección, rango de concentración, regresión lineal, coeficiente de determinación, tiempo de retención, precisión y exactitud para la cuantificación de flavonoides	66
11	Rango de concentración, regresión lineal, coeficiente de determinación, tiempo de retención, precisión y exactitud para la cuantificación de ácidos fenólicos	68
12	Contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en las muestras de <i>Bucida buceras</i>	76
13	Correlación de Pearson	79

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1 El globo ocular

El ojo o globo ocular es un órgano esférico ovoide con un diámetro de 24 mm y un peso aproximado de 7g. Como estructura visual es capaz de recibir, seleccionar y refractar los rayos luminosos que se transforman, a través de los fotorreceptores en impulsos nerviosos. Estos impulsos se transmiten a través del nervio y vías especializadas hasta el cerebro donde son integrados en forma de imágenes (Bekerman *et al.*, 2014).

I.1.1 Anatomía y fisiología

En los mamíferos, el globo ocular está recubierto por tres capas. Figura 1:

- La capa externa o fibrosa compuesta por la esclera y la córnea. La esclera es visible como la parte blanca del ojo. Es una cubierta de tejido conjuntivo que le aporta forma y resistencia al ojo. En la parte anterior del ojo, la esclera se continúa con la córnea, capa transparente que protege las estructuras situadas posteriormente y cuya superficie refracta la mayor parte de la luz incidente.
- La capa media o vascular, también llamada úvea está compuesta por tres estructuras principalmente: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides es una capa rica en melanina que evita que la luz penetre por la esclera impidiendo así la reflexión de la luz. Es una capa con abundantes vasos sanguíneos que aportan oxígeno y nutrientes a la retina, situada en la parte más interna. El cuerpo ciliar conecta la coroides y el iris y permite que el cristalino varíe su morfología para enfocar objetos a distintas distancias. El iris se localiza delante del cristalino y funciona como un diafragma contráctil controlando la entrada de luz a través de la apertura central, la pupila.
- La capa interna o nerviosa compuesta por la retina. En esta estructura nerviosa tiene lugar la fototransducción, mecanismo complejo por el cual la información recibida del exterior en forma de luz se transmite al cerebro a través del nervio óptico.

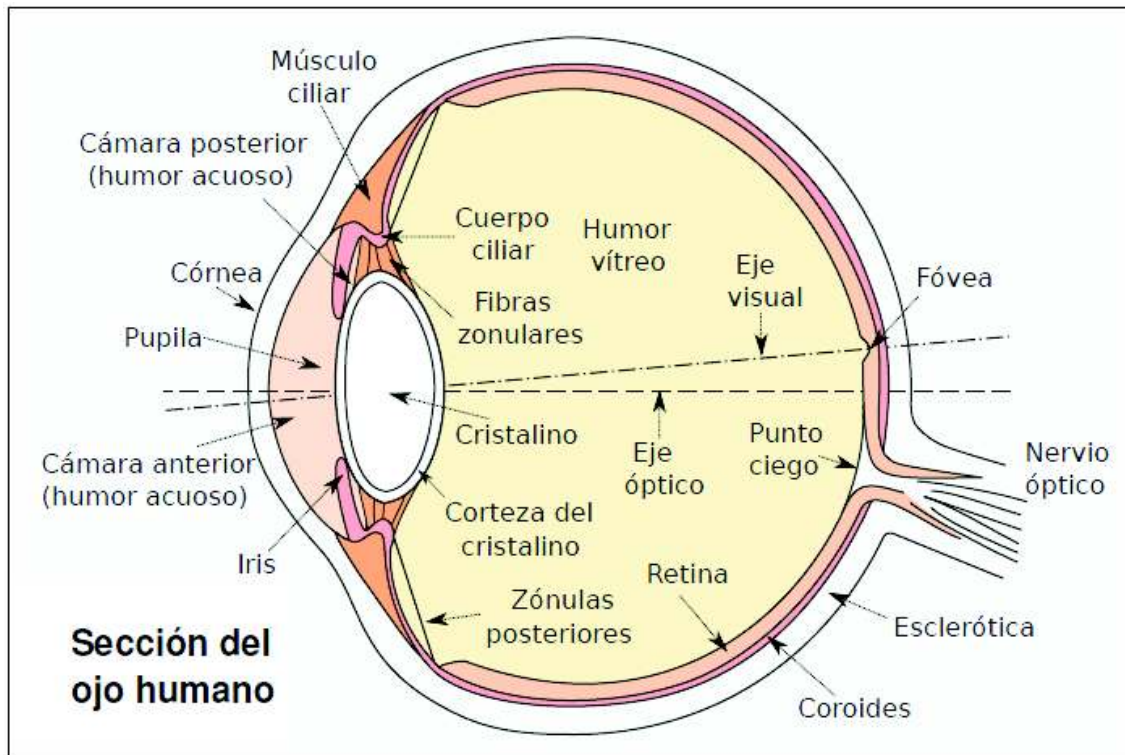


Figura 1. Anatomía del globo ocular. Corte en el que se muestran las estructuras macroscópicas del ojo humano. Fuente: Ricalde *et al.*, 2016.

I.1.2 Retina y epitelio pigmentario de la retina

La retina es una estructura sensible y compleja del aparato visual que recibe los estímulos luminosos y los transforma en estímulos nerviosos que son integrados e interpretados en el cerebro. Desde el punto de vista macroscópico se distinguen varias estructuras según se localicen en la parte central o periférica de la retina.

En el área central de la retina se encuentran el punto ciego, la mácula y la fóvea. Figura 1:

- El punto ciego o papila del nervio óptico es el lugar donde el nervio óptico se inserta en el globo ocular, atravesando la membrana esclerótica, la coroides y finalmente la retina. Es una zona no sensible a la luz donde no existen fotorreceptores.
- La mácula es una zona localizada en la zona posterior del globo ocular, con aspecto amarillento por su elevado contenido en pigmentos xantofílicos. Es la zona donde se produce la mayor fotorrecepción.

- La fovea es una zona deprimida y poco profunda en la mácula que posee mayoritariamente conos, que son células receptoras de los colores. En condiciones luminosas, es la zona de mayor nitidez visual.

El área periférica de la retina posee un bajo número de conos por lo que es menos sensible a la luz (menor capacidad de fotorrecepción) que el área central de la retina.

Microscópicamente, la retina está formada por distintos tipos celulares, básicamente neuronas que se distribuyen a lo largo de diez capas (Figura 2). Desde la parte más interna (en contacto con el humor vítreo) a la más externa (adyacente a la coroides) las capas que conforman la retina son: 1) Membrana limitante interna, no es una membrana propiamente dicha sino una lámina basal que separa las células de Muller; 2) capa de fibras nerviosas son axones de células ganglionares que se dirigen hacia el polo posterior integrando al nervio óptico; 3) capa de células ganglionares donde se localizan las células ganglionares y algunas células amacrinas que envían su mensaje eléctrico a la corteza occipital; 4) capa plexiforme interna, región de conexión sináptica entre células bipolares, amacrinas y ganglionares; 5) capa nuclear interna formada por los núcleos celulares de las células bipolares y por los núcleos de las células horizontales y amacrinas; 6) capa plexiforme externa, región de conexión sináptica entre células bipolares, fotorreceptores y horizontales; 7) capa nuclear externa formada por los núcleos celulares de las células fotorreceptoras; 8) membrana limitante externa, no es realmente una membrana, sino uniones intercelulares del tipo zónula adherente entre las células fotorreceptoras y las células de Muller; 9) segmento externo o capa de las células fotorreceptoras donde se encuentran los conos y bastones; 10) epitelio pigmentario retiniano (EPR) capa más externa localizada en la parte posterior de la coroides. Posee células pigmentarias que no son neuronas (Lillo, 2000).

Las principales funciones del EPR son las siguientes: 1) Transporte de nutrientes, iones y agua. El EPR transporta iones, agua, y productos metabólicos finales del espacio subretiniano hacia la sangre y de forma inversa, toma nutrientes tales como la glucosa, el retinol y los ácidos grasos de la sangre y los entrega a los fotorreceptores; 2) Por ser pigmentado absorbe la luz y protege contra la fotooxidación, 3) Reciclaje del retinal, esencial para el ciclo visual. Para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, el retinal está constantemente transportado desde los fotorreceptores al EPR, donde se re-isomeriza a 11 cis-retinal y es transportado de

vuelta a los fotorreceptores; 4) Fagocitosis de los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales son digeridos y sustancias esenciales como el retinal son reciclados y devueltos a los fotorreceptores para la reconstrucción de los segmentos externos sensibles a la luz y 5) Secreción de varios factores esenciales para la integridad estructural de la retina. Aparte de estas funciones, el EPR estabiliza la concentración de iones en el espacio subretiniano, lo cual es crucial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores (Acharya *et al.*, 1998). El EPR está involucrado también en el privilegio inmune del ojo a través de la secreción de factores inmunosupresores en el interior de dicha estructura (Acharya *et al.*, 1998). Así, resulta claro que el EPR es esencial para la función visual, y que alteraciones en cualquiera de sus funciones pueden conducir a la degeneración de la retina y en la disminución de la agudeza visual, pudiendo inclusive llegar a la ceguera.

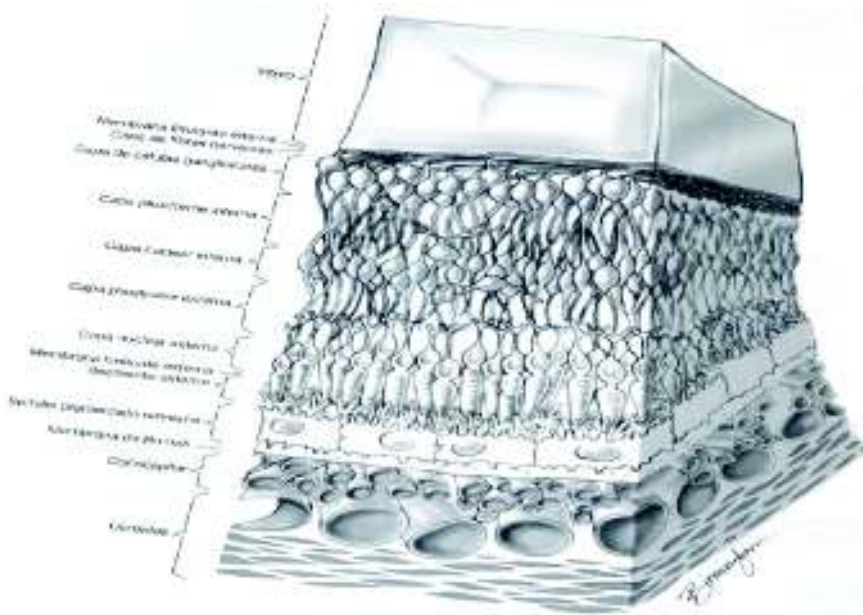


Figura 2. Capas de la retina y coroides. Fuente Pulido (2003).

Las capas de la retina se encuentran unidas a la coroides por la membrana de Bruch. Esta membrana es la capa más interna de la coroides. Su estructura es pentalaminar, acelular, fácilmente delimitable entre la retina y la coroides. A través de la membrana de Bruch, el epitelio pigmentario retiniano (EPR) permite el intercambio entre la coroides y la retina tanto de

nutrientes como la eliminación de desechos metabólicos de los fotorreceptores (Thebault, 2011; Graue, 2016).

Es una barrera fisiológica al filtrado de agua, electrolitos y macromoléculas que permite mantener seco el espacio subretiniano. Constituye una sola capa de células hexagonales en contacto con los fotorreceptores (conos y bastones). Contiene dos tipos de pigmentos: melanina y lipofuscina. Estos pigmentos permiten que funcione como barrera óptica. El grado de pigmentación del EPR y de la coroides es una característica individual genéticamente determinada y puede alterarse por diversos factores degenerativos, inflamatorios entre otros (Oyster, 1999).

La adhesión entre EPR y la retina neurosensorial es más débil que la adhesión entre EPR y la membrana de Bruch. En los desprendimientos de retina se produce una separación entre EPR y la retina neurosensorial, acumulándose líquido entre las dos capas, líquido que mantiene y perpetúa el desprendimiento. De un modo similar, la separación entre el EPR y la membrana de Bruch se conoce como despegamiento o desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (Pardo, 2011).

I.1.3 Estrés oxidativo y sistema antioxidante en la retina

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y de nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS) y los sistemas antioxidantes existentes en las células (Betteridge, 2000). Estas especies reactivas son una parte esencial de la inmunidad innata que protege a las células de las infecciones pero también contribuyen a la patogénesis de enfermedades degenerativas. Las ROS son moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno cuyos principales miembros son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Las RNS son un grupo de moléculas químicamente reactivas derivadas del óxido nítrico (NO) cuyos principales miembros son los peroxinitritos ($ONOO^-$), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y los S-nitrosotioles (Dhawan *et al.*, 2014, Hartwig, 2013).

El estrés oxidativo desencadena múltiples vías de señalización, incluyendo algunas que son citoprotectoras y otras que contribuyen al daño celular y finalmente, a la muerte celular

(Malgorzata *et al.*, 2016). En el EPR y la retina, el estrés oxidativo, incrementado por varios factores incluyendo la exposición a la luz o la presencia de especies reactivas de oxígeno, desplazan el balance de la expresión de la proteína de la familia Bcl-2 hacia aquellos que favorecen el daño celular (pro-apoptóticas). Las lesiones mediadas por el estrés oxidativo y la muerte celular del EPR pueden desencadenar a su vez la muerte de fotorreceptores y afectar la visión. El estrés oxidativo que conduce a la apoptosis de las células EPR es clave en la fisiopatología de muchas degeneraciones retinianas, como las degeneraciones maculares relacionadas con la edad (Manresa, 2015) (Figura 3).

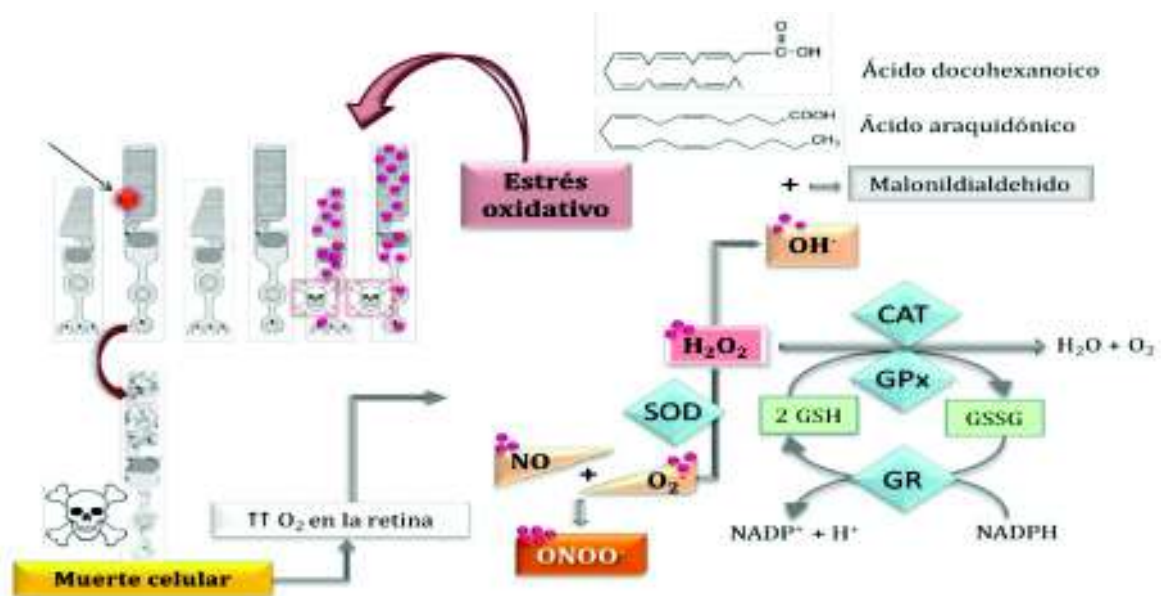


Figura 3. Representación de la hipótesis oxidativa. Tras la muerte de los bastones por el estrés oxidativo, el oxígeno en la retina aumenta provocando una acumulación de radicales libres que el sistema antioxidante no sería capaz de neutralizar, provocando así mayor muerte de células de la retina (Martínez, 2015).

En condiciones fisiológicas, la retina es especialmente sensible al estrés oxidativo ya que las membranas de sus células son muy ricas en lípidos poliinsaturados (riesgo de peroxidación lipídica) y está expuesta a agentes pro-oxidantes (exposición a la luz o a elevadas concentraciones de oxígeno) (De La Paz y Anderson, 1992; Glickman y Lam, 1992). Por ello dispone de sustancias antioxidantes como los pigmentos visuales o las vitaminas C y E que

contrarrestan estos efectos nocivos (Garland, 1991; Stoyanovsky *et al.*, 1995; Rozanowska *et al.*, 2012). Los pigmentos visuales actúan como filtros capaces de absorber la radiación de elevada energía como la melanina presente en los melanosomas de las células del epitelio pigmentario (Tokarz *et al.*, 2013), o los carotenoides abundantes en los fotorreceptores como la luteína, predominante en la retina periférica, y la zeaxantina, concentrada en la mácula (Widomska y Subczynski, 2014).

En humor acuoso hay elevados niveles de ácido ascórbico o vitamina C (1 mM) y de glutatión (GSH) (2 μ M) (Umapathy *et al.*, 2013) que protegen al ojo del daño oxidativo, neutralizando los radicales libres y las ROS (Ringvold, 1996). La carencia de ácido ascórbico en el organismo puede producir o acentuar la aparición de cataratas y degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Filas *et al.*, 2013). El tocoferol o vitamina E está presente en los segmentos externos de los fotorreceptores donde ayuda a prevenir la peroxidación lipídica. Las vitaminas C y E bloquean los radicales libres y la oxidación y degradación de la zeaxantina (Rozanowska *et al.*, 2012).

Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión: la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR). La SOD cataliza la conversión de O_2^- en H_2O_2 . Según su localización subcelular y los metales del centro activo se distinguen tres tipos de SOD: la Cu/Zn-SOD citoplásmica (SOD1), la Mn-SOD mitocondrial (SOD2) y la Cu/Zn-SOD extracelular (SOD3) (Usuim *et al.*, 2009). La CAT es una proteína tetramérica que convierte el H_2O_2 en agua y oxígeno. La GPX cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) mientras que la GR cataliza la conversión de GSSG a GSH, ayudando ambas al mantenimiento de los niveles de glutatión (Umapathy *et al.*, 2013).

I.1.4 Angiogénesis y angiogénesis ocular

La angiogénesis es un complejo proceso en el que intervienen células, factores solubles y componentes de la membrana extracelular y que se desencadena cuando el vaso existente es expuesto a un estímulo exógeno. Es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes y es el conjunto ordenado de eventos resultado del balance entre factores

pro y antiangiogénicos. Involucra la estimulación de la proliferación y migración de las células endoteliales; destrucción de la matriz extracelular; atracción de pericitos y macrófagos; estimulación de la proliferación y migración de las células musculares lisas; formación y rearmado de nuevas estructuras vasculares y finalmente deposición de matriz extracelular nueva (Andrini, 2010).

En el adulto, la velocidad de proliferación de las células endoteliales es muy baja comparada con otros tipos de células del organismo. Bajo condiciones fisiológicas ocurre angiogénesis en cada ciclo del sistema reproductivo femenino (embriogénesis), en el desarrollo normal, reproducción, reparación tisular y en la cicatrización de heridas (Andrini, 2010). La angiogénesis es importante durante el desarrollo de diferentes condiciones patológicas. Por mencionar algunas de ellas, la formación deficiente de vasos sanguíneos puede ocasionar eventos como el cerebro vascular, infarto al miocardio, desordenes ulcerativas, neurodegeneración. Mientras que el desarrollo anormal de vasos sanguíneos complica distintas enfermedades crónicas inflamatorias, como la artritis reumatoide, aterosclerosis, hipertensión pulmonar, cáncer y enfermedades oculares. En algunas condiciones patológicas como el crecimiento tumoral, metástasis y enfermedades retinianas tales como: degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro se produce una anomalía en el crecimiento y permeabilidad vascular (Jiménez-Andrade y González-Espinosa, 2011)

El inicio de la vascularización de la retina comienza alrededor de la semana 14 de gestación y los fenómenos asociados a la vascularización contemplan dos fases:

- En la primera fase denominada vasculogénesis, las células precursoras de origen mesenquimatoso entran a la retina a través del nervio óptico. Estas células son las responsables de la formación de los vasos retinianos principales. Su crecimiento sigue una trayectoria centripeta, es decir, del nervio óptico hacia la periferia, alcanzando el borde de la retina nasal entre la semana 32 a la 36 de gestación y el borde temporal al momento del nacimiento (Gariano *et al.*, 1996; Hutcheson, 2003).
- En la segunda fase conocida como angiogénesis comienza la formación de capilares a partir de los vasos previamente formados. La cantidad de capilares aumenta y se forma la vasculatura periférica retiniana. Esta fase se lleva a cabo mediante la estimulación, proliferación y migración de células endoteliales, el rompimiento proteolítico de la

membrana basal endotelial, la degradación de la matriz extracelular adyacente, el reclutamiento de células de soporte (pericitos) y finalmente el cierre del proceso vascular (Figura 4).

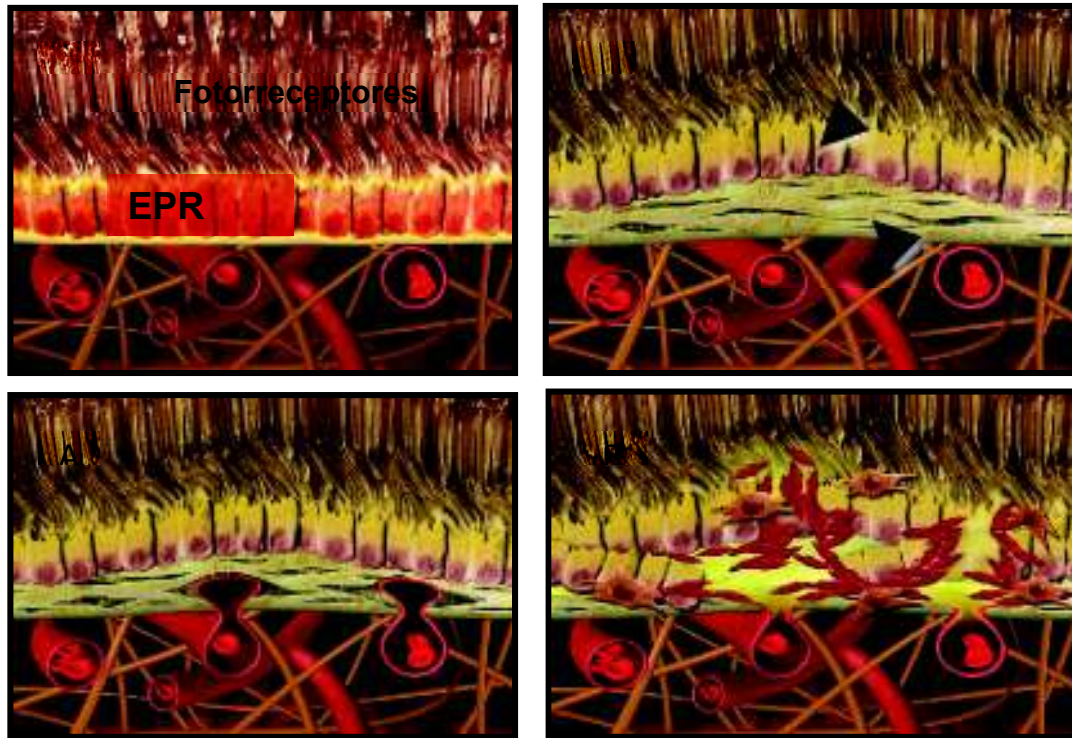


Figura 4. Etiología neovascular de la retina en la degeneración macular A: retina normal, B: engrosamiento de la membrana de Bruch y formación de drusas, C: formación de un nuevo vaso sanguíneo, D: nuevos vasos sanguíneos con fuga de sangre y líquido. Fuente: Gallego-Pinazo *et al.*, 2012.

La vasculatura retiniana tiene tres características que la diferencian del resto de la vasculatura del cuerpo humano:

1. Tiene una estructura laminar, es decir, que se encuentra localizada a nivel de una capa específica del tejido (nuclear, plexiforme y capa de fibras nerviosas).
2. Las láminas vasculares se encuentran distribuidas de una manera desigual. Las capas más internas se extienden del nervio óptico hasta la ora serrata, mientras que las más externas apenas llegan hasta la media periferia de la retina.

3. No cubre toda la superficie que irriga. Hay partes de la retina que permanecen avasculares durante toda la vida, como la capa de fotorreceptores, la región foveolar avascular, cerca de la ora serrata y el área alrededor de los propios vasos sanguíneos. (Gariano *et al.*, 1996).

I.1.4.1 Factores pro-angiogénicos o factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son sustancias que promueven la formación de vasos sanguíneos. Al ser secretados por sus células productoras, tienen una actividad autocrina, paracrina y endocrina (Kvanta *et al.*, 2006).

Existen varios factores de crecimiento, algunos de los cuales tienen el papel de ser reguladores en la vascularización de la retina, tanto en condiciones normales como patológicas. Entre aquellos que fomentan la formación de vasos podemos mencionar el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV o VEGF por sus siglas en inglés vascular endotelial growth factor), el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico, la angiogenina, el interferón, el factor de necrosis tumoral alfa, el factor de crecimiento similar a la insulina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Hutcheson, 2003; Yoo *et al.*, 2005; Dorrell *et al.*, 2007).

El EPR produce y secreta una variedad de factores de crecimiento que favorecen la supervivencia de los fotorreceptores y garantizan una estructura básica para la circulación óptima y suministro de nutrientes. Así como factores esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de la retina y la coroides. El EPR es capaz de secretar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Strauss *et al.*, 2005; Adamins y Shima, 2005; Wirostko *et al.*, 2008), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5, el factor de crecimiento transformante- β (Kvanta *et al.*, 2006), el factor de crecimiento insulínico tipo I (Slomiany *et al.*, 2004), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro, la neurotropina-3, el factor neurotrófico ciliar, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento derivado del epitelio de la lente, varios miembros de la familia de las interleucinas, quimiocinas, el factor de necrosis tumoral α , factores estimulantes de colonias.

El factor de crecimiento más estudiado hasta la fecha, por el papel primordial que tiene en la génesis de enfermedades neovasculares en el cuerpo, es el factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF), glucoproteína con un peso molecular de 34-46 KDa que en condiciones de hipoxia y estrés oxidativo es secretada por los pericitos, las células del epitelio pigmentado de la retina y por las células gliales (células de Müller) (Klein *et al.*, 1984; Hutcheson, 2003; Caldwell *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005; Dorrell *et al.*, 2007). El VEGF estimula directamente el desarrollo de la vasculatura interna y externa del ojo, además actúa como un factor de permeabilidad vascular (Hutcheson, 2003). La familia del VEGF incluye diversos factores: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-A, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Del VEGF existen al menos 7 isoformas que proceden de patrones diferentes de unión del ARN m del VEGF. Sus isoformas principales con actividad biológica distintas son la 121, 165, 189 y 206 de las cuales la V₁₆₅ es la isoforma predominante. Su actividad es mediada por dos receptores de membrana ligados a tirosina de alta afinidad: el receptor VEGFR1 (FLT1) y el receptor VEGFR2 (FL T2) (Figura 5).

El VEGF₁₆₅ parece ser la responsable de la neovascularización patológica en la retina y en el resto del organismo bajo condiciones fisiológicas normales. El VEGF₁₂₁ parece ser esencial para la función vascular retiniana normal. El VEGF estimula selectivamente a la célula endotelial a través de dos receptores, el VEGF R-1 y el VEGF R-2, por medio de los cuales se produce la señal para la activación de eventos fisiopatológicos. Se piensa que el VEGF R-2 es el principal receptor para la señalización del VEGF en la angiogénesis (Ferrara *et al.*, 2003; Adamis y Shima, 2005).

Tanto el VEGF-B, como el VEGF-D y el PIGF han demostrado estimular la angiogénesis *in vivo*. El VEGF-A junto con el VEGF-B, el VEGF-E y el PIGF, preferentemente, aunque no de forma exclusiva, ejercen sus efectos sobre las células vasculares. A este último se le ha asociado a la arteriogénesis, mientras que el VEGF-C y el D actúa sobre las células endoteliales linfáticas. El VEGF-A, el B y el E están involucrados en la angiogénesis de células endoteliales sanguíneas, mientras que el VEGF-C y el D actúan sobre las células endoteliales linfáticas (Rojas y Saucedo, 2012).

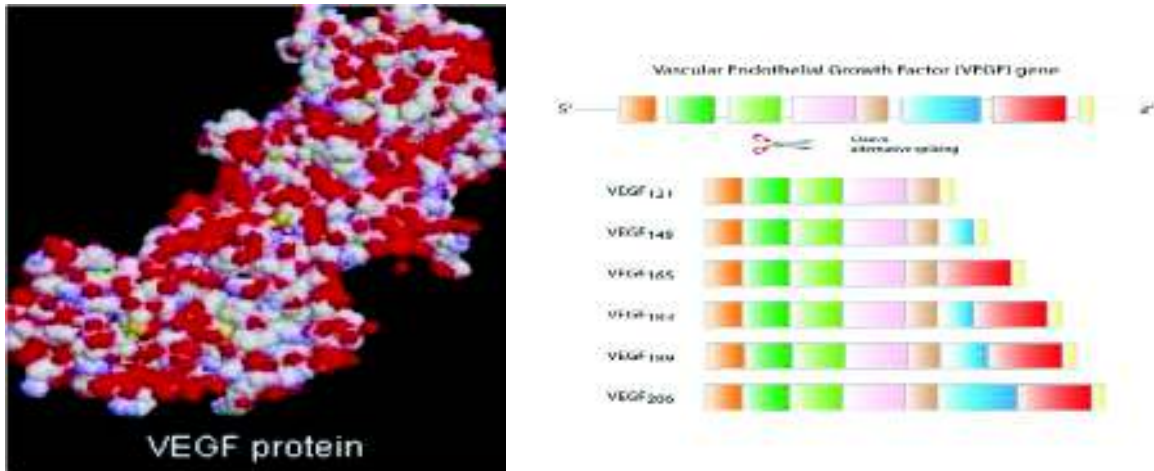


Figura 5. Representación esquemática de la proteína dimérica factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus diferentes isoformas (Ustáriz *et al.*, 2006).

El VEGF, conocido anteriormente como el factor de permeabilidad vascular (FPV), constituye un estímulo importante para el desarrollo de la angiogénesis, ya que promueve la migración y la proliferación de la célula endotelial, dos características que se requieren para el desarrollo de nuevos vasos (Ferrera *et al.*, 1992). Además, el VEGF incrementa la permeabilidad vascular, la cual contribuye también a la angiogénesis (Ferrera *et al.*, 2002). Datos recientes sugieren que el VEGF puede tener también propiedades proinflamatorias. Las células inflamatorias (leucocitos) pueden producir y liberar VEGF y éste unirse a los leucocitos y éstos participar en la ruptura de la barrera hematorretiniana (Ishida *et al.*, 2003).

Los mecanismos a través de los cuales el VEGF induce ruptura de la barrera hematorretiniana son complejos. El VEGF da inicio a la permeabilidad vascular a través de múltiples mecanismos incluyendo la participación de los leucocitos en la lesión de la célula endotelial y la formación de fenestraciones. Numerosos investigadores en el campo de la angiogénesis creen que la permeabilidad vascular es un precursor y un paso necesario para la neovascularización (Adamis y Shima, 2005). El VEGF al unirse a los receptores de transmembrana activa una serie de rutas de transducción de señales dando lugar a una serie de efectos entre los que se incluyen los siguientes.

- Proliferación de células endoteliales
- Migración de las células endoteliales
- Aumento de la permeabilidad vascular de los capilares
- Supervivencia de las células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis.

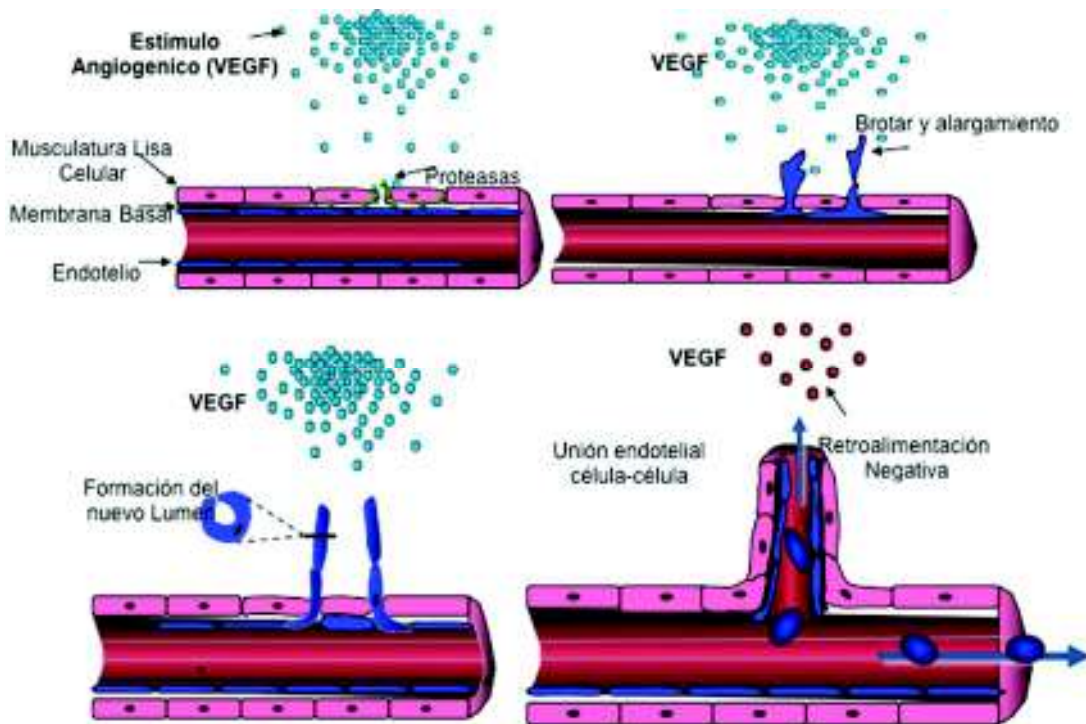


Figura 6. Estímulo angiogénico con VEGF: ruptura de la membrana basal, proliferación celular endotelial, morfogénesis capilar y neovascularización.

El VEGF sirve de regulador en la angiogénesis fisiológica durante la embriogénesis, el crecimiento óseo y las funciones reproductivas. En condiciones fisiológicas, el EPR secreta bajas concentraciones de VEGF, lo cual impide la apoptosis de las células endoteliales y es esencial para mantener el endotelio coriocapilar intacto. Además el VEGF regula la permeabilidad vascular y por ende, la estabilización de las fenestraciones del endotelio.

También ha estado implicado en la angiogénesis patológica asociada con tumores y desórdenes neovasculares intraoculares, entre otros. (Roberts y Palade, 1995; Lu *et al.*, 1998; Strauss *et al.*, 2005).

I.1.4.2 Factores anti-angiogénicos

Los que inhiben la vascularización son el factor de crecimiento transformador beta, el interferón alfa, la trombospondina, la angiostatina, la endostatina y el factor derivado del epitelio pigmentado de la retina (PEDF) (Gariano *et al.*, 1996). En el ojo sano, el EPR secreta PEDF, el cual contribuye en el mantenimiento de la retina y la estructura coriocalpilar de dos maneras: actúa como un factor neuroprotector (Cao *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001) y como un factor antiangiogénico (Strauss *et al.*, 2005; Adamis y Shima, 2005). En lo particular, el PEDF inhibe la proliferación de células endoteliales y estabiliza el endotelio de la estructura coriocalpilar, participando en el desarrollo embrionario del ojo (Jablonski *et al.*, 2000; Behling *et al.*, 2002). En los ratones carentes de PEDF, se ha observado que la vascularización retiniana progresa con mayor rapidez y es más susceptible a la obliteración vascular mediada por la hiperoxia (Huang *et al.*, 2008).

En el ojo sano, el PEDF se secreta en el lado apical del EPR, mientras que la secreción del VEGF se lleva a cabo en el lado basolateral. Por lo tanto, el PEDF actúa sobre las neuronas y los fotorreceptores mientras que la mayoría del VEGF secretado actúa sobre el endotelio de la coroides (Blaauwgeers *et al.*, 1999; Becerra *et al.*, 2004). Si bien se ha descrito que la sobreproducción de VEGF juega un papel esencial en el desarrollo de la retinopatía diabética proliferativa y que tanto el VEGF como las citocinas proinflamatorias participan en el desarrollo del edema macular diabético, el equilibrio entre factores pro-angiogénicos (VEGF) y anti-angiogénicos (PEDF) resulta de suma importancia en el desarrollo de alteraciones retinianas (Thebault *et al.*, 2011).

I.1.5 Patologías retinianas y tratamientos

I.1.5.1 Patologías retinianas

La degeneración retiniana se define como el deterioro de la retina causado por la muerte progresiva de sus células. Existen diversas causas que puede conducir a esta degeneración como la diabetes mellitus, el envejecimiento, la exposición a la radiación solar, la prematuridad en el nacimiento, la hipertensión o una enfermedad, generalmente hereditaria, como es el caso de la retinosis pigmentaria (Martínez, 2015).

En los últimos años, diversas anomalías, tanto en la estructura como en la función secretora del EPR se han encontrado en relación con patologías de la retina. Por lo general, en condiciones naturales existe un equilibrio entre las moléculas promotoras y las inhibidoras de la angiogénesis. Sin embargo, cuando estas condiciones son alteradas, como sucede durante los episodios de hipoxia, estrés oxidativo o inflamación, este equilibrio se rompe inclinando la balanza hacia la formación de vasos anormales. La angiogénesis patológica en el ojo puede conducir a un deterioro visual grave. La angiogénesis ocular puede ocurrir en la retina, la coroides y la córnea. (Hutcheson, 2003; Kvanta *et al.*, 2006).

Las enfermedades retinianas y coroideas son las causas principales de ceguera en el mundo. Se manifiestan a través de una permeabilidad vascular aumentada y crecimiento anormal de vasos sanguíneos. La angiogénesis es la responsable directa de estos trastornos y, por ende, de la pérdida visual. Algunos ejemplos importantes de estas patologías son la retinopatía diabética, el edema macular diabético, la degeneración macular relacionada con la edad, las alteraciones secundarias a las oclusiones vasculares retinianas y la retinopatía del prematuro, entre otras. (Schlingemann y Van Hinsbergh, 1997; Kowanzetz y Ferrara, 2002) (Figura 7). Los pacientes con neovascularización coroidea tienen niveles elevados de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y niveles por debajo de lo normal del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Pardo, 2011).



Figura 7. Neovascularización patológica: VEGF como mediador de las enfermedades.

Degeneración macular relacionada o asociada a la edad (DMRE)

Es la pérdida visual producida como consecuencia de drusas, atrofia geográfica del epitelio pigmentario (forma seca o atrófica) o neovascularización coroidea (forma húmeda o exudativo-hemorrágica), en individuos con edades superiores a los 50 años (Araiz, 2005). Se caracteriza por alteraciones degenerativas progresivas en la retina del área macular y suele aparecer hacia la quinta década de la vida. Los síntomas de esta patología son: disminución de la agudeza visual central, escotoma central (un punto ciego en el campo visual) y metamorfopsia (distorsión de la

imagen). Es una patología con tendencia a la bilateralidad, aunque el grado de afectación de cada ojo puede ser asimétrico (Pardo, 2011).

Esta enfermedad lleva como características que incluye angiogénesis coroidea, disfunción de fotorreceptores, disfunción del epitelio pigmentario de retina o incluso la muerte, y/o daño de la membrana de Bruch. La angiogénesis coroidea se asocia con mayor fragilidad vascular dependiente de VEGF y permeabilidad, lo que resulta en hemorragia subretinal, deposición de lípidos, exudación de fluidos, desprendimiento de epitelio pigmentario de retina y cicatrices fibróticas. La DMRE es una enfermedad multifactorial causada por combinaciones del envejecimiento y factores genéticos, ambientales e inmunológicos (Valverde, 2013).

Retinopatía Diabética (RD)

La diabetes mellitus es un problema de salud pública mundial. En el año 2003 casi 189 millones de personas en todo el mundo eran diabéticos y se estima que para el 2030 la cifra aumente a 366 millones. En México se ha identificado como un problema de salud pública de alta prioridad existiendo entre 12 a 14 millones de personas diabéticas. Esta enfermedad presenta complicaciones sistémicas múltiples siendo la retinopatía diabética frecuente hasta en el 40% de todos los afectados de diabetes, causa principal de ceguera legal y debilidad visual en la población económicamente activa (Amos *et al.*, 1997 Zimmet *et al.*, 2001; Prado-Serrano *et al.*, 2009).

Esta complicación se caracteriza por ser una microangiopatía que produce dilataciones en los capilares (llamados microaneurismas) que producen los primeros cambios oftalmológicos. Además existe oclusiones microvasculares, neovascularización, daño de la barrera hematorretiniana, hemorragias, edema intrarretiniano, y fenómenos exudativos que determinan la gravedad y severidad de la enfermedad. El edema macular manifestación importante de esta retinopatía es la principal causa de ceguera legal en pacientes diabéticos (Prado-Serrano *et al.*, 2009).

Al igual que en la DMRE el factor pro-angiogénico VEGF se encuentra en altos niveles el cual está asociado con inflamación y angiogénesis patológica. La expresión aumentada de este factor se detecta en el vítreo de pacientes diabéticos. El VEGF promueve la migración y

adhesión de leucocitos a células endoteliales vasculares, y aumenta la permeabilidad vascular intraocular y la angiogénesis, lo que puede conducir a la aparición y progresión de retinopatía y desarrollo de angiogénesis del iris. El VEGF estimula al epitelio pigmentario de retina y a las células endoteliales a secretar citoquinas, incluyendo la proteína quimiotáctica monocítica-1 (MCP-1) e IL-8, para promover la migración y adhesión de leucocitos a los endotelios y para promover la angiogénesis patológica. La acumulación de leucocitos contribuye al aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis, dando lugar a la aparición y progresión de retinopatía diabética.

Retinopatía Pigmentaria

La retinosis pigmentaria (RP) es la principal causa genética de ceguera en los países desarrollados constituyendo el 85-90 % de las distrofias hereditaria de retina (Ayuso y Millán, 2010) y tiene una prevalencia mundial de 1 por cada 4.000 individuos (Anasagasti *et al.*, 2012).

La RP es una enfermedad con un desarrollo lento y progresivo en el que la función de los fotorreceptores va disminuyendo con los años. Comienza con la degeneración de los bastones debido al defecto genético y con el tiempo degeneran también los conos que no pueden sobrevivir mucho tiempo sin el microambiente dominado por los bastones. La muerte de estos conos es el principal problema porque provoca la pérdida de la visión central. Aunque es una enfermedad de origen genético, en los últimos años se ha puesto de relevancia la implicación del estrés oxidativo y la inflamación en la progresión de la enfermedad (Punzo *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2012; Athanasiou *et al.*, 2013).

I.1.5.2 Tratamientos antioxidantes y antiangiogénicos

En los últimos años se han realizado varios ensayos en pacientes y en modelos animales que evalúan la efectividad de terapias antioxidantes como la suplementación con antioxidantes o la modulación de la maquinaria antioxidante endógena. 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 (Lebold y Traber, 2014).

La luteína y la zeaxantina son excelentes secuestradores del oxígeno singlete; sus capacidades son superiores a α -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 proteosoma 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 ocular y la inflamación sistémica una reducir el riesgo de degeneración macular 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.*, 2013).

Los antioxidantes más abundantes en la dieta son los polifenoles. Estos proporcionan recursos valiosos a la medicina natural contribuyendo a la prevención y/o tratamiento de enfermedades degenerativas (por ejemplo enfermedades cardiovasculares y cáncer) (Forman *et al.*, 2014). Los polifenoles (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 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 erythroide 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 H₂O₂ que pueden activar el elemento de respuesta electrofílica (EpRE o ARE) (Forman *et al.*, 2014).

En las tres últimas décadas el conocimiento de la angiogénesis ha cambiado. El concepto de manipulación del lecho vascular con base en la estimulación e inhibición de neovasos dio inicio a la terapia antiangiogénica como un nuevo enfoque en el tratamiento del cáncer y en las enfermedades de neovascularización retiniana y coroidea. Los avances en tratamientos oncológicos con moléculas antiangiogénicas han facilitado resultados significativos en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. (Ustrariz-Gonzales *et al.*, 2006).

El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) (citocina soluble que favorece la angiogénesis y aumenta la permeabilidad vascular) desempeña un papel importante en la formación de neovasos, por lo que distintos fármacos van dirigidos contra el VEGF. Hasta el momento actual el tratamiento antiangiogénico se basa en el uso de agentes terapéuticos conocidos como aptámeros y anticuerpo monoclonal recombinante humanizado (Van Wijngaarden *et al.*, 2005).

Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos unido a dos cadenas de polietilenglicol que adoptan una conformación tridimensional específica que les permite unirse con alta afinidad y especificidad a un amplio rango de blancos moleculares, incluyendo las proteínas. Es una proteína “apta” (aptámera o “adecuada a la zona”) que se une específicamente a la isoforma 165 del VEGF, bloqueándolo, impidiendo su interacción con los receptores de superficie de las

células endoteliales. Este fármaco anti-VEGF (inyección intravítrea) está indicando en el tratamiento de la DMAE neovascular y presenta una elevada afinidad, selectividad, no es inmunogénica, ni tóxica, comercialmente se conoce como Pegaptanib de sodio (Macugen^R) (Tesis de medicamentos antiangiogénicos DMAE) (Ciulla *et al.*, 2009; Pardo, 2011).

Otro fármaco anti-angiogénico es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 (Bevacizumab o Avastin^R), anticuerpo resultante de un solo clon de células plasmáticas. Se desarrolló para inhibir la vascularización de los procesos de crecimiento tumoral. Es capaz de inhibir todas las isoformas biológicamente activas del VEGF-A. El peso molecular de bevacizumad es de 148 kD, tres veces mayor (menor penetración en las capas de la retina) que ranibizumad (anticuerpo humanizado Fab) (Tabla 1) (Pardo, 2011).

Tabla 1. Características de fármacos anti-VEGF.

	Pegaptanib	Ranibizumab	Bevacizumab
Dosis	0.3 mg	0.5 mg	1.25-2.5 mg
Vía de administración	Intravítrea	Intravítrea	Intravítrea
Pauta posológica de inicio	Cada 6 semanas x 2 dosis	Cada 4 semanas x 3 dosis	Cada 4/6 semanas x 3 dosis
Mecanismos de acción	Oligonucleótido modificado y pegilado con alta afinidad hacia VEGF165 No anticuerpo Inhibe la isoforma VEGF165 del VEGF-A	Anticuerpo anti VEGF-A Fragmento Fab Inhibe todas las isoformas del VEGF-A	Anticuerpo anti VEGF-A Forma completa Inhibe todas las isoformas del VEGF-A
Características diferenciales	Indicado en todos los tipos angiográficos	En función de datos aportados por ensayos clínicos presenta mayor eficacia clínica que pegaptanib	No indicado para DMAE húmeda. Dosis y pauta variable en función de la bibliografía consultada
Coste* de una d	600.58	918.18	11.48

Recientes estudios indican como una alternativa posible el uso del Fucoïdan un polisacárido extraído de las algas pardas por su capacidad de reducir la expresión y secreción del VEGF, así como también la angiogénesis inducida por este factor en varios modelos in vitro de células del EPR (Dithmer *et al.*, 2014). De igual manera se ha reportado que el resveratrol (compuesto fenólico de las uvas) protege las células del EPR contra el daño del estrés oxidativo a través de la estimulación bioenergética mitocondrial. El mismo mecanismo asociado a la protección del resveratrol contra el desarrollo de la neovascularización coroidea promovido por el humo del cigarro (Sheu *et al.*, 2013).

I.2 Modelos celulares en patologías asociadas al epitelio pigmentario de retina (EPR)

La capacidad de transformación de la densa monocapa de células no proliferativas del EPR en otros tipos de células varía dentro de los vertebrados. En vertebrados inferiores la habilidad de regenerar la retina vía transdiferenciación es de por vida. A diferencia de algunos mamíferos donde esto es solo posible durante el período embrionario dado la plasticidad conservada del EPR en la etapa adulta y que resulta responsable de una variedad de patologías oculares (Thebault, 2011).

El daño al EPR en humanos inicia un proceso de transdiferenciación que involucra pérdida del pigmento de células del EPR, proliferación, migración y diferenciación a diferentes tipos de células, pero falla en producir una nueva retina funcional. En casos patológicos las células del epitelio pigmentario a menudo transdiferencian no a células neural retinal (proceso fisiológico) sino a células fibroblásticas (DMAE-exudativa). En patologías tales como la vítreo-retinopatía y la retinopatía diabética proliferativa, las células transformadas del EPR contribuye a la formación de membranas epiteliales con el consecuente deterioro visual. Los cambios fenotípicos en las células del EPR bajo condiciones patológicas son referidos como metaplasia, transformación, transdiferenciación epitelial-mesenquimal o transición epitelial-mesenquimal. Los cambios fenotípicos y las vías para regular las variaciones fibróticas en estados patológicos son evaluados en modelos celulares.

I.2.1 Fuentes de células del EPR

Existen dos fuentes principales de células del EPR para experimentos en modelos in vitro: células primarias y líneas celulares continúa obtenida como resultado de la transformación espontánea e inmortalización de células.

- Células primarias o cultivos primarios: Provenientes de bancos de ojos donde las células del EPR son aisladas directamente de ojos cadavéricos o disponibles de laboratorios de investigación. Además, donde no existe bancos de ojos humanos las células primarias de EPR son obtenidas de ojos de vacas, cerdos, conejos, ratas y otros animales. Los procedimientos para aislar las células del EPR comprende la separación del vítreo y retina neural de la retina, la disociación de fragmentos de EPR con soluciones enzimáticas en diferentes regímenes de incubación seguida de centrifugación y re-suspensión.

A diferencia de las líneas celulares continuas, las células primarias de EPR son relativamente heterogéneas, exhiben variabilidad entre donadores y pueden expandirse bajo un limitado número de pasajes. Un subcultivo de células de EPR alcanza una falla replicativa después de 15 duplicaciones de su población. Es bien conocido que el envejecimiento celular detiene la división, lo cual está dado por alteraciones en la expresión de genes (Martínez-Carpio *et al.*, 2003).

Líneas celulares continuas: Existen una variedad de líneas celulares continuas del EPR que incluyen líneas humanas (Tabla 2) y línea celular de rata (EPR-J) las cuales son disponibles de compañías biotecnológicas, en particular la Colección de Cultivo Americana (ATCC). La principal ventaja de estas líneas es que se pueden subcultivar más de 100 pasajes. Además presentan una composición celular uniforme, aunque estas líneas pueden perder algunas propiedades del material celular inicial (García *et al.*, 2011; Thebault, 2011).

Tabla 2. Líneas celulares humana del epitelio pigmentario de retina (EPR) (de acuerdo a Mannermaa, 2010).

Línea celular	Fuente	Referencias
Líneas celulares espontáneamente transformada		
H80HrPE-6	Creada por Goro Eguchi usando células EPR de una persona de 80 años	Tsonis <i>et al.</i> , 2001
ARPE-19	Derivada en 1986 por Amy Aotaki-Keen de ojos normales de un hombre de 19 años quien murió de un trauma craneal en un accidente vehicular	Dunn <i>et al.</i> , 1996 ATCC CRL-2302
D407	Derivada del ojo de un niño de 12 años	Davis <i>et al.</i> , 1995.
RPE-340	Derivada en 1989 del ojo de un niño de 1 año muerto de un trauma	Matsunaga <i>et al.</i> , 1999.
Líneas celulares inmortalizadas		
hTERT RPE-1	Generada por transfección de la línea celular del EPR-340 con un plásmido expresando la subunidad humana de la telomerasa reverso transcriptasa (hTERT)	Rambhatla <i>et al.</i> , 2002; ATCC CRL-4000
h1RPE-7	Generada por transfección de la línea celular del EPR de una donadora de 50 años con un plásmido codificando al antígeno SV40	Lund <i>et al.</i> , 2001.
h1RPE-116		

I.2.2 Propiedades de las líneas celulares y condiciones del cultivo

- H80HrPE-6: Esta línea celular de EPR creada por Goro Eguchi a partir del ojo de un hombre de 80 años es útil para investigar la regeneración de lentes por células del EPR humanas (Tsonis *et al.*, 2001; Sommer 2006).
- ARPE-19: En la pasada década la línea celular ARPE-19 fue la más popular en las investigaciones con células del EPR. Presenta un cariotipo visual normal y expresa marcadores específicos del EPR, de la proteína de 65 kDa (EPR65) y de la proteína de unión al retinaldehído (CRALBP). Las propiedades de esta línea dependen de las condiciones de cultivo y la forma en que las células son mantenidas y subcultivadas. Originalmente las células ARPE-19 a pasajes 15 al 20 produce una monocapa epitelial uniforme con morfología típica de adoquín, pero con subcultivos adicionales cambia a una mezcla heterogénea de células elongadas y poligonales. En cultivos a largo plazo membranas transversales de las células forman una monocapa polarizada. El cultivo de

ARPE-19 han sido ampliamente usado en estudios del estrés oxidativo, patogénesis retinal, vías de señalización y ensayos de toxicidad (Dunn *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2007; Mannermaa, 2010).

- D407: Esta línea presenta características típicas del EPR incluyendo morfología de adoquín o empedrada, fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptores y expresión de proteína CRALBP y citoqueratinas típica del EPR. Desafortunadamente estas células no polarizan en cultivo y no sintetizan pigmento (Geisen *et al.*, 2006; Mannermaa, 2010)
- RPE-340: Estas células originalmente tienen morfología epitelial en cultivo, pero su capacidad replicativa sobre pasajes en serie es limitada y senescen después de 50-60 duplicación de población. Las células RPE-340 transfectada con hTERT tienen una extensión en su durabilidad (Bodnar *et al.*, 1998; Rambhatla *et al.*, 2002).
- hTERT RPE-1: Es una línea celular diploide de una mujer con un número cromosoma modal de 46 en el 98% de las células contadas. Ha sido usada en estudios sobre la inactividad del cromosoma X, la cual provee un excelente modelo de regulación epigenómica (Chadwick *et al.*, 2007; Culver-Cochran *et al.*, 2012).
- h1RPE (-7 y -116): Estas células tienen morfología epitelial con microvellosidades apical, pero fallan en desarrollar resistencia eléctrica transepitelial por encima de 30-40 Ω cm² bajo condiciones normales de cultivo. Han sido usadas en pocos estudios (Lund *et al.*, 2001; Costable *et al.*, 2006).

La diferenciación celular en el cultivo depende de un número de factores incluyendo la composición del medio y el sustrato de crecimiento. Una variedad de condiciones de cultivo han sido usadas en los estudios sobre células del EPR. El rango de medio usado en los cultivos de EPR incluye Iscove medio modificado de Dulbecco (IMDM), medio esencial de Chee (CEM). Alfa modificado medio de Eagle (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa y DMEM/F12. El medio base para células D407 y ARPE-19 son DMEM alto en glucosa y DMEM/F12 respectivamente. Además diferentes suplementos son usados para mejorar el crecimiento y propiedades de las células del EPR. La proporción de suero adicionado al medio varía del 1 al 20% y diferentes concentraciones de glucosa también ha sido evaluada. Los suplementos típicos adicionados en cultivos primarios de EPR incluyen factor de crecimiento de fibroblasto básico y optimizadas mezclas comerciales.

Dentro de los sustratos de crecimiento se han usado ampliamente matrices con proteínas de colágeno y laminina dado que la membrana de Bruch contiene estas proteínas y son esenciales para la polarización de las células del EPR. Además sean empleado membranas biológicas, como la membrana amniótica (Chang *et al.*, 1997; Sonoda *et al.*, 2009; Milyushina *et al.*, 2011; Kuznetsova *et al.*, 2014).

I.2.3. Ventajas y desventajas de los cultivos celulares

Los cultivos de células del EPR humano proveen la posibilidad de analizar en detalle su morfología, funciones y propiedades moleculares y genómica bajo condiciones normales y patológicas, las cuales son muy difíciles de evaluar *in vivo*. Las células del EPR no son uniforme aún *in situ*, forman un heterogéneo mosaico de similar pero no idénticas células, *in vitro* pueden activar el ciclo celular, alterar la diferenciación, senescer, y experimentar apoptosis (Grisanti *et al.*, 1995; Amemiya *et al.*, 2004). En condiciones de cultivo con determinados componentes en el medio se puede tener efectos sobre su diferenciación y viabilidad (Tezel, 1997).

El cultivo celular es un sistema artificial que presenta algunas desventajas. A diferencia de las células *in vivo*, los cultivos celulares carecen de su microambiente nativo tridimensional. Las limitaciones adicionales del uso de los cultivos de células del EPR aumentan debido a la inestabilidad genética de las líneas celulares continuas como resultado de su inestable constitución cromosómica aneuploide y la heterogeneidad de los cultivos en términos de velocidad de crecimiento y capacidad de diferenciación intra-población, con la consecuente variación en sus propiedades entre pasajes (Cai *et al.*, 2006).

A pesar de todas estas limitaciones, los cultivos celulares retienen muchas funciones especializadas y las líneas celulares se han convertido en una herramienta importante en el estudio sobre el epitelio pigmentario de retina. La principal ventaja de las líneas celulares es que retienen sus características sobre un determinado número de pasajes y poseen tiempos largos de supervivencia comparado a los cultivos primarios. Además muchas líneas celulares son homogéneas en gran extensión, mientras que los cultivos primarios exhiben heterogeneidad y variabilidad individual entre donadores (Salero *et al.*, 2012).

I.2.4. Propósitos del cultivo de células humanas del EPR

Dependiendo del objetivo o enfoque de la investigación, las células humanas del epitelio pigmentario de retina son cultivadas para obtener: una monocapa funcional altamente polarizada de células diferenciadas o una monocapa adhesiva de desdiferenciada células sobre un sustrato sólido (Kuznetsova *et al.*, 2010). En el caso de cultivar células de EPR bajo condiciones de una monocapa funcional altamente polarizada se obtiene un cultivo con propiedades características de un tejido nativo. Incluyendo características morfológicas (microvellosidad apical, invaginación basal, uniones estrechas (tight junctions) bien definidas y destacada pigmentación), expresión de proteínas específicas y parámetros fisiológicos (Sonoda *et al.*, 2009; Ablonczy *et al.*, 2011).

Los cultivos monocapa polarizados son usados como un modelo para analizar las propiedades y funciones características de EPR nativo. Dado que los disturbios de la polarización del EPR juegan un rol principal en la patogénesis de varias enfermedades retiniana, la simulación de disfunción de cultivos de EPR provee la posibilidad de evaluar la habilidad del EPR de recuperarse bajo condiciones patológicas y evaluar *in vitro* los efectos de nuevos medicamentos. Los cultivos de EPR polarizados derivados de donantes entre 9-24 años han sido usados para estudiar la secreción polarizada de interleucinas 6 y 18, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor derivado del epitelio (PEDF) (Holtkamp *et al.*, 1998; Ohno-Matsui *et al.*, 2001).

Los cultivos celulares de EPR como monocapa adhesiva sobre un sustrato sólido son usados en estudios de cambios fenotípicos evaluados por métodos morfológicos y moleculares. Se ha demostrado que las células del EPR en tales cultivos pierden gradualmente la polaridad y el contacto especializado célula a célula característicos del epitelio y adquieren ciertos rasgos típicos de células mesenquimales. Los cambios similares tienen lugar *in vivo* durante la transición epitelial-mesenquimal. Como resultado, los cultivos en monocapa adhesiva pierden poco a poco las características epiteliales como la polaridad y marcadores específicos (pigmentación, expresión de cadherina-E, citoqueratinas) y adquieren propiedades migratorias y mesenquimales tales como expresión de colágeno tipo I y fibronectina, aspectos similares a los cambios *in vivo* de las células EPR bajo condiciones patológicas.

I.3. Métodos de inducción al reto oxidativo con H₂O₂

El peróxido de hidrógeno es un constituyente fisiológico de las células y continuamente es producido por diversas vías celulares. El H₂O₂ es una molécula pequeña, sin carga que fácilmente atraviesa las membranas celulares y se localiza en múltiples compartimentos subcelulares. La concentración intracelular del H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ diluido al medio de cultivo celular (tratamientos por pulsos) asumiendo que estos al menos parcialmente mimetizan condiciones y respuestas que pueden ocurrir *in vivo*.

Debido a que el H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂. 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 H₂O₂ exógeno es degradado por catalasa y peroxidases 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 H₂O₂ (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 H₂O₂ 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).

I.3.1. Métodos de adición al medio o pulso

En modelos experimentales usados para investigar las funciones fisiológicas y efectos tóxicos del H₂O₂, los cultivos celulares son expuestos a adiciones de H₂O₂ como pulsos o bolos al medio de cultivo. En estos modelos una substancial variación en las concentraciones tóxicas de H₂O₂ pueden ser encontradas, variando desde < 10 µM hasta > 1000 µM. En líneas celulares de mamíferos en cuanto al perfil de respuesta al H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ tiene un corto tiempo de vida media debido a su rápida degradación por enzimas o su descomposición en presencia de metales (Qenaei *et al.*, 2014).

Muchos estudios conducidos por adición de H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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).

I.3.2. Métodos enzimáticos extracelulares de generación del H₂O₂

Aunque la adición de H₂O₂ 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 H₂O₂ 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_2O_2 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_2O_2 , 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_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 en relación estequiométrica simple (1:1), GOx genera continuamente bajos niveles de H_2O_2 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_2O_2 es continuamente producido *in vivo* y permanece en un “estado semi-estacionario” (H_2O_2), 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_2O_2 y catalasa (CAT) que consume el H_2O_2 mientras parcialmente reemplaza al oxígeno. La concentración de H_2O_2 a nivel celular depende de la relación de actividades de GOx y CAT que son adicionadas al medio de cultivo. Las concentraciones de H_2O_2 , 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_2O_2 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_2O_2 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_2O_2 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).

I.3.3. Método endógeno de producción de H_2O_2

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_2O_2 mitocondrial a nivel de estado estacionario. El H_2O_2 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).

I.4. Metabolismo en plantas

En las plantas el metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más sencillas, al igual que para degradar las que son más complejas y obtener las simples. Las plantas, cuentan con un metabolismo primario; en el cual se originan los componentes que intervienen en la fotosíntesis o en el metabolismo respiratorio. Los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en las

plantas son ejemplo de estos metabolitos. Y el metabolismo secundario el cual les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos secundarios son sustancias ecológicamente eficaces, frente a compuestos primarios que serían sustancias fisiológicamente eficaces.

El término secundario al principio implicaba que estas sustancias tenían menor importancia y muchas veces se les atribuyó la propiedad de productos de desechos. Desde hace algunos años esta idea ha ido cambiando ya que estos compuestos desempeñan un papel protagónico en la fisiología de la planta, la regulación del crecimiento, el desarrollo, la interacción con otros organismos y una función ecológica muy importante (Valdés y Balbín, 2000). A los compuestos derivados del metabolismo secundario se le conoce como metabolitos secundarios, los cuales se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (García, 2004).

El papel que desempeñan los metabolitos secundarios en las plantas es variado entre los que se pueden citar: i) relaciones de competencia con otras plantas actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus; ii) relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas; iii) en funciones defensivas causando toxicidad; iv) protección contra la radiación ultravioleta y la desecación; v) reserva de material nitrogenado; vi) así como en la fijación del nitrógeno atmosférico y la relación simbiótica en las raíces de las leguminosas.. Muchos factores afectan la síntesis de los metabolitos secundarios, la concentración de carbono, nitrógeno, azufre, el estado acuífero y la temperatura ambiente son algunos de los más importantes.

Según las vías biosintéticas de origen, los compuestos secundarios se dividen en cuatro grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas, glucósidos y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Valdés y Balbín, 2000).

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y polifenoles.
- Glucósidos: Saponinas, glucósidos cardiacos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Compuestos nitrogenados: Alcaloides.

I.4.1. Terpenos

También conocidos como terpenoides o isoprenoides, constituyen una clase importante de moléculas orgánicas producidas por diversos organismos para realizar una variedad de funciones biológicas en contexto ecológico. Son la clase más grande de metabolitos secundarios y están unidos por su origen biosintético común a partir de acetil-coA o intermedios glucolíticos. Muchos de estos metabolitos están implicados en la defensa como toxinas y disuaden a un gran número de insectos y animales de alimentarse de estas plantas.

Se conocen cientos y los representantes más conocidos son los que forman parte de los denominados aceites esenciales obtenidos de las plantas aromáticas. Están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. La función y estructura de los terpenos varían ampliamente y están altamente adaptadas a las necesidades y a los recursos ambientales a los que está expuesto el organismo.

Dado a su conocida importancia en las funciones biológicas tanto en seres humanos y otros organismos, ya se han hecho seis clases de fármacos durante el último siglo, esteroides, tocoferoles, taxanos, artemisininas, ingenanes y cannabionoides.

I.4.2. Alcaloides

Los alcaloides son un grupo amplio y estructuralmente diverso de productos naturales de origen microbiano, vegetal y animal. La principal fuente de estos metabolitos secundarios son las plantas, especialmente en ciertas familias de plantas con flor. Se estiman alrededor de 27000 alcaloides. Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen nitrógeno orgánico de origen natural. Se derivan generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, tienen distribución restringida, y cuentan con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas. Muchos de los extractos que contienen alcaloides se han usado como agentes terapéuticos durante más de 3000 años, como en casos de mordeduras de serpientes, fiebre y locura (Cushnie *et al.*, 2014).

I.4.3. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son un tipo de metabolitos producto de las rutas metabólicas de los metabolitos primarios y se encuentran distribuidos en los grandes grupos de organismos fotosintetizadores. Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8000 compuestos distintos. Químicamente los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. La clasificación de compuestos fenólicos más aceptada es la propuesta por Waterhouse (2002), que agrupa a los compuestos fenólicos en base su estructura química. La clasificación se muestra en la tabla 3, donde se distinguen dos grupos principales: flavonoides y no flavonoides.

Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica. Fuente: Waterhouse (2002).

	Estructura	Clasificación
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoles
		Flavonas
		Flavan-3-oles
		Proantocianidinas (taninos no hidrolizables)
		Antocianidinas (Antocianos)
		Flavanonas
		Isoflavonas
No Flavonoides	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos
	C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzoicos
	(C ₆ -C ₁) +Azúcar	Taninos hidrolizables
	(C ₆ -C ₃) +Azúcar	Taninos hidrolizables
	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos

La complejidad ascendente de las cadenas carbonadas de los compuestos fenólicos según Harborne, 1990 se muestran a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Ordenamiento de las especies fenólicas, basado en la cantidad de átomos de carbono.

Número de átomos	Esqueleto carbonado	Tipos o Clases
6	C ₆	Fenoles simples
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas y Ácidos fenilacéticos
9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, Isocumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos y Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides e Isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos y Neolignanos
30		Biflavonoides
n	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Ligninas, catecol

La síntesis de los compuestos fenólicos suele estar restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes, ataque de microorganismos, o por otro tipo de estrés biótico o abiótico. Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la correspondiente enzima, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Existen dos rutas metabólicas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos, la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger, 2006).

La ruta del ácido shikímico, la vía principal en plantas superiores, depende de la luz y se inicia en los plastos por condensación de dos productos: la eritrosa 4-fosfato (que procede de la ruta de las pentosas fosfato) con el fosfoenolpiruvato (intermediario en la glucólisis), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual deriva el corismato, que es un

intermediario clave en la síntesis de la fenilalanina. La fenilalanina es un aminoácido aromático el cual sufre una eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico, esta reacción esta catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL). Las reacciones posteriores consisten en adiciones de más grupos hidroxilo y otros grupos funcionales. Los ácidos trans-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico, cuya principal función es ser precursor para otros compuestos fenólicos como: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Moncayo-Luján, 2015).

Los flavonoides junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres son los compuestos fenólicos más abundantes e importantes. A los cuales además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos como actividades antiinflamatoria, antimicrobial, antiproliferativa, cardiotónica, hepatoprotectora etc.

I.4.3.1. Flavonoides

Los flavonoides uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C₆-C₃-C₆, designadas como A, B y C. Constituyen el grupo de compuestos fenólicos más importante por su gran variabilidad estructural y su presencia en la mayoría de alimentos de origen vegetal, se conocen más de 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular y, se caracterizan por un sistema específico C₁₅ (C₆ - C₃ - C₆) de tres anillos, dos de ellos aromatzados (A y B) y un tercero, tipo pirano (C) (Figura 8) (Harborne y Williams, 2000; Merken y Beecher, 2000; Tsao y Yang, 2003). Los flavonoides se subdividen principalmente en flavonas, flavonoles, flavan-3oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (Figura 8). Otros grupos de flavonoides, que cuantitativamente se encuentran en menor número en la dieta, son los dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas.

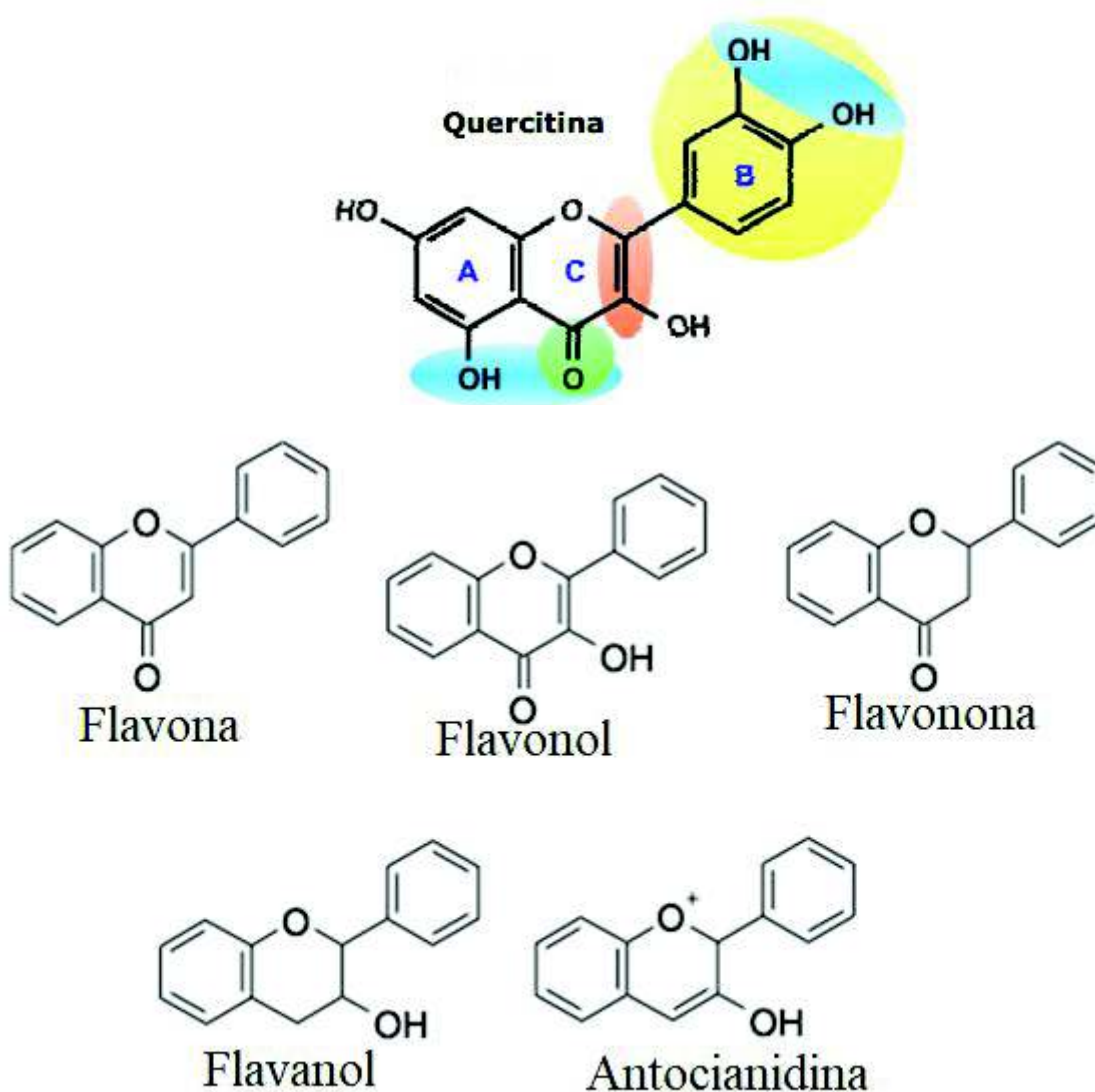


Figura 8. Estructura química de subclases de flavonoides. Principales grupos funcionales de la estructura del flavonoide quercetina. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en anaranjado, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, punto de capacidad de quelación de metales. Fuente: Ugartondo-Casadevall (2009).

La estructura básica de los flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo generalmente están presentes en las posiciones 4', 5 y 7 y los azúcares son muy

comunes en la mayoría de los flavonoides, de forma general como glucósidos. Mientras que los azúcares y los grupos hidroxilo incrementan la solubilidad en agua de los flavonoides, los grupos metilo y las unidades de isopentilo confieren a los flavonoides un carácter lipofílico (Srinivas *et al.*, 2010; Biesaga, 2011).

Los flavonoides son antioxidantes en virtud al número y posición de sus grupos funcionales hidroxilos, unidos a las estructuras del anillo (Figura 8). Las características estructurales que le confieren, la acción antioxidante son (Ugartondo-Casadevall, 2009):

- presencia de un grupo catecol (3',4'-dihidroxi) en el anillo B
- presencia de un doble enlace insaturado entre C₂ y C₃ en el anillo C
- presencia de un hidroxilo en C₃ en el anillo C

I.4.3.2. Ácidos Fenólicos

Los principales no flavonoides presentes en la dieta son los ácidos fenólicos C₆-C₁ (ácidos hidroxibenzoicos), sobre todo el ácido gálico, precursor de los taninos hidrolizables y los ácidos hidroxicinámicos C₆-C₃. Los ácidos hidroxibenzoicos también conocidos como ácidos fenólicos, poseen una estructura C₆-C₁ derivada del ácido benzoico propiamente dicho (Figura 9). Las hidroxilaciones y metilaciones sobre éste dan lugar a los distintos ácidos hidroxibenzoicos. Los más frecuentemente encontrados en la naturaleza son los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico y protocatéquico (Gonçalves *et al.*, 2013). Los ácidos hidroxicinámicos son muy abundantes y diversos, y todos provienen del ácido cinámico (Figura 9). Básicamente son cuatro: ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Las cumarinas son ácidos hidroxicinámicos ciclados, pero no se incluyen dentro de este grupo (Figuroa-Morales, 2012).

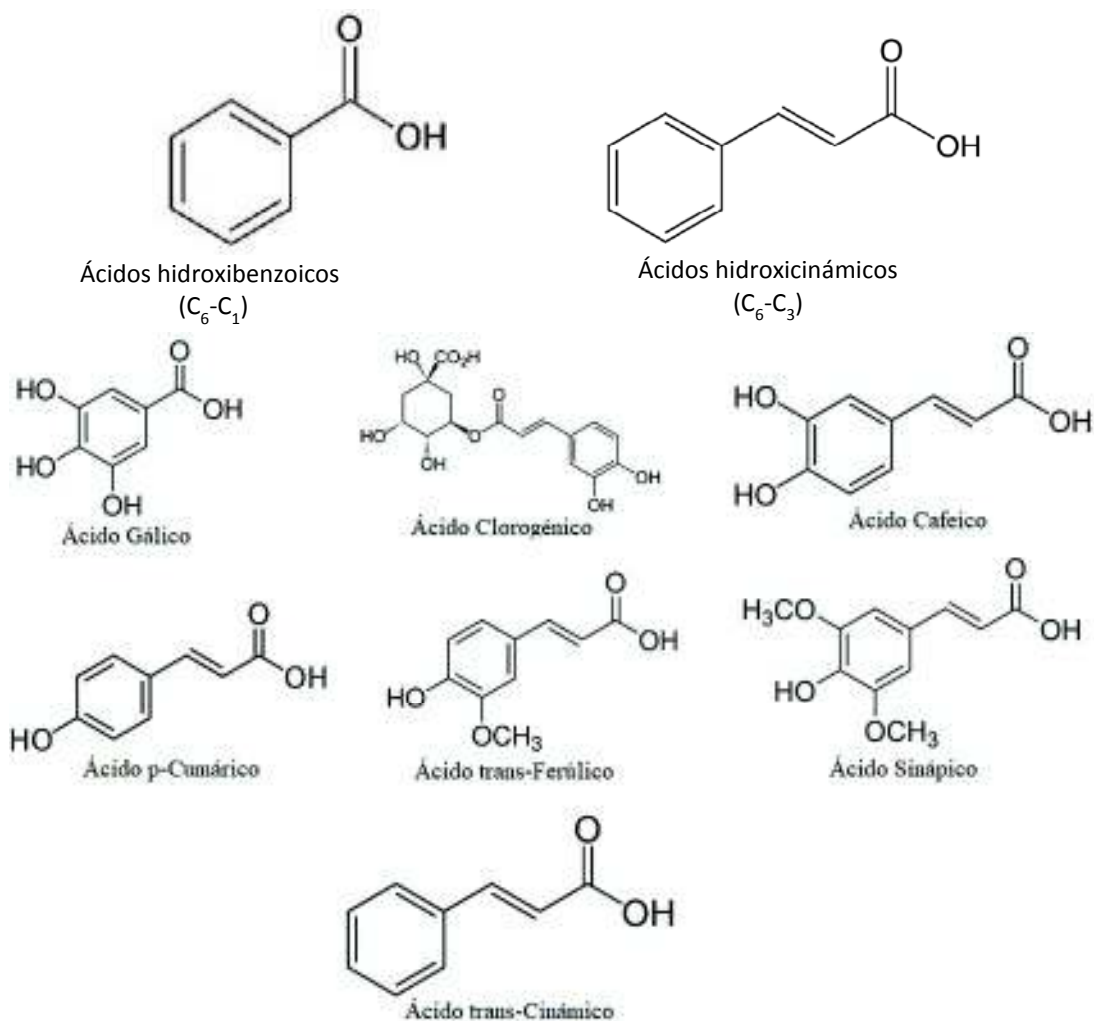


Figura 9. Estructura química de subclases de ácidos fenólicos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxicinámicos no se suelen encontrar en forma libre, sino que se combinan principalmente de dos maneras formando derivados solubles.

- Combinaciones de grupos carboxilos de los ácidos fenólicos con grupos hidroxilos de compuestos orgánicos (ácido quínico, glucosa, etc.) formando ésteres, como por ejemplo el ácido clorogénico que se encuentra en muchas frutas y hortalizas, destacando la berenjena y la alcachofa (Olthof *et al.*, 2001).
- Combinaciones donde se ven involucrados los grupos fenólicos de la molécula con otras moléculas distintas a las descritas anteriormente dando lugar a hidroxicinámicos

conjugados, como por ejemplo el ácido *p*cumárico-*o*-glucósido descrito en tomate (Gautier *et al.*, 2008).

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos con grupos OH y presencia de grupos carbonilos no unidos directamente al anillo bencénico (Figura 9), denominados ácidos de la serie cinámica, como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sinápico y el ácido *p*-cumárico, son más activos que los derivados hidroxilados del ácido benzoico, como el *p*-hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido siríngico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Nenadis *et al.*, 2003; Vafiadis y Bakalbassis, 2003; Chen *et al.*, 2012).

1.5. *Bucida buceras*

Las plantas pertenecientes a la familia Combretaceae se han utilizado a lo largo de la historia como plantas medicinales (Rodríguez de Morais, *et al.*, 2012).

La familia Combretaceae pertenece al orden Myrtales y comprende alrededor de 20 géneros y 500 especies. Están distribuidas a lo largo de los trópicos, con algunas extensiones a regiones subtropicales y de clima templado.

Aquí en México está dividida en cinco géneros con nueve especies, Standley *et al.* (1924).

- *Bucida buceras*
- *Combretum riathum*, *C. farinosum*, *C. mexicanum* *C. palmeri*
- *Conocarpus erectus*
- *Laguncularia racemosa*
- *Terminalia catappa*

Algunas de estas especies poseen innumerables propiedades, entre las cuales las más comunes son el uso de la madera para construcciones rurales o fabricación de diversos objetos, algunas especies se cultivan para uso ornamental. También se ha dado uso en medicina tradicional contra enfermedades renales, respiratorias, oculares; contra procesos inflamatorios, hemorragias, diabetes, etc. En este aspecto son escasos los trabajos que validan dichas propiedades (Pagaza y Fernández, 2005).

Se sabe que *Bucida buceras* contiene componentes funcionales como flavonoides y terpenos responsables de la actividad de citotoxicidad potente contra líneas celulares de tumores. Algunos autores han informado que los extractos de *B. buceras* tienen actividades antibacterianas y antifúngicas.

En un estudio fitoquímico se obtuvo evidencia que *Bucida buceras* tiene la presencia de carotenos, triterpenos / esteroides, grupos lactónicos, fenoles / taninos, aminas o aminoácidos, flavonoides / antocianinas, saponinas y compuestos reductores en diferentes extractos de *B. buceras* (Iloki *et al.*, 2015).

II. HIPÓTESIS

Los compuestos fitoquímicos presentes en la *Bucida buceras* disminuyen el efecto oxidante y por consiguiente pueden bloquear la sobre secreción del VEGF en las células del epitelio pigmentario de la retina.

III. OBJETIVOS

III.1. General

Evaluar la composición fitoquímica de *Bucida buceras* en su respuesta a la actividad antioxidante y anti-angiogénica en un modelo celular del Epitelio Pigmentario de Retina (ARPE-19).

III.2. Específicos

- a) Cuantificar el contenido de fenoles totales, flavonoides por métodos espectrofotométricos mediante extracciones con diferentes solventes.
- b) Identificar y cuantificar por HPLC flavonoides y ácidos fenólicos.
- c) Evaluar la actividad antioxidante mediante: actividad radicalaria y poder reductor del hierro férrico e inhibición del H₂O₂ sobre células de retina (ARPE-19).
- d) Evaluar la actividad anti-angiogénica por medio de la cuantificación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Selección de la muestra y elaboración de extractos

Las muestras de *Bucida buceras* tanto de tronco, tallo y hoja, fueron colectadas en la localidad de Hermosillo, Sonora, durante el mes de agosto del 2015, en cinco diferentes localidades de la ciudad.

Las muestras fueron lavadas con agua. Se secaron a temperatura ambiente durante una semana. Seguido por un proceso de molienda en un molino (Retsch, SR-3, Alemania) hasta obtener un polvo fino. Fueron almacenados en ausencia de luz a temperatura ambiente hasta su análisis.

Del polvo almacenado se pesó 150 gramos de cada una de las partes de la planta y se colocó en un matraz de 2 litros, se obtuvieron 3 matraces donde se adiciono 1200 mililitros de diferentes solventes: metanol, etanol y acetona en cada uno de los matraces. Se mantuvieron en agitación constante por tres días a temperatura ambiente en un agitador orbital (VWR DS-500).

Para los extractos acuosos, igual se pesó 150 gramos de cada una de las partes de la planta y se colocó por separado a cada una en 1200 mililitros de agua, la cual se puso a punto de hervor durante 30 minutos, repitiendo esté proceso durante 3 veces.

Por ultimo para las 4 extracciones. Se filtraron en papel filtro Whatman No. 41 con una bomba de vacío. Después se concentraron por separado en un rotoevaporador (Buchi R-210, Switzerland) a 37°C, luego se congelaron a -70°C para después ser liofilizados a -46°C durante 5 días, hasta obtener un fino polvo, el cual fue disuelto en dimetil sulfóxido a una concentración final de 200 mg de materia seca/mL y almacenados a -4°C.

IV.2. Determinación de Compuestos Fenólicos por Métodos Espectrofotométricos

IV.2.1. Fenoles totales

La cuantificación de compuestos fenólicos fue determinada a través del método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones reportadas por Iloki

et al. (2013). Para la curva de calibración se utilizó de material de referencia al ácido gálico, se pesaron 10 mg de ácido gálico y se aforo en un matraz volumétrico de 10 mL con agua milli-Q para obtener una concentración de 1 mg/mL. A 500 µL de los diferentes extractos en un rango de concentración determinado (100-600 µg/mL) se le adicionó 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido ¼ y 500 µL de carbonato de sodio al 10%. Se incubó durante 2 horas y la absorbancia fue leída a 760 nm en un lector de placa (Multiskan-Spectrum, Waltham, USA). Los resultados fueron expresados en µg equivalente de ácido gálico (EAG)/mg de extracto obtenido, a partir de una curva de calibración con ácido gálico en un rango de concentraciones de 0.00625-0.1 mg/mL.

IV.2.2. Flavonoides método cloruro de aluminio (AlCl₃)

Se utilizó el método colorimétrico propuesto por Zou *et al.* (2004). El cual cuantifica flavonas y flavonoles. Se basa en la cuantificación de un color amarillo-naranja producido por la interacción de los flavonoides (flavonas y flavonoles) con el AlCl₃. Para cada muestra se usó 25 µL en un rango de 5-250 mg/mL con cada uno de los extractos, se les adiciono 25 µL de Nitrito de Sodio (NaNO₂) al 5%, 400 µL de agua desionizada, 50 µL de AlCl₃ al 10% y 170 µL de NaOH 1M. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó en un espectrofotómetro con lector de microplaca (Thermo scientific, Waltham, USA) a 510 nm. Se llevó a cabo una curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides, con catequina en un rango de 0.078-2.5 mg/mL y se expresó como µg equivalentes de catequina (EC)/mg de extracto.

IV.2.3. Flavanonas y flavanoles método 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP)

Se utilizó el método espectrofotométrico de Das Detusche Arzneibuch cuyo fundamento se basa en la interacción de las flavanonas y flavanoles con el DNP en medio ácido para formar fenilhidrazonas (Nagy y Grancai, 1996). Se pusieron 40 µL de la muestra (30-250 mg/mL) y se disolvieron en 80 µL de solución DNP (para 5 mL: 50 mg de DNP en 100 µL de ácido sulfúrico al 96% (H₂SO₄) y 4850 µL de metanol), se mezclaron e incubaron por 50 minutos a 50°C en baño María, se dejaron enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 280 µL de hidróxido

de potasio (KOH) al 10% disuelto en agua, por último se midió la absorbancia a 486 nm en un lector de microplaca (Thermo scientific, Waltham, USA). El contenido de flavanonas y flavanoles se determinó a través de una curva de calibración con naringenina (1.0-4.5 mg/mL) expresada como μg equivalente de naringenina (EN)/mg de extracto.

IV.2.4. Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se calculó sumando las concentraciones obtenidas en los métodos de cuantificación de AlCl_3 (flavonas y flavanoles) y método DNP (flavanonas y flavanoles), los resultados fueron expresados como $\mu\text{g/mL}$ de extracto (Chang *et al.*, 2002).

IV.3. Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos por HPLC

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales de *Bucida buceras* se siguió la metodología propuesta por Haghi y Hatami (2010), con algunas modificaciones. Para el caso de ácidos fenólicos se usó el método de Vansteenkiste *et al.* (2004), con algunas modificaciones.

IV.3.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un HPLC marca Varian, con una bomba cuaternaria (Postar 230) y una columna analítica de C18 (Varian CP30710, Lake Forest, USA) en fase reversa, con longitud de 150 mm x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm , donde se lleva a cabo la separación a temperatura ambiente.

Para la identificación de flavonoides y ácidos fenólicos el volumen de inyección fue de 20 μL y se usó un flujo binario para ambos métodos el cual consistió con una fase móvil A: acetonitrilo al 5% en metanol; B ácido fórmico al 1% en agua. Se usó un gradiente distinto para cada determinación:

Tabla 5. Sistema de gradientes empleado en la identificación y cuantificación de flavonoides.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solvente A	Solvente B
0	0.8	95	5
5	0.8	85	15
10	0.8	70	30
15	0.8	68	32
19	0.8	67	33
24	0.8	50	50
35	0.8	5	95

Tabla 6. Sistema de gradientes empleado en la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solvente A	Solvente B
0	0.8	100	0
5	0.8	99	1
10	0.8	80	20
22	0.8	80	20
25	0.8	60	40
30	0.8	40	60
35	0.8	100	100

Las detecciones se llevaron a cabo en un detector Varian ProStar 325 UV-Vis a 280 nm mediante el programa Galaxie versión 1.9.

IV.3.2. Preparación de estándares y curva de calibración

La identificación de los flavonoides y ácidos fenólicos en los diferentes extractos se hizo mediante una comparación en los tiempos de retención y características espectrales con la de los estándares de referencia. Para el caso de la cuantificación de los flavonoides y ácidos fenólicos se realizó a partir de la extrapolación con las curvas de calibración lineal de los

estándares para cada uno de los casos. El contenido de cada analitos encontrados fue expresado como mg/g de extracto.

En la preparación de las curvas de calibración se utilizaron los siguientes estándares los cuales son grado HPLC y cuentan con un grado de pureza $\geq 95\%$.

Tabla 7. Estándares para la curva de flavonoides y su rango de concentración.

Analito	Rango lineal ($\mu\text{g/mL}$)
Catequina (trans-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona)	15.62-1000
Esculetina (6,7-dihidroxi-2H-1-benzopirano) cumarina	7.81-500
Rutina (quercetina-3-rutinósido)	7.81-500
Quercetina (3,3'',4'',5,7-pentahidroxi-flavona)	7.81-500

Tabla 8. Estándares para la curva de ácidos fenólicos y su rango de concentración.

Analito	Rango lineal ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico)	7.81-500
Ácido clorogénico (ácido 5-O-(3,4-dihydroxicinnamoyl)-D-quinico)	3.9-100
Ácido cafeico (ácido 3,4-dihydroxicinámico)	3.9-50
Ácido cumárico (ácido trans-4-hydroxicinámico)	3.9-125
Ácido ferúlico (ácido 3-(4-hydroxi-3-metoxifenil)-propenoico)	3.9-250
Ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hydroxicinámico)	7.81-500
Ácido cinámico (ácido-3-fenil-2-propenoico)	1.95-125

IV.3.3. Método de validación

Para la validación de la metodología de cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC se evaluaron los parámetros de linealidad del método, límites de detección y porcentajes de recuperación del estándar.

La linealidad del método es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. Esta fue determinada con siete puntos de la mezcla de estándares entre 1.95-1000 $\mu\text{g/mL}$ por triplicado.

El límite de detección corresponde a la menor cantidad de analito detectada en la muestra, no implica su cuantificación. Para la evaluación de este parámetro los análisis fueron disueltos en metanol grado HPLC a una concentración de 1mg/mL y a partir de esta se realizaron las diluciones correspondientes, considerando que la señal de las muestras fuera tres veces mayor que la señal del ruido.

Para el caso del porcentaje de recuperación se basó en la adición de una concentración conocida de la mezcla de estándares de la muestra. Este representa la recuperación de un analito y se refiere a la eficiencia de la extracción en un proceso analítico. Se agregó 1 mL de la mezcla de estándares quedando las concentraciones de la siguiente manera:

Tabla 9. Concentraciones finales en mezcla de estándares.

Flavonoides	
Analito	Concentración (mg)
Catequina	1
Esculetina	0.5
Rutina	1
Quercetina	0.5
Ácidos Fenólicos	
Analito	Concentración (mg)
Gálico	2
Clorógeno	2
Cafeico	1
Cumárico	0.25
Cinámico	0.25
Ferúlico	0.5
Sinápico	0.25

Estas concentraciones entraron a su proceso de hidrólisis correspondiente. La recuperación se calculó mediante la comparación de las relaciones de área de las muestras extraídas y de los estándares no extraídos.

IV.3.4. Métodos de extracción e hidrólisis

IV.3.4.1. Método de extracción e hidrólisis para flavonoides

Se pesaron 100 ± 5 miligramos de muestra por triplicado y se agregaron 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1.2 M en agua/metanol (50% agua y 50% metanol), se agregaron 8 mg del antioxidante ácido ascórbico y se agitaron, posteriormente se hidrolizaron las muestras a 50°C por 2 horas y se dejaron enfriar. Una vez frías las muestras se llevaron a 10 mL con metanol y se sonicaron por 5 minutos. Después se ajustó el pH a 3, seguido de una centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos, se anotó el volumen final de la muestra, se filtró con un filtro de membrana de $0.20 \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Bedford, USA) para su posterior análisis cromatográfico. Las muestras que no fueron analizadas en el momento fueron almacenadas en congelación a -18°C .

IV.3.4.2. Método de extracción e hidrólisis para ácidos fenólicos

Se pesaron 100 ± 5 miligramos de muestra por triplicado y se les agrego 10 mL hidróxido de sodio (NaOH 2M), se agitó, se pasó un flujo de nitrógeno de alta pureza a la superficie durante un minuto, se volvió a agitar. Se dejó en agitación en un agitador orbital de placa (VWR, Radnor, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Se les agregó 5 mL de ácido clorhídrico 4M frío, se agitó vigorosamente y se ajustó el pH a 3. Se adicionaron 5 mL de éter y se agitó, después se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 25°C , se recuperó la fase superior (éter) y se colocó en un tubo de 10 mL protegido de la luz, se repitió este último paso y se separó por segunda ocasión la fase superior. El tubo con el éter recuperado se pasó a evaporar con flujo de nitrógeno de alta pureza, después se constituyó con $500 \mu\text{L}$ de metanol. Las muestras que no fueron analizadas en el momento fueron almacenadas a congelación a -18°C .

IV.4. Evaluación de la actividad antioxidante

IV.4.1. Capacidad de secuestro del radical libre DPPH•

Se evaluó la actividad antirradical o secuestro del radical DPPH• metodología descrita por Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones reportadas por Iloki *et al.* (2013). Se basa en el aumento gradual de la decoloración de la solución control DPPH• midiendo la capacidad del secuestro del radical libre. Se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos de las plantas 1-25µg/mL en un volumen de 500 µL a las cuales se les adiciono 500 µL de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) (0.2mM) en etanol, se incubó durante 30 minutos en ausencia de luz. La absorbancia de la mezcla fue medida a 517 nm utilizando un espectrofotómetro de lector de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, USA).

IV.4.2. Ensayo de poder reductor del hierro férrico (FRAP)

El método se basa en medir la capacidad antioxidante del extracto, la muestra reduciendo el hierro férrico a ferroso, el cual de un color intenso al ir reduciendo con el complejo TPTZ. A 5 µL de muestra en sus diferentes concentraciones 1000-5000µg/mL fueron agregados 150 µL del reactivo de FRAP. El reactivo FRAP fue preparado en buffer de acetato (pH 3.6), solución 2,4,5-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM y cloruro de hierro III 20 mM en proporciones de 10:1:1 (v/v), respectivamente. La absorbancia de la mezcla fue medida en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, USA) a 593 nm (Benzie y Strain, 1996). Se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico (100-1000 µM) y los resultados fueron expresados como µM equivalente de ácido ascórbico (EAA)/mg extracto.

IV.5. Efecto retino protector de *Bucida buceras*

IV.5.1 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 Dubelco 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). Las células se sembraron 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 atmosfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Se procedió a realizar los experimentos una vez que el cultivo celular alcanzó un 80 a 90% de confluencia.

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.

Se pusieron 100 µL con una densidad de 25,000 células por pozo en placas de 96 pocillos y pre-incubadas durante 24 horas para su adherencia.

IV.5.2. Diseño experimental para la inducción del estrés oxidativo

IV.5.2.1. Método de adición o pulso del H₂O₂ al medio de cultivo

Al pasar las 24 horas de pre-incubación, se reemplazó el medio por 100 µL de diferentes concentraciones 1600, 1000, 800, 500 y 250 µM de H₂O₂ (Sigma) recién preparado y células sin peróxido como control.

IV.5.2.2. Método de generación enzimática continua exógena del H₂O₂ por glucosa oxidasa (GOx)

Después de las 24 horas de adherencia de las células, la glucosa oxidasa fue adicionada al medio para iniciar la generación del H₂O₂ 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.

Antes del uso de la alícuota fue descongelada, diluida y adicionada al medio de cultivo para producir concentraciones finales de 50, 25, 12.5, 10 y 2.5 mU/mL.

IV.5.3. Inhibición del H₂O₂ y viabilidad celular

IV.5.3.1. Ensayo de proliferación celular (MTT)

Al pasar los tiempos de exposición con el tóxico 24 horas, se les retiro el medio a las células y se les añadió medio fresco para determinar mediante una curva de proliferación celular la concentración inhibitoria media (IC₅₀) por el método de MTT (Mossman, 1983).

Los ensayos fueron llevados a cabo añadiendo 10 µL de solución MTT 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. La enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas forman unos cristales coloreados de color azul (formazan), estos cristales se disuelven con 50 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.

IV.5.3.2 Diseño experimental para evaluar de la toxicidad del extracto de *Bucida buceras*

Se depositaron 25,000 cel/mL en placas de 96 pozos tratadas con los diferentes concentraciones del peróxido de hidrógeno tanto en pulso como en GOx, células con peróxido en presencia del extracto de *Bucida buceras* a una concentración de 1600, 1200, 1000, 800, 500, 250, 125 y 50 µg/mL, y células control (ausencia de peróxido y del extracto) fue evaluada la toxicidad del extracto a las 24 horas. Se seleccionó la concentración de 500 µg/mL de *Bucida buceras* como contraataque al agente oxidante así evitando muerte celular.

IV.5.3.3. Ensayo de inhibición del H₂O₂

La concentración de peróxido fue medida por la oxidación del hierro ferroso a férrico por el H₂O₂ que forma un complejo intensamente coloreado con el xilenol-naranja (ensayo de FOX).

Una alícuota (50 µL) de cada concentración de GOx con y sin co-tratamientos, fue retirada del cultivo después de 24 hrs y mezclados 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 H₂SO₄ (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 H₂O₂ (3.125 a 25 mM) y los resultados fueron expresados como mM ± desviación estándar.

IV.5.3.4. 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 µL de la proteína total extraída, y se colocaron en placa de 96 pozos. Se agregaron 250 µL 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.

IV.5.4. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para determinar el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

Se sembraron células ARPE-19 sobre una placa de 96 pozos a una densidad de 25,000 células por pozo bajo las diferentes condiciones experimentales para la inducción del estrés oxidativo por medio de pulso (500 y 125 µM) y GOx (10 y 2.5 mU/mL), con y sin la protección del extracto de *Bucida buceras* (500 µg/mL), y pozos control, esto por triplicado. Cada uno de estos para tres tiempos correspondientes (30, 90 y 120 minutos). El medio se recogió a determinado tiempo; 30, 90 o 120 minutos y se cuantificó la concentración de H₂O₂, a los pozos se les adicionó medio fresco y se dejó incubando hasta 24 hrs.

El VEGF secretado se midió con Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D System). Cada experimento incluyó 3 repeticiones, y al menos tres experimentos independientes se realizaron. Los resultados obtenidos de la regresión lineal de cada una de las curvas de calibración del factor fueron expresados en pg/mL.

El protocolo seguido fue el proporcionado por el proveedor el cual consiste en: se añadieron 50 μL de diluyente RD1W junto con 200 μL de muestra, para el caso de la curva se inició con una concentración de 1000 pg/mL realizando diluciones seriadas hasta llegar a 15.6 pg/mL. Se dejó reposar durante dos horas, se aspiró el contenido de cada pozo y fue lavado 3 veces con buffer de lavado, después se adicionaron 200 μL de conjugado, se incubó durante dos horas, seguido por aspiración y lavado tres veces con su buffer correspondiente. Se pusieron 200 μL de solución de sustrato y se incubó durante 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 50 μL de solución de parada (H_2SO_4 2N). Se leyó a una absorbancia de 450 nm y 570 nm. La sensibilidad del ensayo es de 5.0 pg/mL citado por el fabricante.

IV.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa NCSS (versión 2011). Todos los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA-GLM). Se llevó a cabo una prueba de Tukey para detectar las diferencias entre las medias, estableciéndose un nivel de confianza del 95 %. Las gráficas expresadas en los resultados fueron realizadas utilizando el software Origin 8.5 y las barras de errores representan la desviación estándar.

V. RESULTADOS

V.1 Cuantificación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos

V.1.1 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales de las distintas partes (tronco, tallo, hojas) de *Bucida buceras* en sus diferentes solventes (acetona, acuoso, etanol, metanol) fueron evaluados por el método de Folin-Ciocalteu, mostrando un rango que va desde los 286.78 hasta 654.13 μg EAG/mg de extracto (Figura 10). En este estudio el contenido de fenoles totales entre las tres partes de la planta difieren significativamente ($P \leq 0.05$). El mayor contenido de fenoles totales se encontró para el tallo (561.86 μg EAG/mg), seguido por la hoja (477.86 μg EAG/mg) con diferencia significativa y el menor valor se obtuvo para el tronco (425.23 μg EAG/mg) sin detectar diferencia significativa ($P > 0.05$) entre estas últimas partes.

Resulta interesante destacar que entre los extractos, la hoja acuoso (654.13 μg EAG/mg) y el tallo metanol (614.06 μg EAG/mg) tuvieron los contenidos máximos de polifenoles. Siendo precisamente los solventes agua y metanol los de mayor capacidad extractora. El orden de efectividad del solvente en la extracción de fenoles para la planta fue; acuoso (552.36 μg EAG/mg) \approx metanol (546.23 μg EAG/mg)^{ns} > etanol (472.03 μg EAG/mg)* > acetona (382.65 μg EAG/mg)*. El solvente acetona fue el que menor concentración de fenoles totales obtuvo para las tres partes de la planta, 286.78, 389.24 y 471.93 μg EAG/mg de extracto para hoja, tronco y tallo respectivamente.

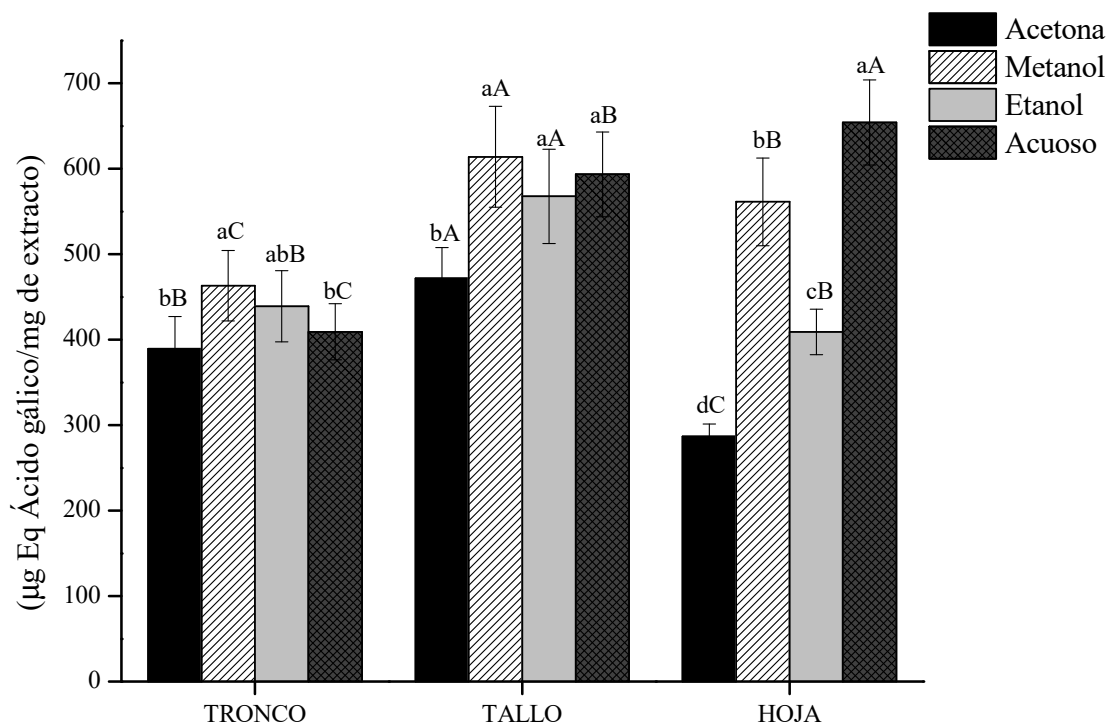


Figura 10. Contenido de fenoles totales en las muestras de *Bucida buceras* extraídos con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

V.1.2 Cuantificación de flavonoides

De los más de 8000 polifenoles alrededor de 4000 flavonoides han sido identificados. Los flavonoides son un grupo diverso y mayoritario de metabolitos secundarios perteneciente a los compuestos fenólicos que se dividen en diferentes subclases según su estructura química: flavonoles (doble enlace C₂-C₃, con un grupo hidroxilo en la posición 3 ej. Rutina, quercetina), flavonas (estructura básica doble enlace C₂-C₃), flavanonas (enlace simple C₂-C₃), flavanoles (enlace simple C₂-C₃, el anillo C es pirano ej. Catequinas), antocianidinas (el anillo C es pirano, enlaces 1-2 y 3-4 son insaturados), cumarinas (esculetina) e isoflavonoides, de los cuales

flavonas y flavonoles son los más diversos estructuralmente. El análisis de flavonoides de estructuras similares por métodos colorimétricos es capaz de detectar flavonas y flavonoles mediante un complejo estable con el cloruro de aluminio, mientras que flavanonas y flavanoles reaccionan mejor con el 2,4-dinitrofenilhidrazina. La suma de los contenidos determinados por los 2 métodos individuales representa el contenido total real de flavonoides.

V.1.2.1 Flavonoides cloruro de aluminio (AlCl₃) flavonas y flavonoles

El contenido de flavonoides principalmente el tipo flavonas y flavonoles donde el grupo ceto del C4 y el grupo hidroxilo del C3 o C5 respectivamente forman un complejo amarillo estable con el cloruro de aluminio fue evaluado en distintos extractos de *Bucida buceras*. La cantidad de flavonas/ flavonoles varió considerablemente según la parte y el tipo de solvente desde 24.00 hasta 314.44 µg EC/mg (Figura 11).

El tallo presentó un significativo alto nivel en un rango de concentración de 69.52-314.44 µg EC/mg según el solvente con una media de 218.76 µg EC/mg, ($P \leq 0.05$) comparado a la hoja (127.57 µg EC/mg) y al tronco (35.97 µg EC/mg). Se destaca en el tallo la gran acumulación de flavonoides alcanzando 6 veces la concentración respecto al tronco donde se obtuvo el contenido significativamente más bajo. Esta distribución de flavonoides según la parte anatómica de la planta está estrechamente relacionada al contenido de fenoles totales, donde se observó similar agrupamiento en su biosíntesis. El porcentaje de flavonas/ flavonoles respecto a los fenoles totales fue de 8, 27 y 39% para tronco, hoja y tallo respectivamente.

Al evaluarse el efecto del solvente sobre la extracción de este tipo de flavonoides se obtuvo que metanol y etanol fueron los mejores solventes. La capacidad extractora resultó significativa en el siguiente orden descendiente: metanol (174.80 µg EC/mg) ≈ etanol (157.00 µg EC/mg) > acetona (120.98 µg EC/mg) > acuoso (56.94 µg EC/mg). A diferencia de la extracción de fenoles totales en el cual el solvente más polar (agua) fue más efectivo para estos compuestos fenólicos, los solventes de mediana polaridad resultaron más eficientes. Sorprendente resultó que el agua tuvo los rendimientos más bajos en las diferentes partes de la planta. Este resultado apunta a que las flavonas/ flavonoles presentes en *Bucida buceras* pueden ser de mediana solubilidad.

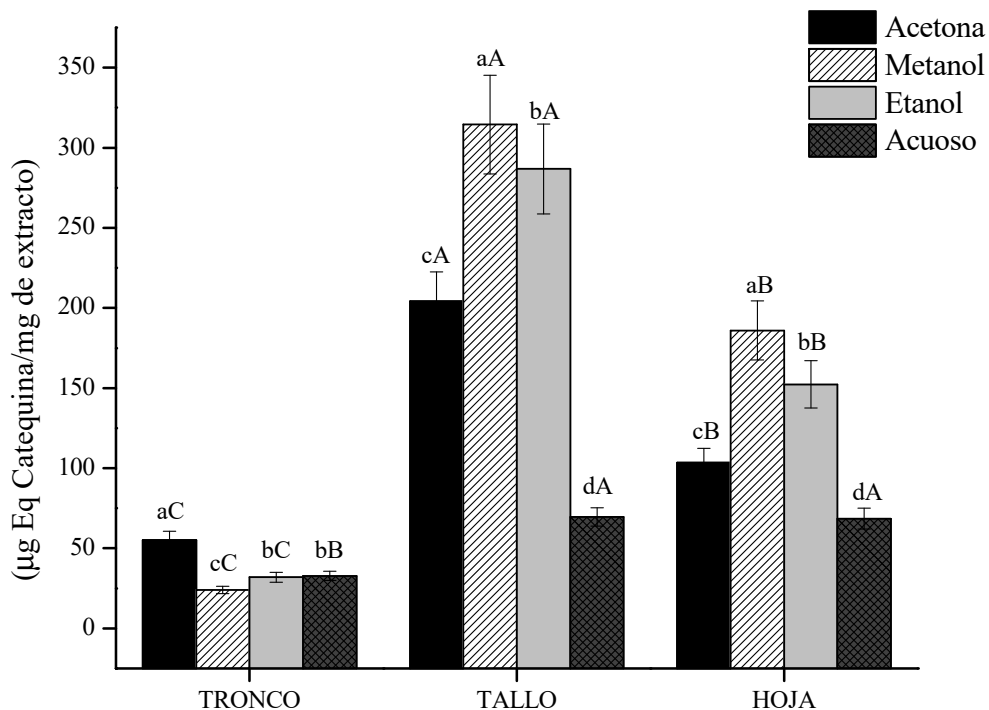


Figura 11. Contenido de flavonas y flavonoles en las muestras de *Bucida buceras* extraídos con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

Ciertas clases de polifenoles en plantas, tales como flavonoles, flavonas, isoflavonas y antocianinas son usualmente glucosiladas. La glucosilación influye en sus propiedades física, química y biológica, incluyendo la absorción y biodisponibilidad. Además está reportado que las agliconas de compuestos fenólicos (fenol sin azúcar) exhiben superior actividad antioxidante que sus glucósidos (Kim y Lee, 2004).

V.1.2.2 Flavonoides 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) flavanonas y flavanoles

Las cetonas y aldehídos reaccionan con el 2,4 dinitrofenilhidrazina para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona de color amarillo-naranja. Las flavanonas y flavanoles carentes del doble enlace C₂-C₃ forman hidrazonas y son fácilmente cuantificadas por este método. Las concentraciones de flavanonas y flavanoles en los diferentes extractos, se muestran en la figura 12. Los resultados indican diferencia significativa en el contenido en los distintos extractos variando desde 114.05 µg EN/mg hasta 228.75 µg EN/mg de extracto en hoja acetona y tronco acetona respectivamente. Al considerar el efecto de la acumulación de estos metabolitos según la parte anatómica de la planta se muestra que el tronco (175.06 µg EN/mg) y el tallo (150.67 µg EN/mg) presentaron las cantidades más elevadas ($P \leq 0.05$). Mientras la hoja (118.94 µg EN/mg) tuvo el menor contenido de este tipo de flavonoides con valores entre 114.05 -124.63 µg EN/mg en cada extracto.

Estos resultados claramente indican que la producción de estos metabolitos no está omnipresente en toda la planta, sino que su síntesis depende de la estructura anatómica de la planta. A diferencia del contenido de flavonas y flavonoles abundante en el tallo y escaso en el tronco. Los flavonoides del tipo flavanonas y flavanoles en el tronco fueron mayoritario alcanzando una relación 5:1 en relación a los flavonas y flavonoles. El porcentaje de flavanonas/flavanoles respecto a los fenoles totales fue de 25, 27 y 41% para hoja, tallo y tronco respectivamente ligeramente más elevado que el aporte dado por el grupo flavonas y flavonoles, lo que evidencia que los flavonoides tipo flavanonas y flavanoles son los principales flavonoides en *Bucida buceras*.

El efecto de diferentes solventes sobre el contenido de flavanonas y flavanoles presentes en *Bucida buceras* se muestra en la figura 12. Comparativamente la habilidad de extracción de los distintos solventes sigue el siguiente orden: acetona (168.79 µg EN/mg) > metanol (152.14 µg EN/mg) > acuoso (141.35 µg EN/mg) > etanol (130.59 µg EN/mg) ($P \leq 0.05$). A pesar de las diferencias en la capacidad extractora de los solventes sobre los 2 grupos de flavonoides se puede concluir que el metanol resultó el solvente más efectivo para extraer la mayor cantidad de estos compuestos. Por lo que podemos afirmar que los flavonoides presentes en esta planta son de polaridad media alta.

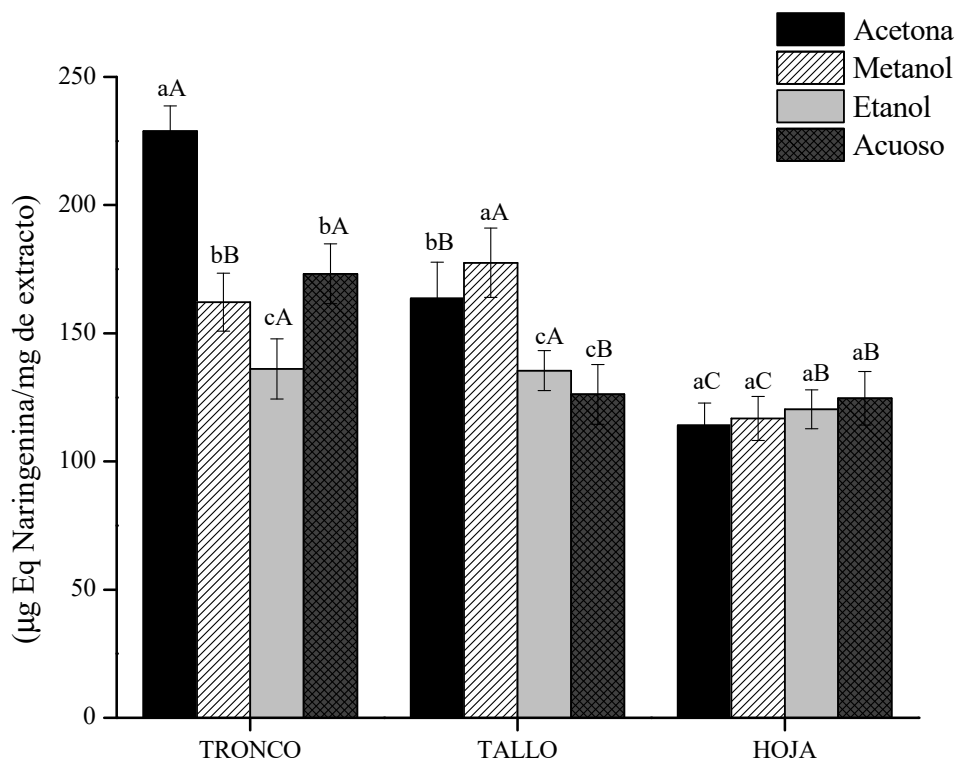


Figura 12. Contenido de flavanonas y flavanoles en las muestras de *Bucida buceras* extraídos con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p<0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

V.1.2.3 Flavonoides totales

En orden de encontrar la cantidad total de flavonoides en extractos de *Bucida buceras* se emplearon 2 métodos espectrofotométricos para la determinación de los dos grupos de flavonoides: flavonas/flavonoles ($AlCl_3$) y flavanonas/flavanoles (DNP). Siendo la cantidad real la suma de cada uno dado la contribución de cada grupo presente (Figura 13).

El contenido de flavonoides totales de los doce extractos analizados se encontró en un rango de 193.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto hasta 491.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto, obtenidos para metanol tallo

y acuoso hoja respectivamente. El tallo obtuvo los valores significativamente más altos de flavonoides totales (369.42 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P \leq 0.05$) correspondiendo el 59% a flavonas/flavonoles y el 41% a flavanonas/flavanoles.

En el caso de la hoja (246.51 $\mu\text{g}/\text{mg}$) el aporte de flavonas/flavonoles (127.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y de flavanonas/flavanoles (118.94 $\mu\text{g}/\text{mg}$) fue de casi el 50% para cada grupo de flavonoides. Sin embargo en el tronco (211.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$) los valores fueron significativamente menores y el 83% de estos compuestos fue de flavanonas/flavanoles.

A pesar de las distintas relaciones en las que se encuentra cada grupo de flavonoides en las diferentes partes de la planta podemos observar la importancia de cuantificar los flavonoides totales por ambos métodos. Aunque hay autores que consideran que los flavonoides totales resultan del obtenido solamente por el AlCl_3 , sin embargo en estos casos se estaría subestimando el contenido total.

La cantidad de flavonoides totales varió significativamente ($P \leq 0.05$) según el tipo de solvente empleado en las diferentes partes de la planta (Figura 13). Los resultados revelan que en sentido general metanol (326.95 $\mu\text{g}/\text{mg}$) fue el mejor solvente (principalmente en tallo y hoja), seguido de acetona (289.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y etanol (287.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$) sin diferencia significativa ($P > 0.05$). El solvente menos efectivo resultó ser el acuoso (198.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P \leq 0.05$). Aunque la extracción térmica con agua pudiera ser la responsable de alguna degradabilidad por efecto del calor sobre estos compuestos. Cada solvente posee diferente grado de polaridad que resulta en distinta fortaleza de extracción.

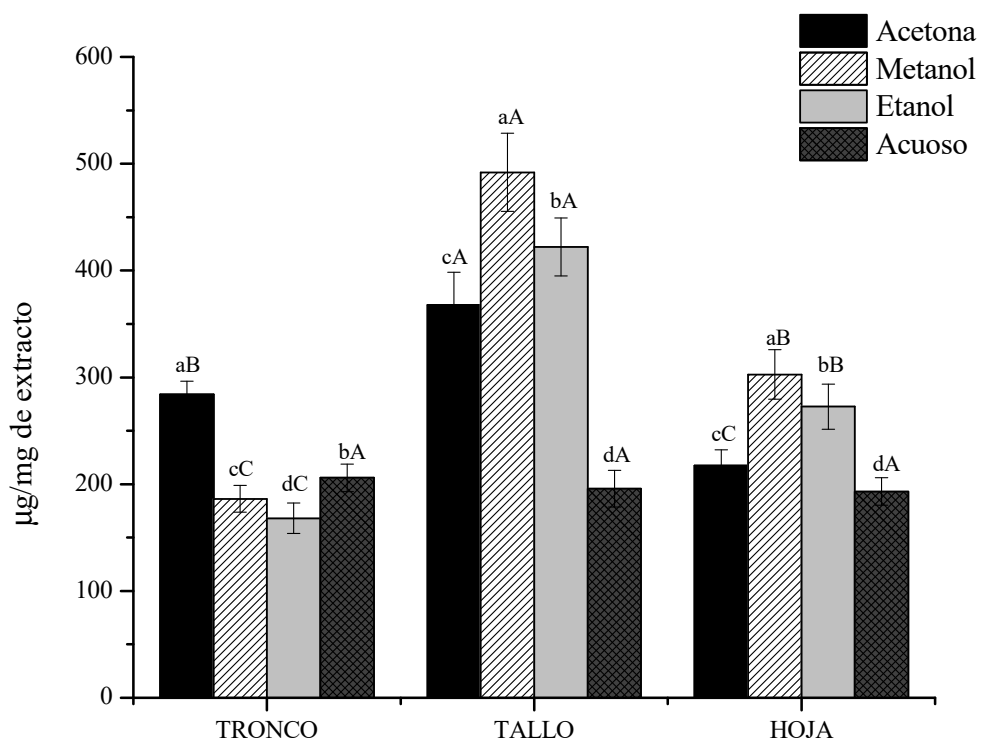


Figura 13. Contenido de flavonoides totales en las muestras de *Bucida buceras* extraídos con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo un mayor contenido de fenoles totales determinó un mayor nivel de flavonoides totales. El tallo tuvo un significativo alto nivel de polifenoles y de estos el 66% corresponde a los flavonoides. De igual forma en la hoja y tronco también se encontró una alta contribución con un 52 y 50% respectivamente de los flavonoides al contenido de fenoles totales.

Dentro de los compuestos fenólicos los flavonoides y los ácidos fenólicos son los mayoritarios y principales responsables de su actividad antioxidante. Para poder identificar y cuantificar estos compuestos se utiliza una cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa como abordaremos en detalle a continuación.

V.2 Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC

Para la identificación y cuantificación por HPLC, se seleccionó un solo extracto de cada una de las partes de la planta (hoja acuoso, tallo metanol, tronco metanol), para la selección se basó en el contenido de fenoles totales (Figura 10) y de flavonoides totales (Figura 13).

V.2.1 Validación del método cromatógrafo para la identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos.

Para la validación del método cromatográfico en la identificación y cuantificación de flavonoides se evaluaron varios parámetros de control de calidad: linealidad (ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (R^2)), sensibilidad (límite de detección), precisión intra e inter-día y exactitud (porcentaje de recuperación). La tabla 5 muestra los valores de los parámetros para cada analito a cuantificar.

Los resultados de la linealidad permiten afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado desde 7.81 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, con coeficientes de determinación (R^2) > 0.99. La precisión del estudio evaluada por la repetitividad de los valores del tiempo de retención y determinada por la dispersión de las medidas alrededor del valor medio mostró que la variabilidad intra-día e inter-día de flavonoides estuvo en el rango 0.65-5.74% y 4.98-10.76% respectivamente. Estos resultados claramente indican la alta reproducibilidad lograda empleando el método analítico desarrollado en esta metodología.

Tabla 10. Límite de detección, rango concentración, ecuación de regresión lineal, coeficiente de determinación (R^2), tiempo de retención (t_R), precisión (superíndice representa intradía y el subíndice al interdía) y exactitud para la cuantificación de flavonoides.

Analito	Sensibilidad ($\mu\text{g/mL}$) (Límite de detección)	Rango de concentració n ($\mu\text{g/mL}$)	Linealidad		t_R (minutos)	Precisión (Repetibilidad (C.V.)	Exactitud (%) de recuperación)
			Ecuación de regresión lineal	R^2			
Catequina	3,9	31.25-1000	$y = 155939x - 1089.2$	0.9981	11.74	$5.74/10.76$	324,2
Esculetina	0,97	7.81-500	$y = 612569x - 199.26$	0.9923	13.23	$1.03/5.78$	107,2
Rutina	1,95	15.62-500	$y = 320877x + 2742.3$	0.9979	25.40	$0.65/4.98$	120,7
Quercetina	0,97	7.81-500	$y = 437248x + 5369.1$	0.9923	28.99	$5.003/8.05$	122,3

Para el análisis de exactitud se empleó el método de recuperación. La recuperación fue llevada a cabo por adición de 0.5 mL de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla de los 4 estándares a 100 mg de cada extracto, extraída y analizada por HPLC como se describió en materiales y métodos. La recuperación se determinó independientemente 3 veces y estuvo en el rango satisfactorio de 100-120% para esculetina, rutina y quercetina con una desviación estándar menor de 10%. Particularmente en la catequina se obtuvieron porcentajes de recuperación inexplicablemente del 300%. La recuperación adecuada y la baja varianza fueron consideradas suficientes para determinar cuantitativamente los flavonoides en la planta.

Para la validación del método cromatógrafo en la cuantificación de ácidos fenólicos se evaluaron tres parámetros: linealidad del método, precisión y exactitud (porcentaje de recuperación). La Tabla 11 muestra los parámetros de control de calidad para cada analito a cuantificar.

Tabla 11. Rango de concentración, ecuación de regresión lineal, coeficiente de determinación (R^2) de los analitos a cuantificar, Tiempo de retención (t_R) precisión (superíndice representa intradía y el subíndice al interdía) y exactitud.

Analito	Rango de concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Linealidad		t_R (minutos)	Precisión (Repetibilidad) (C.V.)	Exactitud (%) de recuperación)
		Ecuación de regresión lineal	R^2			
Ác. Gálico	0.97-125	$y = 612959x + 1218.2$	0.9981	7.91	^{6.69} / _{10.23}	212,6
Ác. clorogénico	3.9-100	$y = 245434x - 1155.3$	0.997	17.18	^{3.96} / _{7.54}	0
Ác. cafeico	3.9-50	$y = 570673x + 3988.8$	0.997	19.09	^{3.46} / _{3.49}	182,9
Ác. cumárico	3.9-125	$y = 2E+06x - 803.22$	0.997	26.49	^{1.75} / _{1.86}	106,1
Ác. ferúlico	3.9-250	$y = 1E+06x - 6047$	0.996	27.56	^{2.31} / _{2.47}	124,5
Ác. sinápico	7.81-500	$y = 599072x - 4470$	0.998	27.88	^{2.67} / _{3.52}	82,0
Ác. cinámico	1.95-125	$y = 4E+06x - 3861.2$	0.995	31.68	^{2.09} / _{2.75}	91,3

Los resultados de la linealidad permiten afirmar que el método para la cuantificación de ácidos fenólicos es lineal en el intervalo de concentración de 0.975 a 500 $\mu\text{g/mL}$ con coeficientes de determinación (R^2) > 0.99 . De la Tabla 11 se observa que los porcentos de variabilidad con relación al tiempo de elución de cada ácido fenólico fue $< 5\%$, con excepción del ácido gálico donde la repetibilidad intra e interdía fue de 7 y 10% respectivamente. Por lo que podemos referir que la cuantificación de estos compuestos por la metodología usada es confiable.

Otro parámetro de interés para la cuantificación por HPLC es la exactitud del método donde se evalúan criterios del método de extracción y de cuantificación. Esto se mide a través del porcentaje de recuperación a partir de una muestra de extracto con y sin adición de los estándares y que se somete a todo el proceso. Como se observa en tabla 11 el porcentaje de recuperación fue adecuado en un rango de 80-120% para los ácidos sinápico, cinámico, cumárico y ferúlico. El ácido gálico tuvo una recuperación del 200%. Sin embargo, el método no fue capaz de recuperar el ácido clorogénico (0%) y el ácido cafeico se recuperó en un 182.9%. Este resultado pudiera explicarse debido a la hidrólisis del ácido clorogénico (ácido cafeoilquínico) que estructuralmente es un derivado dicarboxílico del ácido cafeico (Figura 9) y por consiguiente el aumento al doble de la cuantificación para este último ácido.

V.2.2 Identificación y cuantificación por HPLC de flavonoides y ácidos fenólicos en las muestras de *Bucida buceras*.

La siguiente Figura 14 muestra un perfil típico de un cromatograma con los tiempos de retención para cada estándar de flavonoide a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. Los flavonoides fueron eluidos con tiempos de retención (t_R) promedios de 11.74 ± 0.11 min catequina, 13.23 ± 0.09 min esculetina, 25.40 ± 0.11 min rutina y por último 28.99 ± 0.05 min para quercetina. Como se observa las características estructurales de estos compuestos determinan la afinidad por la fase móvil o estacionaria facilitando la separación y elución de los mismos (Figura 14). La catequina (flavanol) y esculetina (cumarina) con tiempos de retenciones muy cercanos son los flavonoides más polares que eluyen primero en la fase móvil. Seguido eluye rutina (ramnoglucósido de la quercetina) y finalmente la quercetina (aglicona o sin azúcar 1-3-3'-4'-tetraoxiflavanol) es el compuesto menos polar (más retenido

por la fase estacionaria C₁₈ apolar) con el mayor tiempo de retención. Las formas glucosídicas de flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas son más polares que sus respectivas formas agliconas (Figura 14).

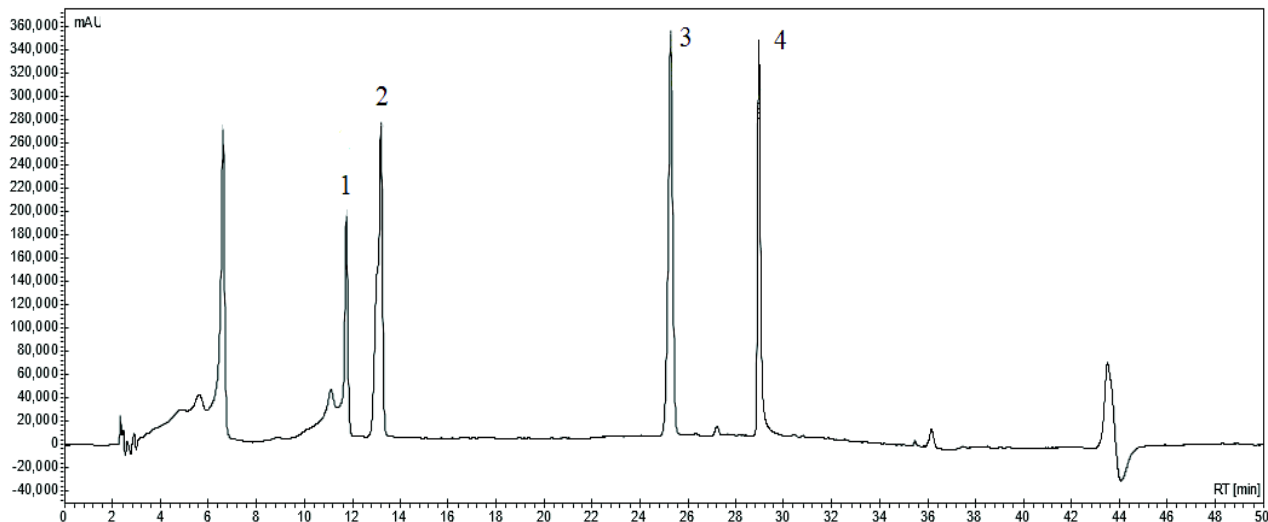


Figura 14. Cromatograma de la mezcla de estándares y tiempos de elución. (1) catequina, (2) esculetina, (3) rutina y (4) quercetina a 280 nm.

Son escasos los estudios que han caracterizado la composición fenólica en *Bucida buceras*. Los cromatogramas de los flavonoides identificados en las muestras de *Bucida buceras* se presentan en la Figura 15. El análisis por HPLC de los extractos de hoja, tallo y tronco muestran una considerable variación en los compuestos fenólicos entre las diferentes partes. Se pudieron identificar y cuantificar: catequina, esculetina, rutina y quercetina en las tres muestras. Esto se logró comparando los tiempos de retención de cada área del pico de las muestras a identificar con los estándares puros en los cromatogramas.

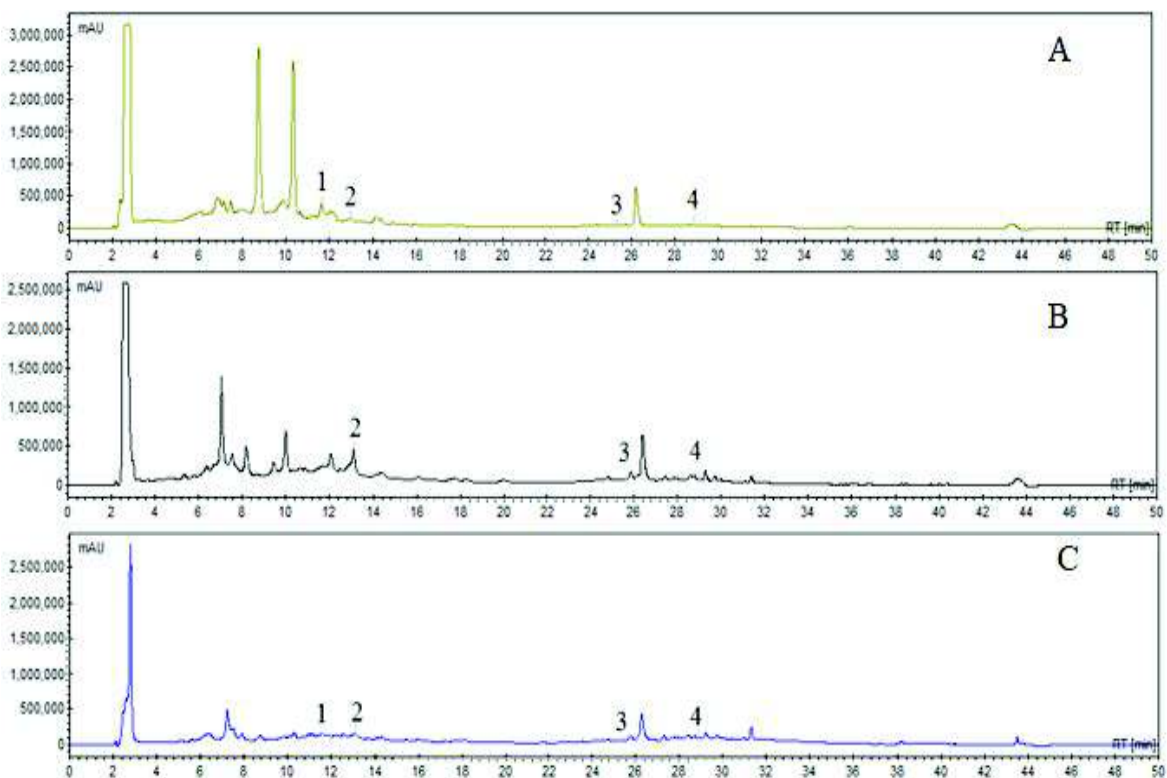


Figura 15. Cromatograma de flavonoides en las muestras de *Bucida buceras*. A) Hoja B) Tallo C) Tronco de *Bucida buceras* (1) Catequina (2) Esculetina (3) Rutina (4) Quercetina

La separación de los flavonoides se muestra en la Figura 15. El panel superior (A) de la figura muestra el extracto de hoja acuoso. Los cromatogramas del medio (B) e inferior (C) muestran el tallo y tronco en metanol respectivamente. El cromatograma obtenido para la hoja acuoso (A) muestra 4 picos que permiten la identificación de catequina, esculetina, rutina y quercetina a partir de la comparación de sus espectros UV y tiempos de retención con sus estándares. Además se detectaron 3 picos principales desconocidos con t_R de 2.87, 7.85 y 9.27 min que posiblemente sean los responsables de la gran cantidad de flavonoides totales cuantificados espectrofotométricamente.

Comparado con la hoja se observa que en el cromatograma del tallo (B) también se identificó la presencia de catequina, esculetina, rutina y quercetina. Particularmente el pico de esculetina con un t_R de 13.07 min alcanzó la mayor altura (mayor área) en relación a hoja y tronco, lo que indica un mayor contenido de este compuesto. Sin embargo, los picos

desconocidos de 7.85 y 9.27 min disminuyeron 10 veces lo que representa una menor cantidad de estos compuestos fenólicos en el tallo.

El perfil cromatográfico en el tronco (C) resultó el de menor cantidad de picos detectados, aunque se pudieron detectar las señales de los 4 estándares evaluados (catequina, esculetina, rutina y quercetina). Estos resultados se corresponden con los bajos contenidos de fenoles y flavonoides totales cuantificados espectrofotométricamente.

Además de la identificación de flavonoides se determinó las cantidades de ácidos fenólicos en las diferentes partes de *Bucida buceras*. Los ácidos fenólicos constituyen alrededor de 1/3 de los fenoles y consisten de dos subgrupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Usando HPLC-FR se identificaron por comparación de los tiempos de retención y espectros UV cada uno de los ácidos fenólicos en el siguiente orden de elución según sus tiempos de retención: ácido gálico ($t_R=7.91$ min), ácido clorogénico ($t_R=17.18$ min), ácido cafeico ($t_R=19.09$ min), ácido cumárico ($t_R=26.49$ min), ácido ferúlico ($t_R=27.56$ min), ácido sinápico ($t_R=27.88$ min) y ácido cinámico ($t_R=31.68$ min) como se observa en la Figura 16.

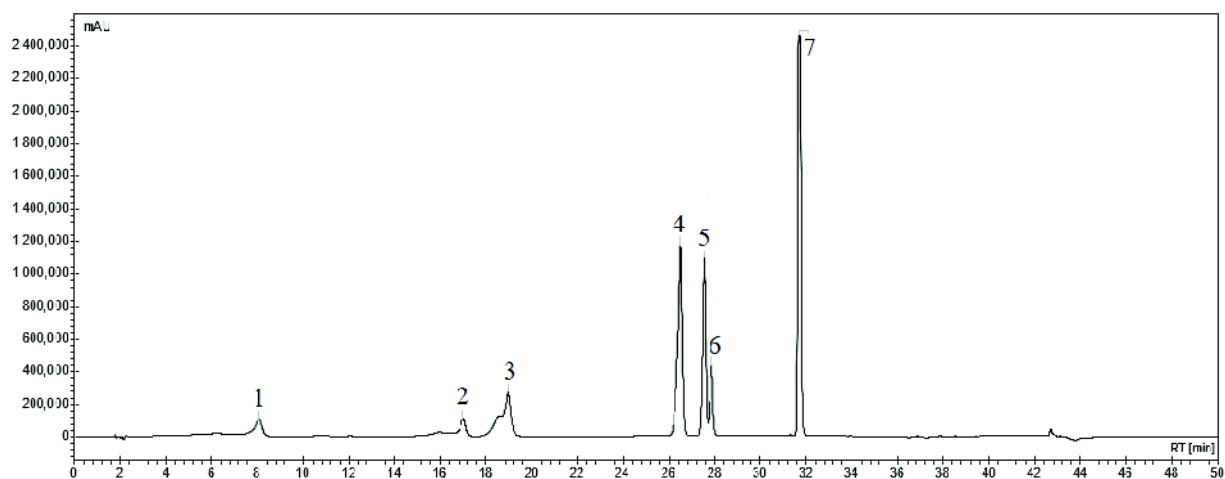


Figura 16. Cromatograma de la mezcla de estándares y tiempos de elución (1) Ácido Gálico (2) Ácido Clorogénico (3) Ácido Cafeico (4) Ácido Cumárico (5) Ácido Ferúlico (6) Ácido Sinápico (7) Ácido Cinámico.

Los ácidos hidroxibenzoicos tienen en común la estructura química C₆-C₁ (Figura 17) El ácido gálico perteneciente a este grupo posee 3 grupos hidroxilos (OH) en posiciones 3, 4 y 5 que le confieren una alta polaridad, por lo cual eluye con facilidad ($t_R=7.91$ min) en la fase móvil polar. Por otra parte, los ácidos hidroxicinámicos (C₆-C₃) fueron eluidos con tiempos de retención entre 17 y 32 min. Estos compuestos aromáticos tienen una cadena lateral de tres carbonos con un doble enlace responsable de una menor polaridad y mayor retención por la fase estacionaria apolar según la estructura química de cada ácido fenólico (Figura 17).

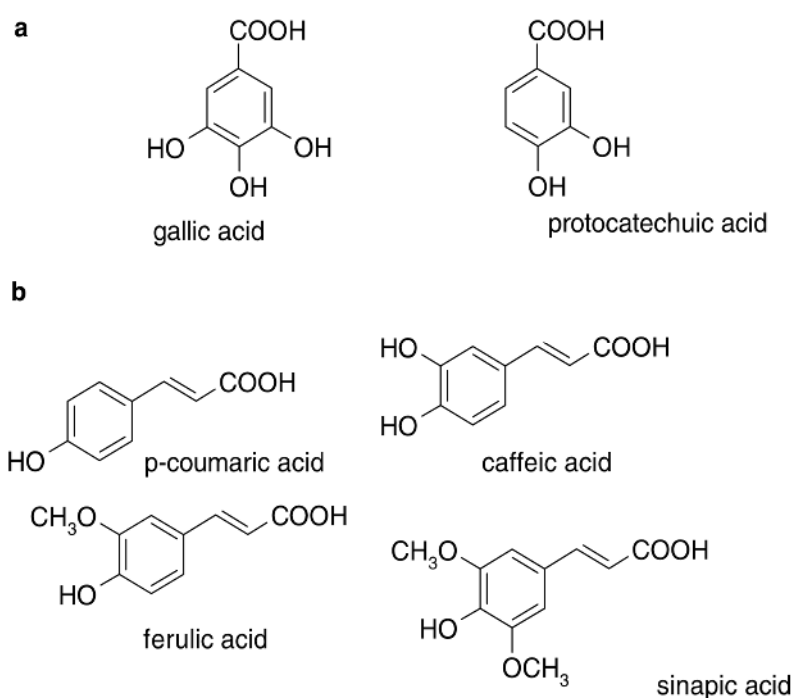


Figura 17. Estructuras químicas de ácidos hidroxibenzoicos (a) y ácidos hidroxicinámicos (b).

Como se observa de las estructuras químicas (Figura 17) los cambios estructurales por diferentes sustituciones y adiciones de grupos hidroxilos (OH) o metoxilos (OCH₃) conlleva a la separación de los ácidos fenólicos (Figura 17). El ácido clorogénico (ácido cafeoilquinico) es un derivado dicarboxílico con 3 grupos OH adicionales a un cicloalcano eluyó ≈ 2 min antes que el ácido cafeico dado a su mayor afinidad (más polar) por la fase móvil. De igual forma podemos ver un retardo de 7 min entre el ácido cafeico y el ácido cumárico producto de la eliminación de un OH, lo que disminuye su polaridad (mayor t_R). Además la sustitución

de un grupo OH del ácido cafeico por un grupo OCH₃ del ácido ferúlico aumentó en 8 min la elución de este último ácido. A pesar de que todos estos ácidos pertenecen a los derivados del ácido cinámico, a este le correspondió el mayor tiempo de retención ($t_R = 31.68$ min). Lo cual viene dado porque estructuralmente no hay grupo OH que favorezca la polaridad, unido a un gradiente de la fase móvil menos polar.

La separación e identificación de los ácidos fenólicos en *Bucida buceras* se muestra en la Figura 18. El panel superior (A) de la figura muestra el extracto de hoja acuoso. El cromatograma intermedio (B) e inferior (C) muestra al tallo y tronco en metanol respectivamente.

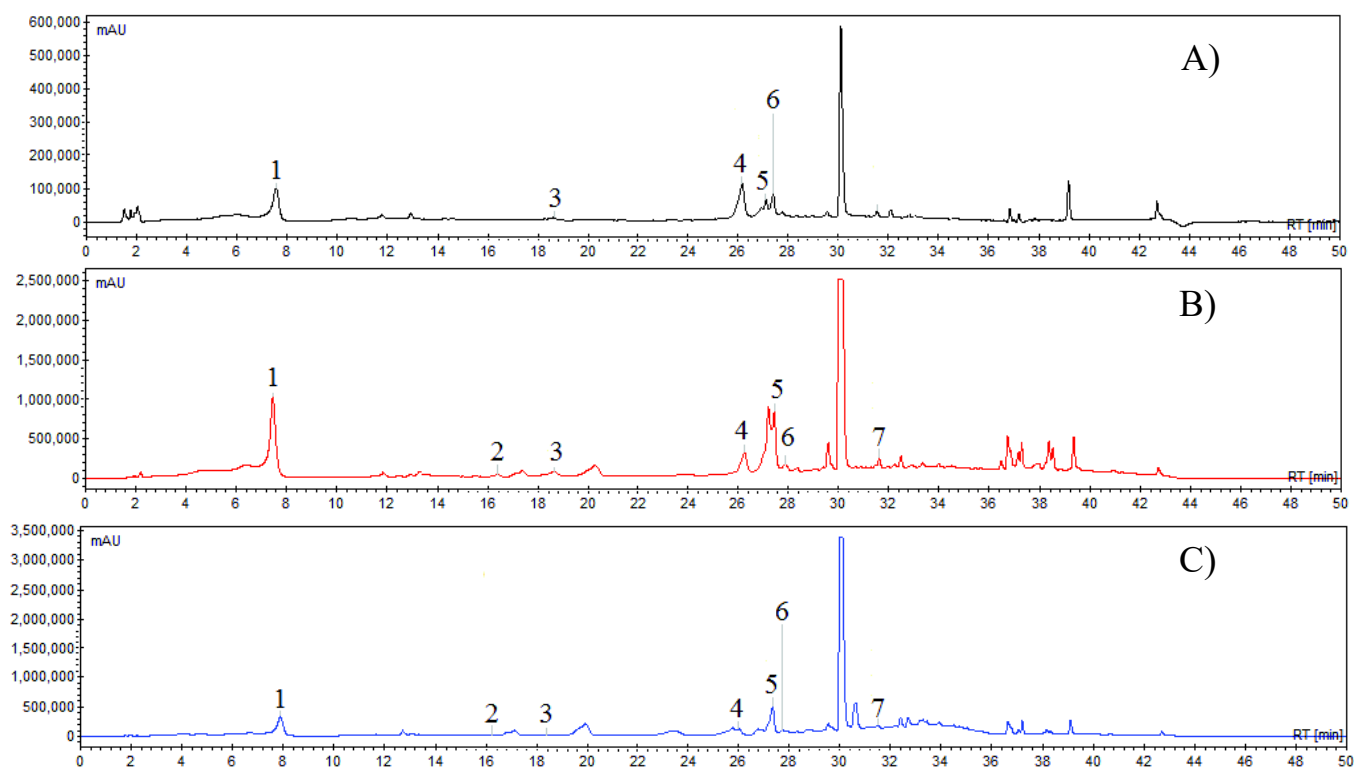


Figura 18. Ácidos fenólicos A) Hoja B) Tallo C) Tronco (1) Ácido Gálico (2) Ácido Clorogénico (3) Ácido Cafeico (4) Ácido Cumárico (5) Ácido Ferúlico (6) Ácido Sinápico (7) Ácido Cinámico

Se pudieron identificar y cuantificar los 7 ácidos fenólicos evaluados: ácido gálico, clorogénico, cafeico, cumárico, ferúlico, sinápico y cinámico en hoja, tallo y tronco, y un pico desconocido mayoritario (≈ 30 min) abundante en tallo y tronco esto se logró

comparando sus tiempos de retención con los de sus estándares puros y el área de pico en los cromatogramas de las muestras con sus dichos estándares.

La cuantificación de los diferentes flavonoides y ácidos fenólicos identificados en las muestras de *Bucida buceras* en sus diferentes partes se resume en la Tabla 12. Estos valores se obtuvieron por interpolación de la integración del área bajo la curva de los diferentes picos identificados en sus respectivas ecuaciones de regresión lineal de las curvas de calibración.

Tabla 12. Contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en las muestras de *Bucida buceras*. Simbología: (a), no detectado; (T), trazas. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa (p<0.05) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes (p<0.05) en el mismo solvente para diferente parte de la planta.

Flavonoides								
Muestras (mg/g extracto)	Catequina	Esculetina	Rutina	Quercetina	Total			
Tronco	23.45 ^{aA} \pm 1.53	6.61 ^{eB} \pm 0.53	T	T	30.06			
Tallo	35.67 ^{bA} \pm 1.8	28.12 ^{aB} \pm 1.04	2.40 ^{aD} \pm 0.13	T	66.19			
Hoja	73.97 ^{aA} \pm 6.58	11.53 ^{bC} \pm 0.47	0.90 ^{bD} \pm 0.13	T	86.4			
Total	133.09	46.26	3.3	T	182.65			
Ácidos Fenólicos								
Muestras (mg/g extracto)	Ácido gálico	Clorogénico	Cafeico	Cumárico	Ferúlico	Sinápico	Cinámico	Total
Tronco	5.36 ^{bB} \pm 0.54	0.0837 ^{bB} \pm 0.00	0.0279 ^{bC} \pm 0.00	0.1235 ^{aA} \pm 0.01	0.1395 ^{cA} \pm 0.01	0.0852 ^{eB} \pm 0.00	0.0176 ^{cC} \pm 0.00	5.83
Tallo	7.24 ^{bC} \pm 0.60	0.2199 ^{aBC} \pm 0.0	0.129 ^{aE} \pm 0.01	0.199 ^{bC} \pm 0.02	0.596 ^{bA} \pm 0.06	0.26 ^{aB} \pm 0.02	0.028 ^{bD} \pm 0.00	8.67
Hoja	25.80 ^{aB} \pm 2.3	0.113 ^{bC} \pm 0.00	0.035 ^{bD} \pm 0.00	0.08 ^{cC} \pm 0.00	0.783 ^{aA} \pm 0.06	0.213 ^{bB} \pm 0.02	0.035 ^{aD} \pm 0.00	27.05
Total	38.4	0.4166	0.1919	0.4025	1.5185	0.5582	0.0806	41.55

El flavonoide con mayor cuantificación fue catequina con 133.09 mg/g de extracto, en un rango de concentración de 23.45 a 73.97 mg/g en tronco y hoja respectivamente. La catequina resultó el flavonoide más abundante en las tres partes de la planta. Dentro del grupo de flavanoles/flavanona cuantificado por DNP (Figura 12) podemos decir que el 30% es de catequina. El alto contenido de este compuesto en las hojas de *Bucida buceras* concuerda con la abundancia de este metabolito en las hojas del té verde (*Camellia sinensis*).

La esculetina fue también cuantificada en alta concentración (46.26 mg/g) en cantidades de 6.61 a 28.12 mg/g en tronco y tallo respectivamente. El tallo fue la parte con mayor cantidad de esculetina.

Los flavonoles rutina y quercetina fueron encontrados en cantidades mínimas dentro de los flavonoides. Particularmente la rutina, el glucósido de quercetina fue encontrada en mayor concentración en el tallo (2.40 mg/g) alcanzando el 70% de la acumulación de este metabolito y solo en trazas en el tronco. Estos resultados concuerdan con lo cuantificado espectrofotométricamente por el método de $AlCl_3$, en el cual el tallo presentó el contenido más alto de flavonas/flavonoles, mientras el tronco tuvo 6 veces menos. Por otro lado, quercetina la aglicona (flavonol sin azúcar) fue encontrada en niveles muy bajos (trazas) en tallo, tronco y hoja (Tabla 12).

Como puede ser concluido del análisis cromatográfico la distribución de flavonoides depende de la estructura anatómica de la planta. El mayor contenido de compuestos fenólicos identificados se obtuvo en la hoja con un valor de 112.2 mg/g de extracto, mientras el tronco solo alcanzó 35.42 mg/g. El flavanol catequina fue encontrado como el principal flavonoides en las diferentes partes de la planta.

Los ácidos fenólicos en *Bucida buceras* estuvieron cuantificados en menor cantidad que los flavonoides, sin embargo se logró identificar un mayor número de estos polifenoles. El ácido gálico fue el principal compuesto con un contenido total de 38.4 mg/g (92% del total), teniendo una cantidad significativamente mayor la hoja (25.80 mg/g, $P \leq 0.05$). Entre tallo (7.24 mg/g) y tronco (5.36 mg/g) no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) y las concentraciones fueron mucho menor. Los ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, cumárico, ferúlico, sinápico y cinámico) se encontraron en un rango de 0.0806 a 1.518 mg/g representando el 8% del total de los ácidos fenólicos. El orden decreciente de ácidos fenólicos

en *Bucida buceras* fue: ácido gálico>> ácido ferúlico>ácido sinápico≈ ácido clorogénico≈ ácido cumárico >ácido cafeico > ácido cinámico.

Generalmente los ácidos fenólicos hidroxicinámicos obtuvieron la mayor cuantificación en el tallo con 1.21 mg/g de extracto seguido de hoja con 1.146 mg/g de extracto y la menor se encontró en tronco con un valor de 0.3937 mg/g de extracto.

V.3 Evaluación de la Actividad Antioxidante

Diversos estudios han reportado que cambios en la polaridad del solvente transforman la capacidad de extraer grupos específicos de compuestos antioxidantes que pueden afectar la capacidad antioxidante dado que compuestos antioxidantes de varias polaridades pueden existir en las plantas. Los compuestos fenólicos en *Bucida buceras* son considerados como los compuestos antioxidantes más importantes dado a su elevada capacidad y amplia distribución. Los compuestos fenólicos exhiben su actividad antioxidante mediante varios mecanismos tales como: donación de átomos de hidrógeno, secuestro de especies reactivas (OH[•], O₂^{•-}, NO, H₂O₂) o por unión a metales de transición especialmente el hierro y cobre.

Debido a los múltiples mecanismos de reacción y diferentes fases de los reaccionantes no hay un método simple y universal que pueda medir exacta y cuantitativamente la capacidad antioxidante total en un sistema complejo. Por consiguiente, es necesario incluir varios métodos para cubrir las propiedades de tan complejo grupo de compuestos.

V.3.1 Capacidad de secuestro del radical libre DPPH•

El poder de secuestro del radical libre DPPH, el cual contiene un electrón impar responsable de la absorbancia a 517 nm y del visible color morado oscuro, fue conducido para evaluar la actividad antioxidante. Los diferentes extractos exhibieron una significativa inhibición de la actividad del control DPPH dependiente de la concentración. Como se observa en la Figura 19 el efecto de inhibición medio (IC₅₀) del radical de DPPH varió entre 6.43 y 24.09 µg/mL. En este caso mientras más pequeño es el valor, mayor es su capacidad antioxidante debido a que menor cantidad de muestra es requerida para lograr la decoloración del 50% del control

DPPH. En este trabajo se pudo comprobar el fuerte poder antioxidante que presenta la planta *Bucida buceras*.

Los doce extractos fueron analizados en un rango de 5 a 25 µg/mL. Los datos obtenidos en este estudio revelaron que la mayor actividad anti-radical se obtuvo en el tallo (7.61 µg/mL), seguido de la hoja (9.56 µg/mL, $P > 0.05$) y por último el tronco (17.29 a 24.08 µg/mL, $P \leq 0.05$). La actividad de secuestro del radical DPPH está en correspondencia con el contenido de fenoles y flavonoides totales, obteniéndose valores de correlación de Pearson altamente significativos de -0.565 y -0.434 respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Correlación de Pearson, entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Tratamiento						
Tratamiento	Fenoles Totales	Flavonoides Totales	Flavonoides AICI3	Flavonoides DNP	DPPH	FRAP
Fenoles Totales		0,269**	0,3054**	-0,1293NS	-0,5652**	0,8267**
Flavonoides Totales	0,269**		0,7282**	0,1647NS	-0,4343**	-0,0067NS
Flavonoides AICI3	0,3054**	0,7282**		-0,5561**	-0,7329**	0,1055NS
Flavonoides DNP	-0,1293NS	0,1647NS	-0,5561**		0,5976**	-0,1586NS
DPPH	-0,5652**	-0,4343**	-0,7329**	0,5976**		-0,4103*
FRAP	0,8267**	-0,0067NS	0,1055NS	-0,1586NS	-0,4103*	

Dado que la capacidad extractora de los compuestos antioxidantes depende de la polaridad del medio de extracción, se observó una fuerte dependencia de la actividad antioxidante al tipo de solvente empleado (Figura 19). Similar al comportamiento que se obtuvo para los compuestos fenólicos. En la planta los extractos obtenidos con solvente metanol y acuoso presentaron superior actividad antioxidante (10.78 y 11.01 µg/mL) comparado con la acetona (14.62 µg/mL, Tukey, $P < 0.05$) donde se extrajo menor cantidad de fenoles y por consiguiente una más pobre actividad antioxidante. Aunque es una actividad antioxidante potente comparada al control ácido ascórbico (vitamina C): 12.5 µg/mL.

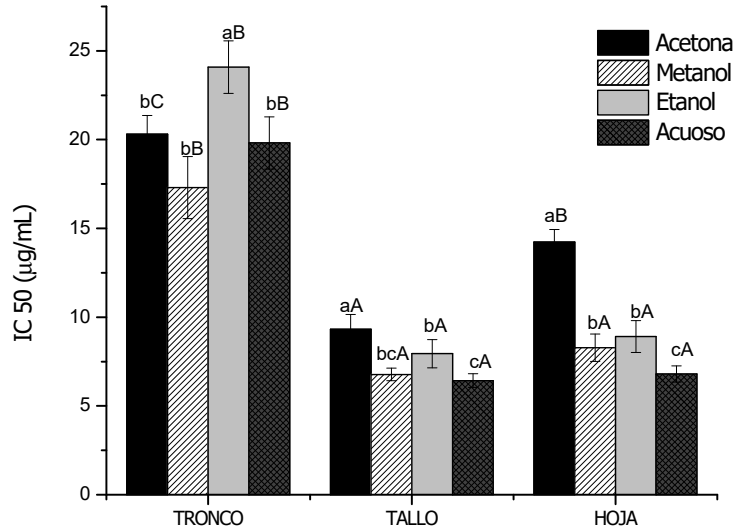


Figura 19. Capacidad de secuestro del radical libre DPPH• de las muestras *Bucida buceras* extraídos con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

V. 3.2. Ensayo del poder reductor del hierro férrico (FRAP)

La capacidad antioxidante total es la mejor vía de representar los efectos combinados de fenoles y otros compuestos reductores en los extractos de plantas y es expresado en términos de equivalentes de ácido ascórbico (μM EAA). El poder reductor del hierro férrico (FRAP) fue estimado por su habilidad para reducir el TPTZ-Fe(III) a TPTZ-Fe(II) con la aparición de un color azul intenso según sea la capacidad antioxidante. Al igual que el ensayo de secuestro del radical de DPPH ambos métodos miden la habilidad del potencial antioxidante para transferir 1 electrón y reducir radicales, carbonilo, metales; el cual usa el cambio de color del oxidante como indicador del punto final.

El poder reductor de los diferentes extractos exhibió una actividad dependiente de la concentración, los valores estuvieron en un rango entre 1969.39 a 4844.44 μM EAA/mg de extracto (Figura 20). La contribución de la parte anatómica de la planta al poder reductor mostró que el tallo presentó los valores más altos de actividad antioxidante 3860.19 μM

EAA/mg, seguido de la hoja (3298.05 μM EAA/mg Tukey $P < 0.05$). Presentando el tronco (3030.23 μM EAA/mg) el poder reductor (actividad antioxidante) más bajo.

Estos resultados concuerdan con los contenidos de fenoles y flavonoides totales cuantificados en esta planta donde se encontró una alta y positiva correlación de Pearson (Tabla 13) entre el FRAP vs. fenoles totales ($r=0.827$). Estudios científicos han establecido que los fenoles son los principales compuestos en las plantas con actividad antioxidante derivado de su propia habilidad redox. Los compuestos fenólicos son una clase de agentes antioxidantes, los cuales pueden secuestrar y neutralizar radicales libres. Los flavonoides y flavonoles poseen capacidad antioxidante como resultado de su naturaleza secuestradora y propiedades quelantes (Florence *et al.*, 2011; Iloki *et al.*, 2015).

El poder reductor (FRAP) correlacionó negativa y significativamente con la actividad anti-radical (DPPH) ($r= -0.410$). Como se muestra en las Figuras 19 mientras más pequeño es el IC_{50} (actividad de secuestro del DPPH) más alto es el valor del FRAP, siendo más potente el extracto como antioxidante. De manera general, se demuestra que la actividad antioxidante según la parte presenta la siguiente fortaleza: tallo > hoja > tronco.

A partir de la Figura 20 podemos destacar que el tipo de solvente empleado contribuye de forma particular con el poder reductor en los diferentes extractos. Los solventes acuoso y etanol mostraron el poder reductor significativamente más elevado (3811.18 y 3612.21 μM EAA/mg respectivamente) con respecto a acetona (2668.56 μM EAA/mg, Tukey $P < 0.05$). Este comportamiento pudiera estar relacionado con la presencia de compuestos fenólicos más polares en la planta los que aportan una mayor actividad antioxidante para estos solventes.

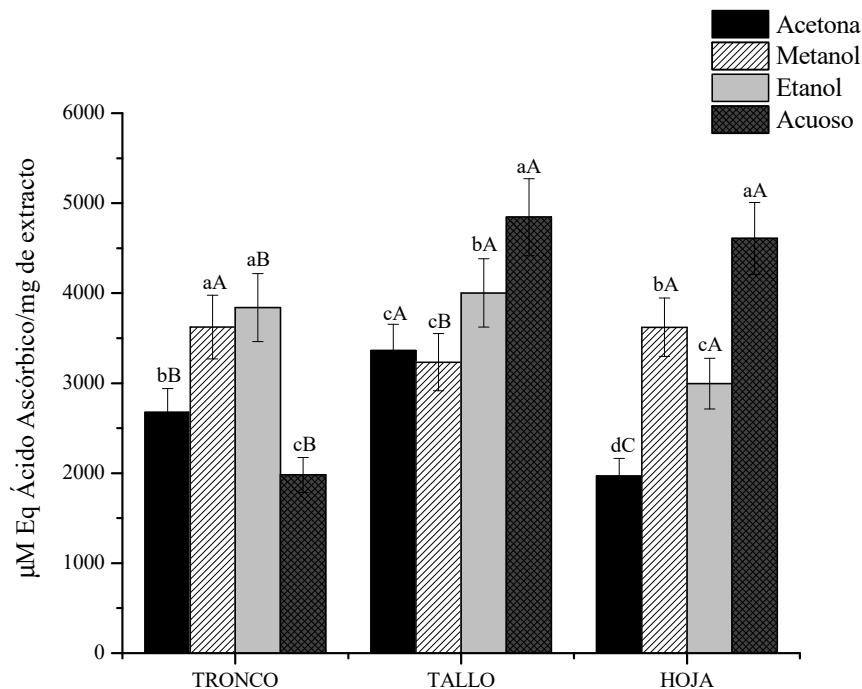


Figura 20. Capacidad antioxidante evaluada por el poder reductor FRAP de las muestras *Bucida buceras* extraído con diferentes solventes. Los valores representan la media \pm DE (n=3). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la misma parte de la planta en diferente solvente. Valores con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en el mismo solvente para parte de la planta.

V.4 Capacidad Retinoprotectora de *Bucida buceras*

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 retrolental, degeneración macular senil y varias formas de retinopatía: retinopatía diabética y pigmentaria). 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.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre cultivos celulares es un modelo comúnmente empleado para evaluar la susceptibilidad al estrés oxidativo o la eficiencia de antioxidante en diferentes tipos de células que están en riesgo alto de daño oxidativo, tales como las células del epitelio pigmentario de la retina. 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 con el propósito de investigar la respuesta celular al estrés oxidativo como puede ocurrir naturalmente en condiciones de patologías crónicas. Aunque el método acoplado a una enzima/sustrato (GOx) permite la generación extracelular continua del H_2O_2 como una alternativa a la inestabilidad de los tratamientos en pulso.

Diversas anomalías, tanto en la estructura como en la función secretora del EPR se han encontrado relacionadas con patologías de la retina. La degeneración retiniana se define como el deterioro de la retina causado por la muerte progresiva de sus células. Por lo general, en condiciones naturales existe un equilibrio entre las moléculas promotoras y las inhibidoras de la angiogénesis. Sin embargo, cuando estas condiciones son alteradas, como sucede durante los episodios de hipoxia, estrés oxidativo o inflamación, este equilibrio se rompe inclinando la balanza hacia la formación de vasos anormales. La angiogénesis patológica en el ojo puede conducir a un deterioro visual grave. La terapia antiangiogénica como un nuevo enfoque en el tratamiento de las enfermedades de neovascularización retiniana y coroidea va encaminada a la inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) (citocina soluble que favorece la angiogénesis y aumenta la permeabilidad vascular) desempeñando un papel importante en la formación de neovasos, por lo que distintos fármacos van dirigidos contra el VEGF.

V.4.1 Efecto retino-protector de *Bucida buceras* a la muerte celular inducida por el estrés oxidativo con H_2O_2 .

En este estudio la adición de H_2O_2 fue usado para inducir el estrés oxidativo en células ARPE-19. Después de 24 h de incubación con H_2O_2 la viabilidad fue reducida de una manera dependiente de la concentración del oxidante (Figura 21). A una concentración $\approx 1000\mu M$ 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 $\mu g/mL$ no comprometen la viabilidad celular del cultivo (Figura 20 inserto) por la baja toxicidad presentada hasta la concentración de 1600 $\mu g/mL$.

La Figura 21 muestra que co-tratamientos con el antioxidante puede atenuar la muerte celular inducida por el H_2O_2 principalmente en las concentraciones de 1200 y 1600 μM

lográndose casi un 20% de incremento en la proliferación celular en las concentraciones de mayor toxicidad con recuperación en la morfología celular (A). Similar resultado fue obtenido para los tratamientos con GOx (Figura 21 B) sobre la disminución de la concentración de H₂O₂ por generación con GOx bajo tratamiento con *Bucida buceras* y por consiguiente menor efecto tóxico sobre las células de retina (ARPE-19). Estos resultados apuntan al efecto retino-protector ejercido por *Bucida buceras* inducido a un reto oxidativo.

El cambio significativo en la morfología celular con el aumento de los niveles de H₂O₂ 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 (Figura 20 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 H₂O₂. 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 H₂O₂ 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 µM o 50 mU/mL de GOx (Figura 20 B).

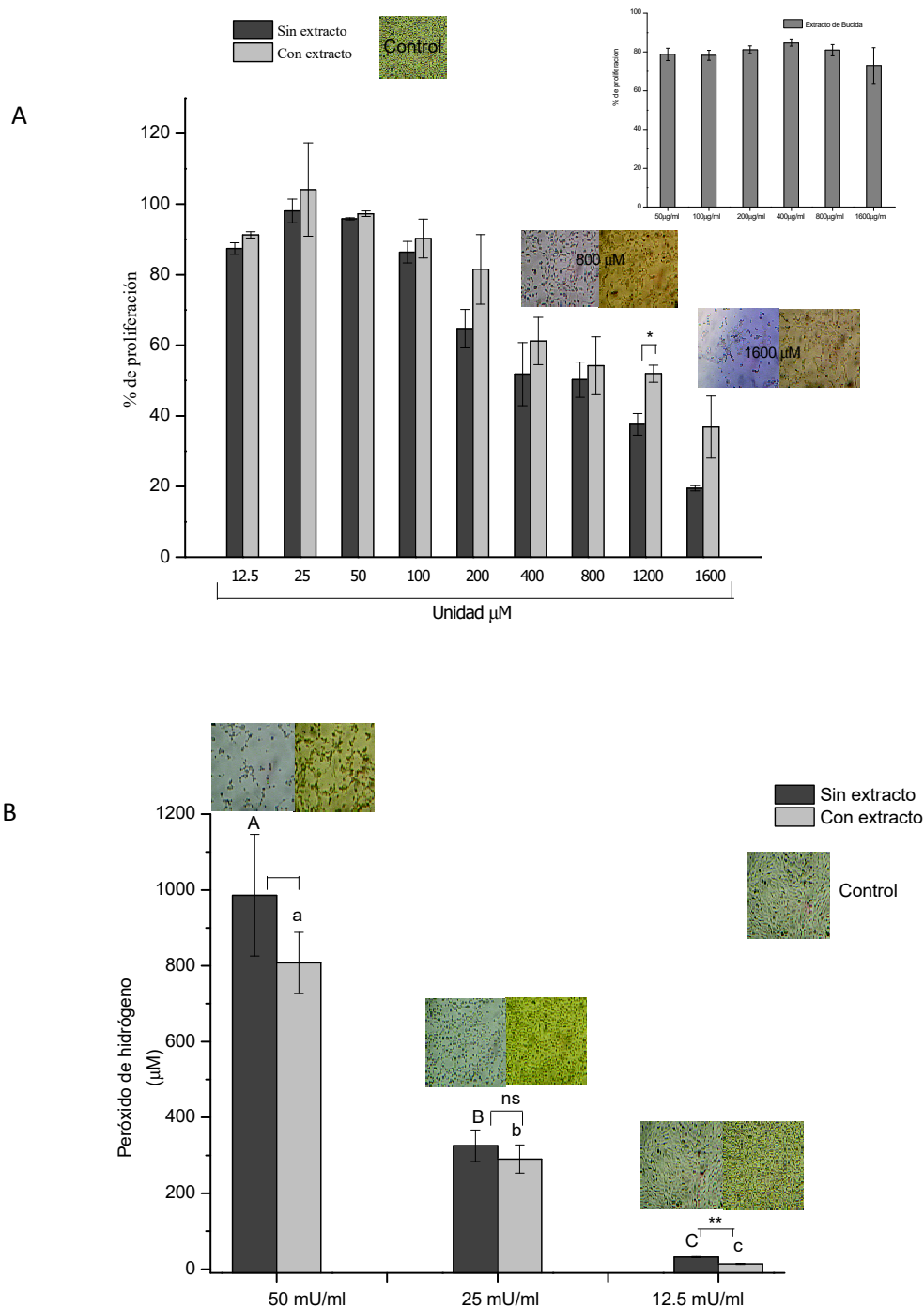


Figura 21. Efecto protector de *Bucida buceras* (1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la muerte celular inducido por adición de 12.5 a 1600 μM H_2O_2 de en un cultivo de ARPE-19 a las 24 h. Inseto corresponde al estudio de toxicidad celular de *Bucida buceras* en un rango de concentración de 50 a 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A). Los niveles de H_2O_2 en GOx a 24 h fueron cuantificados usando el reactivo de FOX (B). Valores son expresados como media \pm 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_2O_2 tratadas. ** $p < 0.01$ diferencias significativas entre valores con tratamientos antioxidantes vs H_2O_2 tratadas, ns diferencias no significativas por el test de Tuckey.

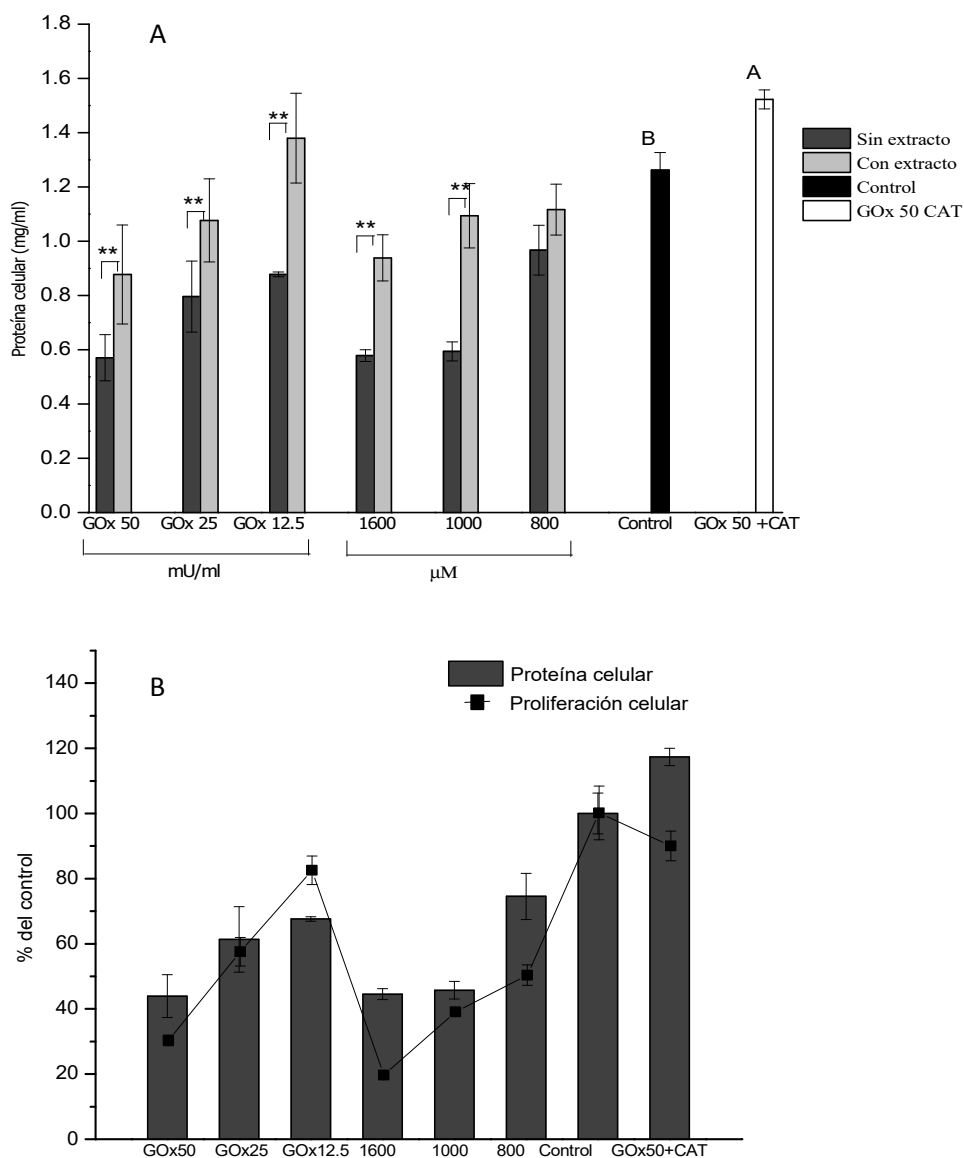


Figura 22. Efecto de *Bucida buceras* sobre el daño a la proteína celular inducido por el H₂O₂ generado enzimáticamente por GOx (50, 25, 12.5 mU/mL) o por adición (1600, 1000 y 800 μM) (A). Relación entre la concentración de proteína celular y la acción citotóxica del H₂O₂ (B). Valores expresados como media ± DE en μM (n=3 experimentos independiente). *p<0.05 diferencias significativas por el test Tuckey entre valores de control de células vs H₂O₂ tratadas, **p<0.01 diferencia significativa entre valores con tratamiento antioxidante vs H₂O₂ tratadas.

En la Figura 22 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 μM 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.

Cambios significativos en la morfología celular con el incremento de la concentración del oxidante y la capacidad protectora del antioxidante fueron apreciados (Fig. 21 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.

V.4.2 Actividad Moduladora de la Angiogénesis por *Bucida buceras*.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes y es el resultado de un conjunto ordenado de eventos modulados, *in vivo*, por una variedad de agentes inhibidores o inductores de la misma (Shibuya, 2008). Numerosos estudios indican que la angiogénesis es el resultado del balance entre factores pro y antiangiogénicos, particularmente en la disminución de la producción de proteínas inhibitoras. Este proceso es estimulado por el VEGF, que es el factor de crecimiento más específico y potente, tanto para la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) como para la vasculogénesis (desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de un tejido indiferenciado) (Karamysheva, 2008).

Los niveles de VEGF en los sobrenadantes del cultivo celular se cuantificaron mediante ELISA después de 30, 60, 120 min de contacto con el H_2O_2 y a las 24 h de co-tratamiento con *Bucida buceras* (Figura 23). Los resultados en la concentración de proteína VEGF indican que los tratamientos en pulso con H_2O_2 (Figura 23 A) presentaron una tendencia al

aumento (493.57 y 507.28 pg/mL) dependiente de la concentración 125 y 500 μ M respectivamente. Aunque estadísticamente no fue detectada diferencia significativa en relación a la concentración del oxidante y el tiempo de contacto comparado al grupo control o sin peróxido (412.03 pg/mL, $P > 0.05$).

Las células ARPE-19 tratadas con *Bucida buceras* y en co-tratamiento con H₂O₂ en pulso (125 y 500 μ M) exhibieron un marcado aumento significativo en el contenido de VEGF (839.37, 930.56 y 1116.67 pg/mL respectivamente) comparado a las células control (412.03 pg/mL, $P < 0.05$). El efecto inductor de *Bucida buceras* en la secreción de VEGF sobre las células bajo reto oxidativo con peróxido muestra que los niveles de VEGF se elevaron significativamente en presencia del extracto a 1.9 y 2.2 veces al nivel de concentración de H₂O₂ 125 y 500 μ M respectivamente a las 24 h de co-tratamiento.

La inducción enzimática de H₂O₂ con GOx 2.5 y 10 mU/mL mostró un nivel de VEGF de 480.51 y 490.52 pg/mL respectivamente comparado a las células control (491.94 pg/mL, $P > 0.05$) (Figura 23 B). Este comportamiento fue similar al obtenido con el efecto oxidativo inducido por el tratamiento a pulso, lo cual pudiera venir a dado a requerir un mayor tiempo de contacto con el oxidante para provocar el aumento en la producción del factor angiogénico. De igual forma el tratamiento con *Bucida buceras* con y sin GOx favoreció el incremento significativo en la secreción de VEGF en niveles de 1323.25, 1263.26 y 799.30 pg/mL en 10, 2.5 mU/mL y sin GOx, $P < 0.05$ respectivamente. Este aumento representó un 2.6 y 2.7 veces en el nivel de VEGF con respecto a las células ARPE-19 tratadas solamente con GOx.

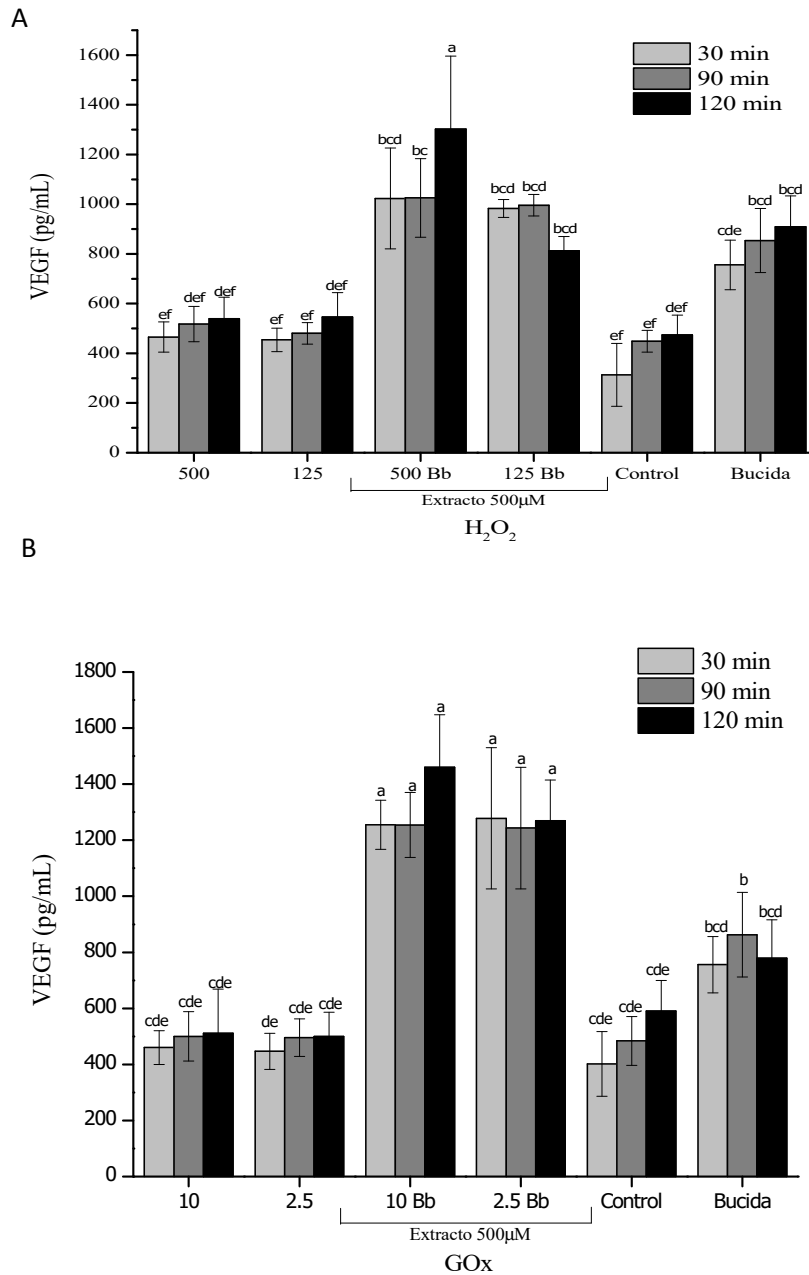


Figura 23. Efectos de *Bucida buceras* en el nivel de VEGF inducido por reto oxidativo con peróxido en células ARPE-19. Las células ARPE-19 se expusieron a inducción a pulso a 125 y 500 μM de H_2O_2 (A) y enzimático con GOx 2.5 y 10 mU/mL (B) a 30, 60, 120 min en cotratamiento con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto durante hasta 24 h. Valores expresados como media \pm DE en pg/mL ($n=3$ experimentos independiente). Valores con diferente letra minúscula indican diferencia significativa $p<0.05$ por el test Tuckey.

VI. DISCUSIONES

VI.1 Cuantificación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos

VI.1.1 Cuantificación de fenoles totales

En este trabajo, el tallo de *Bucida buceras* tuvo la mayor cantidad de fenoles totales, mientras que la hoja presentó un nivel intermedio y el tronco el valor más bajo como se muestra en la figura 11. Generalmente diferencias en la acumulación de metabolitos secundarios entre varias partes ocurren en plantas medicinales. Las cantidades de metabolitos secundarios varían entre especies y aún entre diferentes partes de una misma especie (Mampihiswana *et al.*, 2010). Mientras ciertos compuestos son comunes a muchas partes de una planta otros son restringidos a una parte anatómica definida (semilla, tallo, hoja, fruto, etc.) (Iloki *et al.*, 2015).

Las diferentes partes de una misma planta pueden sintetizar y acumular diferentes compuestos o distintas cantidades de un compuesto en particular debido a su expresión génica diferencial. Muchos estudios han confirmado que la cantidad y composición de compuestos fenólicos es diversificada a un nivel sub-celular y dentro del tejido de la planta. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por Hyder *et al.* (2002) (*Larrea tridentata* o Gobernadora) y Mampihiswana *et al.* (2010), quienes reportaron mayor contenido de polifenoles en hojas y frutos, seguido del tallo y por último la raíz.

Las plantas producen compuestos fenólicos en diferentes partes anatómicas en respuesta a condiciones ambientales adversas. Los cambios climáticos tales como: temperatura elevada, baja humedad (aridez) promueven la producción de compuestos fenólicos. Además los compuestos fenólicos desempeñan importantes roles en la fisiología y alelopatía de la planta activando mecanismos de defensa contra varios tipos de estrés causado por patógenos, plagas, agentes polinizadores y condiciones ambientales.

En general la extractibilidad de un componente particular depende de la polaridad del medio de extracción (índice de polaridad o IP), de la relación soluto/solvente y de la solubilidad del compuesto (tipo de polifenol) en el solvente de extracción. Particularmente

la solubilidad de los polifenoles está determinada por la presencia y posición de los grupos hidroxilos, el tamaño molecular y la longitud de los constituyentes de la cadena hidrocarbonada. Como se observa en la Figura 11 los compuestos fenólicos fueron extraídos en mayor cantidad ($\approx 550 \mu\text{g EAG/mg}$) en los solventes polares (agua-IP=9 y metanol-IP=6.6), lo que demuestra la naturaleza polar de los compuestos fenólicos presentes en *Bucida buceras*. Mientras que una extractabilidad inferior se obtuvo en solventes menos polares etanol (IP=5.2) y acetona (IP=5.4).

Atendiendo a la Figura 10 cabe subrayar la riqueza en compuestos fenólicos de la *Bucida buceras* ($\approx 500 \mu\text{g EAG/mg}$) al compararse con otras plantas de la región del noroeste ($25\text{-}600 \mu\text{g EAG/mg}$) solo igualada por *Krameria erecta* (Cosahui) reportada por Jimenez-Estrada *et al.* (2013). De igual manera Iloki *et al.* (2015) reportó un contenido de fenoles totales entre 250 y $500 \mu\text{g EAG/mg}$ dependiente de la parte y del tipo de solvente que concuerda con nuestro estudio. Estos resultados apuntan a una biosíntesis regular de estos metabolitos en el tiempo dado a su eficacia ecológica.

Además Kuete y Efferth, 2010 reportaron 4 agrupamientos según el contenido de fenoles totales clasificándolos en: alto ($> 5000 \text{ mg EAG} / 100 \text{ g}$ o $> 50 \mu\text{g EAG/mg}$), medio alto ($3000\text{-}5000 \text{ mg EAG} / 100 \text{ g}$), medio bajo ($1000\text{-}3000 \text{ mg EAG} / 100 \text{ g}$) y bajo ($< 1000 \text{ mg EAG} / 100 \text{ g}$). Como se corrobora *Bucida buceras* presenta un elevadísimo potencial en el aislamiento de nuevos compuestos polifenólicos bioactivos.

Es difícil seleccionar un solvente apropiado de manera óptima para la extracción de fenoles (metabolito secundario) de múltiples muestras de material vegetal. Alteración en la polaridad del solvente puede ser utilizado para precipitar diferencialmente compuestos antioxidantes seleccionados. Diversos estudios han mostrado que acetona o sus combinaciones con agua muestran mejor poder reductor (Kchaou *et al.*, 2013; Teh *et al.*, 2014). Sin embargo, Siddhuraju y Becker (2003), reportaron que metanol y etanol son solventes efectivos para la extracción de compuestos fenólicos, aunque Jayaprakasha *et al.* (2010), demostraron que acetona, metanol y agua fueron relativamente inefectivos para la extracción de fenoles totales en semillas de uvas.

Los perfiles y rendimientos del contenido fenólico y su actividad antioxidante parece superior en solventes más polares. No obstante, es necesario apuntar que los compuestos

fenólicos están muchas veces asociados con otras biomoléculas (polisacáridos, proteínas, terpenos, clorofila y compuestos inorgánicos), por lo que la elección de un solvente adecuado para la extracción de una clase particular de compuesto, debe ser basado en las características estructurales y nivel relacionado a la solubilidad acuosa de una molécula diana en particular.

VI.1.2. Flavonoides cloruro de aluminio (AlCl₃) flavonas/flavonoles, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP), flavanonas/ flavanoles y cuantificación fenólica por HPLC.

El contenido de flavonoides del tipo de flavonoles/flavonas evaluados por el método de AlCl₃, mostró una amplia variación desde 24.00 hasta 314.44 µg EC/mg (Figura 10) entre las diferentes partes estando muy influenciado en cada caso por el tipo de solvente usado. A diferencia de la extracción de fenoles totales en el cual el solvente más polar (agua) fue más efectivo para estos compuestos fenólicos, los solventes de mediana polaridad resultaron más eficientes. Sorprendente resultó que el agua tuvo los rendimientos más bajos en las diferentes partes de la planta. Este resultado apunta a que las flavonas/ flavonoles presentes en *Bucida buceras* pueden ser de mediana solubilidad.

Los resultados claramente indican que la producción de flavanonas/ flavanoles (Figura 11) no está omnipresente en toda la planta, sino que su síntesis depende de la estructura anatómica de la planta. A diferencia del contenido de flavonas y flavonoles abundante en el tallo y escaso en el tronco. Los flavonoides del tipo flavanonas y flavanoles en el tronco fueron mayoritario alcanzando una relación 5:1 en relación a los flavonas y flavonoles. En sentido general el grupo de flavanonas/ flavanoles resultaron mayoritario en *Bucida buceras*. Dentro de este grupo la catequina fue el flavonoide más abundante. El alto contenido de este compuesto en las hojas de *Bucida buceras* concuerda con la abundancia de este metabolito en las hojas del té verde (*Camellia sinensis*).

Los flavonoles rutina y quercetina fueron encontrados en cantidades mínimas dentro de los flavonoides. Particularmente la rutina, el glucósido de quercetina fue encontrada en mayor concentración. Generalmente, las formas agliconas de flavonoides son compuestos minoritarios de frutas y vegetales y se encuentran abundantes en hierbas tales como: apio, perejil, menta, salvia, orégano y tomillo (Sakakibara *et al.*, 2003).

Por otra parte el contenido de esculetina cuantificada en alta concentración se corresponde a los altos niveles reportado para plantas ricas en esculetina como *Cinnamomum cassia* (canela de Cassia) que ha reportado entre 0.7 y 12.2 g/kg de corteza. Lo que apunta a *Bucida buceras* como una fuente abundante de cumarinas. Estos fitocompuestos fenólicos tienen muchas actividades biológicas: antitumoral, antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos, antiarrítmicos.

Trabajos anteriores reportado por Iloki *et al.* (2015) encontró un contenido de flavonas/ flavonoles y flavanonas/ flavanoles en el rango de 20-70 $\mu\text{g EC/mg}$ y de 50-100 EPN/mg respectivamente inferiores a lo encontrado en nuestro estudio. Aunque nuestros resultados coinciden en el hecho de que dentro de los flavonoides el grupo de flavanonas/ flavanoles fueron los más abundantes principalmente en el tronco.

Por otra parte se ha reportado la presencia de flavanonas: Buceracidin A (5,2''-dihidroxi- 3-metoxi-6,7-(2''',2''''-dimetilcromeno) flavanona, Buceracidin B (5,2''-dihidroxi-6,7-(2''',2''''-dimetilcromeno-)flavanona y flavanonas preniladas (Minimiflorin, 3-Hidroximimiflorin, 3-Metoximimiflorin, Mundulinol) (Hayashi *et al.*, 2003).

VI.2. Evaluación de la actividad antioxidante: secuestro del radical libre DPPH• y poder reductor del hierro férrico (FRAP)

La concentración inhibitoria (IC_{50}) de 5-25 $\mu\text{g /ml}$ 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 (Iloki *et al.*, 2015, Iloki *et al.*, 2017). Compuestos antioxidantes puros como el ácido ascórbico, catequina, rutina presentan valores de IC_{50} de 7.88, 7.24 y 13.6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente comparado a la actividad antioxidante encontrada en extractos crudos de *Bucida buceras*.

De acuerdo a Kuete y Efferth 2010, la capacidad de secuestro del radical libre DPPH fue también ranqueado según su IC50: alto (< 50 µg/mL), moderado (50-100 µg/mL) y bajo (> 50 µg/mL). Como se destaca la planta estudiada presenta.

El FRAP indica la actividad antioxidante del extracto mediante la capacidad de donar electrones reduciendo el complejo ión férrico (Fe³⁺)-TPTZ al estado ferroso (Fe²⁺)-TPTZ. La unión del Fe²⁺ al ligando (TPTZ) genera un intenso color azul, indicando la cantidad de antioxidantes.

VI.3. Capacidad retinoprotectora de *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 H₂O₂ (pulso o enzimático) y un último grupo en que las células inducidas al estrés oxidativo que fueron tratadas con un extracto de *Bucida buceras*. Los co-tratamientos con el antioxidante *Bucida buceras* puede atenuar la muerte celular inducida por el H₂O₂ principalmente en las concentraciones de 1200 y 1600 µM 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 32.5mU/ ml de GOx, 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 µM 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. 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.

Zhang *et al.*, 2014 encontraron que el extracto acuoso de la raíz de *Salvia miltiorrhiza* (ácido salvianólico A) inhibió la escisión de caspasa-3 inducido por el H₂O₂ 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). Un estudio reportado por Iloki *et al.* 2015 confirmó que la caspasa-3 podría ser un objetivo parcialmente involucrado en la apoptosis inducida por el H₂O₂ en el epitelio pigmentario de la retina. De igual manera este mismo autor reportó que el extracto etanólico de *Bucida buceras* fue capaz de prevenir el aumento en actividad de caspasa-3 inducido por el H₂O₂ en los tratamientos de GOx 25 mU/mL y 800 µM de H₂O₂, con reducciones del 13 y 51% respectivamente. Similar al efecto protector obtenido en nuestro estudio.

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 H₂O₂. Los datos presentados muestran que el extracto de *Bucida buceras* puede proteger parcialmente al cultivo celular de la muerte celular inducido por el H₂O₂.

VI.3. Efecto modulador de la angiogénesis de *Bucida buceras*.

Para que se produzcan procesos de proliferación celular, tanto en tejidos normales como tumorales o retinas dañadas (angiogénesis patológica), es necesaria la presencia de vasos sanguíneos. Como resultado la angiogénesis patológica retiniana es la causa principal de pérdida visual en una gran cantidad de enfermedades: degeneración macular relacionada a la edad, retinopatía diabética y retinopatía del prematuro, en otras (Kinnunen y Herttuala, 2012). Por otra parte la formación de nuevos vasos sanguíneos es crucial en la angiogénesis fisiológica como el desarrollo embrionario, las funciones reproductivas, la cicatrización de

heridas y la formación de vascularización colateral en isquemia cardíaca (Hashimoto, 1994, Ferrara, 2010).

En nuestro estudio se observó que el extracto de *Bucida buceras* no presentó actividad antiangiogénica en el modelo de retina evaluado, al incrementar los niveles del VEGF (efecto pro-angiogénico). A diferencia de recientes estudios que indican como una alternativa posible el uso del Fucoïdan un polisacárido extraído de las algas pardas por su capacidad de reducir la expresión y secreción del VEGF, así como también la angiogénesis inducida por este factor en varios modelos in vitro de células del EPR (Dithmer *et al.*, 2014).

El aumento de los niveles de VEGF bajo el tratamiento con *Bucida buceras* pudiera ser parcialmente coincidente a lo reportado por Puddu *et al.*, 2016. En este estudio, el cultivo de ARPE-19 tratado con los fármacos ranibizumab o aflibercept aumentaron la expresión génica de ARNm de VEGF-A, lo que sugiere que las células ARPE-19 intentan compensar la falta de VEGF-A en el medio con el aumento de la transcripción de VEGF-A. Aunque la discrepancia entre los niveles aumentados de ARNm y la velocidad de secreción del VEGF mantenida puede deberse a los mecanismos postranscripcionales que se producen después de la producción de ARNm (Puddu *et al.*, 2016).

Por otra parte se ha reportado que el resveratrol (compuesto fenólico de las uvas) protege las células del EPR contra el daño del estrés oxidativo a través de la estimulación bioenergética mitocondrial. Un mecanismo asociado a la protección del resveratrol contra el desarrollo de la neovascularización coroidea promovido por el humo del cigarro (Sheu *et al.*, 2013). Dado la capacidad de atenuar el estrés oxidativo de *Bucida buceras* pudiera ser este el mecanismo inhibidor de la angiogénesis.

De igual forma el curcumin (compuesto fenólico de la *Cúrcuma longa*) ha reportado reducción en la migración transendotelial de monocitos con potencial beneficio en la función barrera del endotelio vascular como mecanismo regulador de la angiogénesis (Monfoulet *et al.*, 2017). Si consideramos el potencial fenólico de *Bucida buceras* esto pudiera ser de gran interés para evaluar su efecto.

Las células epiteliales del pigmento de la retina desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la retina y la coroides. Además, las células del EPR son la principal fuente de VEGF en el ojo. Además de ser considerados factores patológicos en

el desarrollo de la degeneración macular exudativa relacionada con la edad o el edema macular diabético, los VEGF tienen funciones importantes para la supervivencia y el mantenimiento de la retina y la coroides sanas (Puddu *et al.*, 2016).

VII. CONCLUSIONES

El contenido de fenoles totales de *Bucida buceras* se acumuló mayoritariamente en el tallo, seguido de hoja y en menor cuantía en el tronco en un rango de 286.78- 654.13 μg EAG/mg. Los solventes con mejor efectividad extractora fueron agua y metanol mientras que acetona fue la menos eficiente.

La biosíntesis de flavonoides del tipo flavonas/flavonoles fue superior en el tallo, mientras que las flavanonas y flavanoles fueron abundantes en el tronco en proporción 5:1 respecto a flavonas/flavonoles contribuyendo a que las flavanonas y flavanoles sean mayoritarias en *Bucida buceras*. El metanol fue el solvente más efectivo para la extracción de flavonoides.

La composición fenólica determinada por HPLC cuantificó a los flavonoides catequina, esculetina, rutina y quercetina en mayor concentración (182.65 mg/g) respecto a los ácidos fenólicos (41.55 mg/g): ácido gálico, clorogénico, cafeico, cumárico, ferúlico, sinápico y cinámico. La catequina y el ácido gálico fueron los de mayor contenido en la hoja de *Bucida buceras*.

La elevada capacidad de secuestro del radical DPPH (IC_{50} : 5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el alto poder reductor del hierro férrico (FRAP: 1969.39 a 4844.44 μM EAA/mg) destaca el potencial antioxidante de *Bucida buceras* con una fuerte correlación (-0.565 y 0.827) con el contenido de fenoles totales.

El co-tratamiento con *Bucida buceras* sobre el cultivo de ARPE-19 protege a las células del reto oxidativo incrementado la proliferación y la proteína celular, disminuyendo los niveles de H_2O_2 y atenuando el daño morfológico inducido por las concentraciones más alta de la adición del peróxido de hidrógeno y de GOx.

El tratamiento con *Bucida buceras* en el modelo de retina estudiado no presentó efecto antiangiogénico, al incrementar el nivel del VEGF, siendo más acentuado el aumento tras inducción con el H_2O_2 por ambos métodos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Ablonczy Z., M. Dahrouj, P. H. Tang. 2011. Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 52, no. 12, pp. 8614–8620.
- Acharya S., Rodriguez I.R., Moreira E.F., Midura R.J., Misono K., Todres E., Hollyfield J.G. 1998. SPACR, a novel interphotoreceptor matrix glycoprotein in human retina that interacts with hyaluronan. *J Biol Chem*. 273: 31599–31606.
- Adamis, A.P. D.T. Shima, T. YeoK, L.F. Brown, B. Berse, P.A. Damore, J. Folkman. 1993. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 193(2): p. 631-8.
- Amemiya K., M. Haruta, M. Takahashi, M. Kosaka, G. Eguchi. 2004. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 316, no. 1, pp. 1–5.
- Amos A.F., D.J. McCart, P. Zimmet. 1997. The Rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*. 14(suppl 5):S1-85.
- Anasagasti A, C. Irigoyen, O. Barandika, A. Lopez de Munain, Ruiz-Ederra J (2012) Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res* 75:117-129.
- 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 β -Estradiol and steady-state concentrations of H₂O₂: antiapoptotic effect in endometrial cells from patients with endometriosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 60:63-72.
- Andrini L.B. 2010. Expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular durante la regeneración hepática. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de ciencias médicas. Tesis Doctoral.
- Araiz J. 2005. Estadios previos (MAE) y DMAE seca. En: Monés J, Gómez-Ulla F, editores. Degeneración macular asociada a la edad. Barcelona: Prous Science. p 99-108.
- Ávalos, G. A. y C. E. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal* 2: 119–145.
- Ayuso C., J.M. Millan. 2010. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med* 2:34
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.

- Becerra S.P., R.N. Fariss, Y.Q. Wu, L.M. Montuenga, P. Wong, B.A. Pfeffer. 2004. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp Eye Res.* 78(2): p. 223-34.
- Behling K.C., E.M. Surace, J. Bennett. 2002. Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye. *Mol Vis.* 8: p. 449-54.
- Bekerman I., P. Gottlieb, M. Vaiman. 2014. Variations in eyeball diameters of the healthy adults. Pp 5.
- Benzie, I. F. y J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239: 70–76.
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress?. Department of medicine. The Middlesex Hospital, London. UK. *Metabolims.* 49: 2-8.
- 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.
- Biesaga, M. 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1218: 2505–2512.
- Blaauwgeers H.G., G.M. Holtkamp, H. Rutten, A.N. Witmer, P. Koolwijk, T.A. Partanen, K. Alitalo, M.E. Kroon, A. Kijlstra, V.W. van Hinsbergh, R.O. Schlingemann. 1999. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. *Am J Pathol.* 155(2):421-8.
- Bodnar G., M. Ouellette, M. Frolkis. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, vol. 279, no. 5349, pp. 349–352.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier y C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28: 25–30.
- Cai H., L. V. del Priore, 2006. Gene expression profile of cultured adult compared to immortalized human retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*, vol. 12, pp. 1–14.
- Caldwell R.B., M. Bartoli, M.A. Behzadian, A.E. El-Remessy, M. Al-Shabrawey, D.H. Platt. 2003. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 19:442-55.
- Cao, W., T.T. Joyce, E. Rajesh, S. Steven, M.D. Mrazek, J. F. McGinnis. 2001. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epitheliumderived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(7): p. 1646-52

- Chadwick B. P. 2007. Variation in Xi chromatin organization and correlation of the H3K27me3 chromatin territories to transcribed sequences by microarray analysis. *Chromosoma*, vol. 116, no. 2, pp. 147–157.
- Chang, C., M. Yang, H. Wen y J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug 10*: 178–182.
- Chang, L. Ye, D. M. Defoe, and R. B. Coldwell. 1997. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 38, no. 6, pp. 1082–1093.
- Chen, Y.-H., Z.-S. Yang, C.-C. Wen, Y.-S. Chang, B.-C. Wang, C.-A. Hsiao y T.-L. Shih. 2012. Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food Chemistry 134*: 717–724.
- Chen, Y.-H., Z.-S. Yang, C.-C. Wen, Y.-S. Chang, B.-C. Wang, C.-A. Hsiao y T.-L. Shih. 2012. Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food Chemistry 134*: 717–724.
- Ciulla T.A., Rosenfeld P.J. 2009. Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 20(3):158-65.
- Constable P. A, J. G. Lawrenson, D. E. M. Dolman, G. B. Arden, N. J. Abbott. 2006. P-Glycoprotein expression in human retinal pigment epithelium cell lines,” *Experimental Eye Research*, vol. 83, no. 1, pp. 24–30.
- Culver-Cochran A.E., B. P. Chadwick. 2012. The WSTF-ISWI chromatin remodeling complex transiently associates with the human inactive X chromosome during late S-phase prior to BRCA1 and γ -H2AX. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e50023.
- Cushnie, T.P. Cushnie, B. Lamb, A.J. 2014. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J. Antimicrob. Agents 44*: 377-386.
- Davis A.A., P. S. Bernstein, D. Bok, J. Turner, M. Nachtigal, R. C. Hunt. 1995. A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture,” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 36, no. 5, pp. 955–964.
- De la Paz M.A y R.E. Aderson. 1996. Lipid peroxidation in rod outer segments. Role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. *Investigative Ophthalmology and visual science.* 33: 2091-2096.
- Dhawan V. 2014. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. *Studies on respiratory disorders.* Pp 27-47.

- Dorrell M., H. Uusitalo-Jarvinen, E. Aguilar, M. Friedlander. 2007. Ocular neovascularization: Basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol.* 52:S3-S19.
- Dunn K.C., A. E. Aotaki-Keen, F. R. Putkey, and L. M. Hjelmeland. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*, vol. 62, no. 2, pp. 155–169.
- Ferrara N. 2002. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 29(Suppl 16):10-4.
- Ferrara N. 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 21-26.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9(6):669-76.
- Figuroa-Morales, F. 2012. Composición fenólica, lipídica, actividad antioxidante y biodisponibilidad in vitro de 10 genotipos de nueces cultivados en la Región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Murcia, España.
- Filas B.A., Y.B. Shui, D.C. Beebe. 2013. Computational model for oxygen transport and consumption in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:6549-6559.
- 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.
- Gallego-Pinazo R., R. Dolz-Marco, M. Díaz-Llopis. 2012. Towards the new spectral-domain optical coherence tomography based classification of age-related macular degeneration. *Archivos de la sociedad Española de oftalmología.* No. 8.
- García J., A. M. Veiga. 2011. Terapia celular con células de epitelio pigmentado de retina y fotorreceptores diferenciados a partir de células madre pluripotentes en un modelo de rata con retinosis pigmentaria. 18 *Simposium Regeneracion y trasplante de órganos y tejidos.*
- García, D. E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes* 27: 1–12.
- 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.
- Gariano R.Y., R.E. Kalina, A.E. Hendrickson. 1996. Normal and pathological mechanisms in retinal vascular development. *Surv Ophthalmol.* 40:481-490

- Garland D.L. 1991. Ascorbic acid and the eye. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol 54, pp. 1193S-1202S.
- Geisen, P. J. R. McColm, B. M. King, M. E. Hartnett. 2006. Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Current Eye Research*, vol. 31, no. 9, pp. 739–748.
- Glickman R.D. y K.W. Lam. 1992. Oxidation of ascorbic acid as an indicator of photooxidative stress in the eye. *Photochemistry and Photobiology*. 55: 191-196.
- 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.
- Graue E. W. 2016. *Oftalmologia en la práctica de la medicina general*. Oxid Med Cell Longev.
- Grisanti S., C. Guidry. 1995. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 36, no. 2, pp. 391–405.
- 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.
- Gupta K. 2005. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J*. 81:236-42.
- Haghi, G. y A. Hatami. 2010. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10812–10816.
- Harborne, J. B. y C. A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 484–504.
- Hartwig A. 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis?. *Free Radical Biology and Medicine*. 55; 63-72.
- Hashimoto E., T. Ogita, T. Nakaoka, R. Matsuoka, A. Takao, Y. Kira. 1994. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*. 267: 1948–54.
- Holtkamp M., M. van Rossem, A. F. de vos, B. Willekens, R. Peek, and A. Kijlstra. 1998. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 112, no. 1, pp. 34–43.

- Huang Q., S. Wang, C.M. Sorenson, N. Sheibani. 2008. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Exp Eye Res.* 87(3): p. 226-41.
- Hutcheson K.A. 2003. Retinopathy of prematurity. *Curr Opin Ophthalmol.* 14:286290.
- Iloki-Assanga, S. B., L. M. Lewis-Luján, C. L. Lara-Espinoza, A. a. Gil-Salido, D. Fernandez-Angulo, J. L. Rubio-Pino y D. D. Haines. 2015a. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Research Notes* 8: 396–410.
- Iloki-Assanga, S. B., L. M. Lewis-Luján, E. G. Rivera-Castañeda, A. A. Gil-Salido, A. L. Acosta-Silva, C. Y. Meza-Cueto y J. L. Rubio-Pino. 2013. Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Morinda citrifolia* L. (noni) grown in Mexico (with track change). *African Journal of Biotechnology* 12: 4630–4639.
- Ishida S., U. Tomohiko, Y. Kenji, K. Yuichi, A. Shiro, O. Yuichiro, H. Tetsuo, O. Yoshihisa, A. Jayakrishna, W.M. Joan, S. Evangelos, N.G. Yin-Shan, A. Patricia, D.T. D'Amore, A.P. Shim. 2003. VEGF 164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med.* 198: 1-8.
- Jablonski, M.M., Jablonski, J. Tombran-Tink, D. A. Mrazek y A. Iannaccone. 2000. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci.* 20(19): p. 7149-57.
- Jiménez-Andrade G.Y., C. González-Espinosa. 2011. Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. *El Residente.* Pp 111-119.
- Jiménez-Estrada, M., C. Velázquez-Contreras, A. Garibay-Escobar, D. Sierras-Canchola, R. Lapidco-Vázquez, C. Ortiz-Sandoval, A. Burgos-Hernández y R. E. Robles-Zepeda. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 12–18.
- Kaczara, P., T. Sarna, J.M. Burke. 2010. Dynamics of H₂O₂ availability to ARPE-19 culture in models of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 48: 1064-1070.
- Karamysheva A. 2008. Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry (Moscow).* Vol. 73, N° 7 751-762.

- Kim D.O. y C.Y. Lee. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44:253-273.
- 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
- Klein R., B.E. Klein, S.E. Moss, D.L. DeMets. 1984. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. 102; 527-532.
- Klein R., B.E.K Klein, S.E. Moss, M.D. Davis, D.L. De Mets. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. 1984. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol.* 102:520-6.
- Kowanzetz M., N. Ferrara. 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: Therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 12:5018-5022.
- Kuete V., T. Efferth. 2010. Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers Pharm.* 1;23.
- Kuznetsova A. M. Alexander. M. A. Aleksandrova. 2014. Cell Models to Study Regulation of Cell Transformation in Pathologies of Retinal Pigment Epithelium.
- Kuznetsova A.V., L. A. Milyushina, A. S. Mikaelyan, R. D. Zinovieva, E. N. Grigoryan, and M. A. Aleksandrova. 2010. Dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Molecular Medicine*, vol. 6, pp. 23–29.
- Kvanta A. 2006. Ocular Angiogenesis: The role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand.* 84:282-288
- Lebold, K. M y M.G. Traber. 2014. Interactions between α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radical Biology and Medicine.* 66: 13-19.
- Lillo, J. L. Ergonomia: Evaluacion y diseño del entorno visual. 2000. Alianza.
- Lu M., M. Kuroki, S. Amano, M. Tolentino, K. Keough, I. Kim, R. Bucala, y A.P. Adamis 1998. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest.* 101(6): p. 1219-24.
- Lund R.D. P. Adamson, Y. Sauvé. 2001. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 17, pp. 9942–9947.

- Ma W, E. L. Song, J. Guo. 2007. "RAGE ligand upregulation of VEGF secretion in ARPE-19 cells," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 3, pp. 1355–1361.
- Malgorzata N. y A. Grzybowski. 2016. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid med cell longev*.
- Mannermaa E. 2010. In vitro model of retinal pigment epithelium for use in drug delivery studies. *Dissertations in Health Sciences*, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland.
- Manresa N.R. 2015. Efecto del tratamiento anti-VEGF sobre los factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con degeneración macular exudativa asociada a la edad. Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y la Nutrición. Tarragona, España.
- Mártinez C.F. 2015. Papel del estrés oxidativo y la inflamación en la retinosis pigmentaria. Efecto de la inhibición del TNF en la progresión de la degeneración retiniana. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Martínez-Carpio P. A., M. A. Navarro 2003. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama Cell culture in breast cancer basic research. *Clin Transl Oncol*. 5:184-91
- Matsunaga H., J. T. Handa, A. Aotaki-Keen, S. W. Sherwood, M. D. West, and L. M. Hjelmeland. 1999. Beta-galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 40, no. 1, pp. 197–202.
- Merken, H. M. y G. R. Beecher. 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 577–599.
- Milyushina L.A., A. V. Kuznetsova, E. N. Grigoryan, M. A. Aleksandrova, 2011. Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in vitro, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 151, no. 4, pp. 506–511.
- 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.
- Moncayo-Luján, M. D. R. 2015. Compuestos fenólicos y antioxidantes en albahaca (*Ocimum basilicum L.*) bajo soluciones nutritivas orgánicas en invernadero. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Subdirección de Posgrado. Coahuila, México.

- Monfoulet, L.E, S. Mercier, D. Bayle, R. Tamaian, N.B. Chamoux, C. Morand, D. Milenkovic. 2017. Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics. *Free Radical Biology and Medicine* 112; 109-120.
- Nagy, M. y D. Grancai. 1996. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* 51: 100–101.
- Nenadis, N., S. Boyle, E. G. Bakalbassis y M. Tsimidou. 2003. An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 451–458.
- Ogata, N., T. Hiroyasu, Y. Shin, L. P. Gehlbach, J.D. Elia, Lisa L. Wei; Keisuke Mori. 2001. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res*, 2001. 22(4): p. 245-52.
- Ohno-Matsui K., I. Morita, J. Tombran-Tink. 2001. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 189, no. 3, pp. 323–333.
- Olthof, M. R., P. C. H. Hollman y M. B. Katan. 2001. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition* 131: 66–71.
- Oyster C.W.1999. *The human eye: structure and function* Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates.
- Pagaza C.E. y R. Fernández. 2005. La familia combretácea en la cuenca del Río Balsas, Mexico. *Polibotánica*. Pp. 117-153.
- 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.
- Pardo J. T. 2011. Efectividad de fármacos inhibidores de la angiogénesis en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid. Departamento de farmacología.
- 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.
- 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.
- Prado-Serrano A., M.A. Guido-Jiménez, J.T. Camas-Benítez. 2009. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 83: 261-266.

- Pulido J.S. 2003. Retina, coroides y vítreo. Los requisitos en oftalmología. Madrid: Elsevier Science.
- Punzo C., W. Xiong, C.L. Cepko. 2012. Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame?. *J Biol Chem* 287:1642-1648.
- 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.
- Rambhatla L, C. Chiu, R. D. Glickman, and C. Rowe-Rendleman. 2002. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 43, no. 5, pp. 1622–1630.
- Ricalde C.C., J.C. Flores, M.M. Sánchez, C. Chapela. 2016. Fundamentos de gráficos inteligentes. Technische Hochschule Brandenburg. University of Applied sciences.
- 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
- Ringvold A. 1996. The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Experimental Eye Research*. 62: 261-264.
- Roberts W.G. y G.E. Palade 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*. 108 (Pt 6): p. 236979.
- Rodríguez de Morais L., I. R. Praxedes de Sales, M. R. Dutra, N. Z. Taveira de Jesus, H. S. Falcão, J. M. Barbosa-Filho, A. G. Silveira, A. Lopes, J. F. Tavares, L. M. Batista. 2012. Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. *Molecules*. 9142-9206.
- Rojas S.J., y A. Saucedo. 2012. Retina y Vítreo. Asociación Mexicana de Retina, A.C. Segunda edición. Editorial Manual Moderno. Ciudad de México, México.
- Rózanowska M., L. Bakker, E. Michael. 2012. Concentration dependence of vitamin C in combinations with vitamin E and zeaxanthin on light-induced toxicity to retinal pigment epithelial cells. University of Florida.
- Rozanowska M., L. Bakker, M.E. Boulton, B. Rozanowski. 2012. Concentration dependence of vitamin C in combinations with vitamin E and zeaxanthin on light-induced toxicity to retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 88:1408-1417.

- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 571-581.
- Salero, T. A. Blenkinsop, B. Corneo. 2012. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 88–95.
- 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.
- Schlingemann R.O., V.W. van Hinsbergh. 1997. Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br J Ophthalmol*. 81:501512.
- 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.
- Sheu. 2013. Resveratrol stimulates mitochondrial bioenergetics to protect retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Sep;54(9):6426-38. doi: 10.1167/iovs.13-12024.
- Shibuya M. 2008. Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports*. Apr 30; 4 1 (4) 278286. Mini Review.
- Singleton, V. L. y J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.
- Slomiany M.G. y S.A. Rosenzweig. 2004. Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287(3): p. C746-53.
- Sobotta, M. C., A.G. Barata, U. Schmidt, S. Mueller, G. Millonig, T.P. Dick. 2013. Exposing cells H₂O₂ : A quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments. *Free Radical Biology and Medicine* 60; 325-335.
- Sommer F. 2006. Hyalocytes in tissue engineering: first steps towards a cell-based vitreous substitute. *Dissertation in Natural Sciences, Universität Regensburg*.
- Sonoda S., C. Spee, E. Barron, S. J. Ryan, R. Kannan, and D. R. Hinton. 2009. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nature Protocols*, vol. 4, no. 5, pp. 662–673.

- Srinivas, K., J. W. King, L. R. Howard y J. K. Monrad. 2010. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering* 100: 208–218.
- Stoyanovsky D.A., R. Goldman, R.M. Darrow, D.T. Organiscak, V.E. Kagan. 1995. Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipic acid. *Curr Eye Res.* 14: 181-189.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85(3): p. 845-81
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- Tezel T.H. 1997. Reattachment to a substrate prevents apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 235, no. 1, pp. 41–47, 1997.
- Thebault S. 2011. El epitelio pigmentario retiniano como componente de la barrera hemato-retiniana: implicación en la retinopatía diabética. Instituto de neurobiología, UNAM Campus Juriquilla Departamento de Neurobiología Celular y Molecular. Laboratorio de Endocrinología Molecular.
- Tokarz P, K. Kaarniranta, J. Blasiak. 2013. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology.* 14; 461-481.
- Tsao, R. y R. Yang. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1018: 29–40.
- Tsonis P.A., W. Jang, K. Del Rio-Tsonis, and G. Eguchi. 2001. A unique aged human retinal pigmented epithelial cell line useful for studying lens differentiation in vitro. *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 45, no. 5-6, pp. 753–758.
- Ugartondo-Casadevall, V. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Departamento de Fisicoquímica. Barcelona, España.
- Umapathy A., P. Donaldson, J. Lim. 2013. Antioxidant delivery pathways in the anterior eye. *Biomed Res Int* 2013:207250.
- Ustároz-González O., F. Furno-Sola, H. Quiroz-Mercado. 2006. Angiogénesis ocular. Revisión del tema. *Revista Mexicana de Oftalmología.* 80: 268-271.
- Usui S., B.C. Oveson, S.Y. Lee, Y.J. Jo, T. Yoshida. 2009. NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa. *J Neurochem* 110(3): 1028-1037.

- Vafiadis, A. P. y E. G. Bakalbassis. 2003. A Computational Study of the Structure – Activity Relationships of Some p -Hydroxybenzoic Acid Antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society* 80: 1217–1223.
- Valverde A. 2013. Degeneración macular exudativa asociada a la edad riesgo inducido por faoemulsificación e impacto de los genes *cfh* y *arms2* sobre la incidencia, desarrollo y respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo. Universidad complutense de Madrid. Facultad de medicina. Departamento de oftalmología. Tesis de doctorado.
- Van Wijngaarden P., Coster D.J., Williams K.A. 2005. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA*. 293(12):1509–1513. [PubMed: 15784876]
- Waterhouse, A. L. 2002. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 21–36.
- Widomska J. y Subczynski W.K. 2014. Why has Nature Chosen Lutein and Zeaxanthin to Protect the Retina?. *J Clin Exp Ophthalmol*. 5: 326.
- Wirotko B., T.Y. Wong, R. Simo. 2008. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res*. 27(6): p. 608-21.
- Yoo M.H., H.J. Hyun, J.Y. Kob, Y.H. Yoon. 2005. Riluzole inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation in vitro and hyperoxia-induced abnormal vessel formation in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:4780-4787.
- Yoshida N, Y. Ikeda, S. Notomi, K. Ishikawa, Y. Murakami, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi T. 2012. Clinical Evidence of Sustained Chronic Inflammatory Reaction in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology*.
- 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, 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.
- Zimmet P., K.G. Alberti, J. Sahw. Global and social implications of the diabetes epidemic. 2001. *Nature*. 414:782-787
- Zou, Y., Y. Lu y D. Wei. 2004. Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5032–5039.