

Lorena Perdices Royo

# Estudio de melatonina y galato de epigalocatequina frente a las degeneraciones retinianas

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Pinilla Lozano, Isabel  
Fuentes Broto, Lorena

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE MELATONINA Y GALATO DE  
EPIGALOCATEQUINA FRENTE A LAS  
DEGENERACIONES RETINIANAS

Autor

Lorena Perdices Royo

Director/es

Pinilla Lozano, Isabel  
Fuentes Broto, Lorena

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018







**Universidad**  
Zaragoza

---

## Tesis Doctoral

---

ESTUDIO DE MELATONINA Y GALATO DE  
EPIGALOCATEQUINA FRENTE A LAS  
DEGENERACIONES RETINIANAS

Autora

Lorena Perdices Royo

Directoras

Isabel Pinilla Lozano  
Lorena Fuentes Broto

Universidad de Zaragoza  
2018



**MARIA ISABEL PINILLA LOZANO**, Profesora Titular del Área de Oftalmología del Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, Doctora en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista del Área del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza

hace constar, en calidad de directora de la presente Tesis Doctoral:

Que el trabajo de investigación “Estudio de Melatonina y Galato de Epigallocatequina frente a las Degeneraciones Retinianas” que presenta **D<sup>a</sup> Lorena Perdices Royo**, Licenciada en Bioquímica y Máster en Biología Molecular y Celular, para optar al GRADO DE DOCTOR INTERNACIONAL, ha sido realizado bajo mi dirección y se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad, reuniendo los requisitos necesarios para su presentación y defensa como ante el tribunal que corresponda.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza a 15 de Septiembre de 2018

Fdo: Dra. Isabel Pinilla Lozano



**LORENA FUENTES BROTO**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, Doctora en Biomedicina por la Universidad de Zaragoza

hace constar, en calidad de directora de la presente Tesis Doctoral:

Que el trabajo de investigación “Estudio de Melatonina y Galato de Epigallocatequina frente a las Degeneraciones Retinianas” que presenta **D<sup>a</sup> Lorena Perdices Royo**, Licenciada en Bioquímica y Máster en Biología Molecular y Celular, para optar al GRADO DE DOCTOR INTERNACIONAL, ha sido realizado bajo mi dirección y se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad, reuniendo los requisitos necesarios para su presentación y defensa como ante el tribunal que corresponda.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza a 15 de Septiembre de 2018

Fdo: Dra. Lorena Fuentes Broto



Este trabajo se ha financiado gracias a los siguientes proyectos de investigación:



“Investigación en Retina y Sistema Visual” (B08\_17R).  
**Grupo de Investigación de referencia del Gobierno de Aragón (previamente B99).**

“Ayudas para la contratación de personal investigador predoctoral en formación (C060/2014)”. **2014-2018**



“Estudio preclínico del efecto de melatonina y galato de epigallocatequina frente a la degeneración retiniana tanto hereditaria como asociada a la edad”  
(PI13/01124) Instituto de Salud Carlos III



“EMBO Short-Term Fellowship (Number 7334)”. EMBO





## AGRADECIMIENTOS

*Cuando empecé a plantearme comenzar a escribir esta Tesis supe que esta sección sería la última que haría. Me resulta increíblemente difícil plasmar con unas pocas palabras lo agradecida que estoy a todas las personas que han estado ahí conmigo, durante la realización de la Tesis, pero espero que el intento me salga bien:*

*En primer lugar a Isabel, “LA JEFA”, sin tu apoyo continuo, tus ánimos, tus croissants de las visitas de los lunes y tus mil mensajes de “Lore, ¿cómo vas?” habría sido imposible acabar esta Tesis. Gracias por tu confianza ciega en mí, por todas las oportunidades que me has brindado durante estos años, y que me han permitido crecer como persona e investigadora. Te debo un verano y una tiroides nueva!!*

*A todos los demás miembros de nuestro grupo, por su ayuda constante, por ser mis profes durante todos estos años, enseñándome que aunque la investigación conlleva esfuerzo, si el ambiente en el que trabajas es bueno todo es más fácil, y con vosotros no ha podido serlo más. A Lorena, siempre ahí para lo que necesitase, ya fuese físicamente o a distancia, ayudándome a solucionar todos los problemas que han ido surgiendo a lo largo de todos estos años (¡que no han sido pocos!). A Paco, responsable de todo lo que se sobre trabajar con animales, gracias por tu paciencia infinita y tus consejos, sin los cuales no habría podido terminar todas las pruebas a tiempo: la mitad de esta tesis es tuya. Gema y Elvira, con nuestros cafecitos de mitad de mañana y de tarde, hablando de todo lo que nos faltaba por hacer, de todo lo que había que repetir, pero siempre juntas: el dicho “mal de muchos, consuelo de tontos” nos va que ni al pelo. Finalmente a Ana, mi estreno en Pubmed gracias a ti!*

*A mis compañeros de despacho y de la Unidad, por los buenos momentos que hemos compartido, tanto en los ratitos del café como en las paradas en mitad del pasillo, hablando de todo y de nada: sabías cuando salías del despacho pero no cuando íbas a volver!*

*A mis amigas, Lore, 10 años siendo amigas, y todavía me llamas para quedar a tomar un café, aun sabiendo que estos últimos meses te esperaban horas de escucharme quejar de las mil cosas que no me salían o hacía mal, y tú ahí siempre*

*dándome ánimos para seguir adelante. Lau, amigas desde que empezamos la carrera, ya en el primer trabajo que nos tocó hacer juntas supimos que esta amistad duraría siempre y cuando no trabajásemos juntas porque si no nos despedirían de tanto hablar! Siempre estás ahí para echarnos unas risas, olvidarnos de los problemas y decidir cómo nos vamos a hacer ricas sin trabajar! A mi otro grupo de investigación, Pilar, Paula, Marcela, Iratxe..., un grupo de amigos inesperado que se han convertido en una parte muy importante de mi vida. Por último, Andrea, Cris, hace no mucho vimos un dibujo en el que salía escrito: “Eres rara. Me gustas. Seamos raras juntas” y supimos que nos identificaba a la perfección. Hay personas a las que nunca llegas a conocer aunque compartas con ellos toda una vida, en cambio con vosotras me pasa lo contrario: nos conocimos hace un par de años y es como si nos conociésemos de toda la vida. Las tres sabemos que es Cristina la que expresa los sentimientos en este grupo, pero por una vez le voy a quitar el puesto: mil gracias por haber estado conmigo todo este tiempo, con los pompones en la mano cada vez que me hacía falta un poco de energía para seguir. Os quiero mucho Oompa Loompas!!*

*Gracias a esta Tesis también he podido conocer a personas maravillosas que dedican su vida a la investigación y gracias a los cuales he aprendido mucho en este tiempo: el grupo de Nicolás Cuenca, que me acogió en Alicante como si fuese una más, y sobre todo, gracias a Laura, con la que compartí muchísimas horas de trabajo y me enseñó la persona tan increíble que es tanto personal, como profesionalmente. A la Dra. Enrica Strettoj, por aceptarme en su grupo de investigación durante mi estancia doctoral, siempre ahí cada vez que necesitaba ayuda, respondiendo a todas las preguntas que tenía (y las que no tenía también) y enseñarme otra manera de ver la investigación. Elena, pieza indispensable no sólo en el equipo sino en todo el Instituto; desde que me contaste tu secreto “La salvaguardia dell’operatore” se ha convertido en mi máxima para trabajar. Marty, Antonella, Antonia, me habéis alegrado todos los días que compartimos en Pisa. Sin vosotras nada hubiese sido igual: desde el primer día me incluisteis en vuestras charlas, en los cafés, en las salidas... los 3 meses más rápidos de mi vida y por supuesto, todo gracias a vosotras. No cambiéis nunca!*

*Por último, mi familia, que son los que han tenido que aguantar todas mis neuras, mis momentos de subida y también de bajón, cuando entro en bucle y repito*

*las cosas cansándome hasta yo misma de escucharme... ellos siempre están ahí para decirme lo que necesito oír, aunque a veces no sea lo que quiero. Por vuestro cariño y confianza ciega, no dejando que me rindiera nunca. Mi hermana María, la mejor integrante del equipo de diseño gráfico que esta Tesis podía conseguir. Aunque a veces lo disimulemos bien y yo te persiga por casa para que me des un beso y tú no me lo des, sabes que te quiero mucho y que siempre estaré ahí para lo que necesites, igual que tú has estado ahí para mí.*



## ABREVIATURAS



4-HDA	4-hidroxi alquenos	EC	Epicatequina
$^1\text{O}_2$	Singlete de oxígeno	ECG	Galato de epicatequina
AA-NAT	Enzima arilalquilamina-N-acetil transferasa	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-sulfónico]	EGC	Epigalocatequina
ABTS <sup>•+</sup>	Radical del ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-sulfónico]	EGCG	Galato de epigalocatequina
aD	Herencia autosómica dominante	eNOS	NOS endotelial
ADH	Alcohol deshidrogenasa	EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ERG	Electrorretinograma
ADNmit	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
ADNn	Ácido desoxirribonucleico nuclear	EROs	Especies reactivas de oxígeno
adRP	Retinosis Pigmentaria de herencia autosómica dominante	FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-quinureamina	Fe-SOD	Isoforma de la enzima superóxido dismutasa de hierro
AMK	N1-acetil-5-metoxi-quinureamina	Fe <sup>3+</sup>	Ion de hierro (III)
ARN	Ácido ribonucleico	FMN	Flavín mononucleótido
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	FSC	Función de la sensibilidad al contraste
arRP	Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva	GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
ATP	Adenín trifosfato	GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
AV	Agudeza visual	GPx	Enzima glutatión peroxidasa
BH4	Tetrahidrobiopterina	GR	Enzima glutatión reductasa
BSA	Albúmina sérica bovina	GS-DNB	1-glutatión-2,4-dinitrobenzeno
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio	GSH	Glutatión reducido
CAT	Enzima catalasa	GSSG	Glutatión oxidado
CCG	Capa de células ganglionares	GST	Glutatión S-transferasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	H <sup>+</sup>	Ion hidrógeno
CFNR	Capa de fibras nerviosas de la retina	H <sub>2</sub> O	Agua
CGR	Células ganglionares de la retina	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
CNE	Capa nuclear externa	HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$
CNI	Capa nuclear interna	HIOMT	Enzima hidroxindol-O-metil transferasa
CO	Monóxido de carbono	hMT1/2	Receptor de melatonina humano
COX-2	Enzima ciclooxigenasa-2	HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
CPE	Capa plexiforme externa	HNO <sub>2</sub>	Ácido nitroso
CPI	Capa plexiforme interna	HOCl	Ácido hipocloroso
CPR	Grupo prostético FAD/FMN	IL-8	Interleuquina 8
Cu-SOD	Isoforma de la enzima SOD dependiente de cobre y cinc	iNOS	NOS inducible
Cu <sup>2+</sup>	Ion de cobre (II)	ipCGR	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles
CV	Campo visual	ISI	Intervalo entre estímulos
CYP450	Citocromo 450	K <sup>+</sup>	Ion potasio
DEN	Dietilnitrosamina	LE	Rata Long Evans
DHR	Distrofias Hereditarias de la Retina	LOOH	Peróxido lipídico
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad	LPO	Proceso de peroxidación lipídica
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina	MDA	Malonildialdehído
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico	MLE	Membrana limitante externa
		MLI	Membrana limitante interna
		Mn-SOD	Isoforma de la enzima SOD dependiente de manganeso
		MT	Melatonina
		N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dióxido de dinitrógeno

Na<sup>+</sup> Ion sodio  
 NAD(P)H Nicotín adenín dinucleótido (fosfato)  
 NaHPO<sub>4</sub> Hidrógeno fosfato de sodio  
 NaNO<sub>2</sub> Nitrito sódico  
 NF-κB Factor nuclear kappa-B  
 nNOS NOS neuronal  
 NO Óxido nítrico  
 NO<sub>2</sub> Dióxido de nitrógeno  
 NOS Óxido nítrico sintasa  
 NOX NAD(P)H Oxidasa  
 NSQ Núcleo supraquiasmático  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radical superóxido  
 O<sub>3</sub> Ozono  
 OH<sup>·</sup> Radical hidroxilo  
 OMS Organización Mundial de la Salud  
 ONCE Organización Nacional de Ciegos  
 Españoles  
 ONOO<sup>-</sup> Radical peroxinitrito  
 OOCCL<sub>3</sub> Radical triclorometilperoxilo  
 OXPHOS Mecanismo de fosforilación oxidativa  
 P Día Post-natal  
 P23H-RHO Sustitución de la prolina por histamina en la posición 23 en el gen de la rodopsina  
 PB Tampón fosfato  
 PG Prostaglandinas  
 PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PUFAs Ácidos grasos poliinsaturados  
 RE Retículo endoplasmático  
 RHO Gen de la rodopsina  
 RL Radicales libres  
 RNS Especies reactivas de nitrógeno  
 ROI Intermediarios reactivos de oxígeno  
 ROO<sup>·</sup> Radical peroxilo  
 ROS Reactive Oxygen Species  
 RP Retinosis Pigmentaria  
 SD Rata Sprague-Dawley  
 SE Segmento externo  
 SI Segmento interno  
 SNC Sistema nervioso central  
 SOD Enzima superóxido dismutasa  
 TCA Ácido tricloroacético  
 TMP 1,1,3,3-Tetrametoxipropano  
 TNB 5-tio-2-ácido nitrobenzoico  
 TNF-α Factor de Necrosis Tumoral α  
 TROLOX Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico  
 UPR Respuesta a proteínas mal plegadas  
 UPS Sistema proteasoma-ubiquitina  
 UV Rayos ultravioleta  
 XIRP Retinosis Pigmentaria de herencia ligada a X  
 XO Xantina Oxidasa



**ÍNDICE**



<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>RETINA .....</b>	<b>14</b>
<i>Estructura.....</i>	<i>14</i>
Fotorreceptores: Conos y bastones .....	18
Células ganglionares .....	22
Sistema inmunitario de la retina.....	24
<i>Visión.....</i>	<i>26</i>
<i>Funciones no visuales de la retina.....</i>	<i>28</i>
<b>RETINOSIS PIGMENTARIA .....</b>	<b>31</b>
<i>Prevalencia e incidencia .....</i>	<i>32</i>
<i>Historia.....</i>	<i>32</i>
<i>Sintomatología.....</i>	<i>33</i>
<i>Formas hereditarias .....</i>	<i>35</i>
Mutaciones causantes .....	36
<i>Fisiopatología.....</i>	<i>39</i>
<b>ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>39</b>
<i>Radicales libres.....</i>	<i>39</i>
Importancia biológica .....	42
Efectos perjudiciales .....	43
Fuentes de radicales libres.....	46
<i>Sistemas antioxidantes .....</i>	<i>55</i>
Fuentes endógenas.....	55
Fuentes exógenas .....	62
Antioxidantes y edad o enfermedades degenerativas.....	64
<b>MELATONINA.....</b>	<b>66</b>
<i>Biosíntesis .....</i>	<i>66</i>
<i>Distribución, farmacocinética y metabolismo.....</i>	<i>68</i>
<i>Mecanismos de acción .....</i>	<i>69</i>
Mecanismos mediados por receptor .....	69
Mecanismos antioxidantes .....	71
<i>Significancia biológica.....</i>	<i>71</i>
<b>GALATO DE EPIGALOCATEQUINA .....</b>	<b>73</b>
<i>Presente en el té verde.....</i>	<i>73</i>

<i>Biodisponibilidad y metabolismo</i> .....	75
<i>Mecanismo de acción</i> .....	76
<i>Significancia biológica y aplicaciones</i> .....	77
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>79</b>
HIPÓTESIS.....	81
OBJETIVO GENERAL .....	82
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	83
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>85</b>
MODELOS ANIMALES.....	87
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	89
PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	90
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN VISUAL .....	92
<i>Optomotor</i> .....	92
Evaluación de la agudeza visual.....	93
Evaluación de la sensibilidad al contraste .....	94
<i>Electrorretinograma</i> .....	94
Valoración escotópica .....	96
Protocolo de doble flash.....	97
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN NO VISUAL: TELEMETRÍA .....	98
<i>Registro de temperatura y actividad</i> .....	98
DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS .....	100
<i>Homogeneizado de tejidos</i> .....	100
<i>Cuantificación de proteínas</i> .....	101
<i>Daño oxidativo</i> .....	103
Cuantificación de la peroxidación lipídica (MDA +4-HDA).....	103
Cuantificación de restos carbonilo .....	106
Cuantificación de nitritos.....	108
Determinación del ratio GSH/GSSG.....	110
<i>Defensas antioxidantes</i> .....	113
Capacidad total antioxidante.....	113
Determinación de la actividad catalasa.....	115
Determinación actividad superóxido dismutasa .....	117
Determinación actividad glutatión S-transferasa .....	121
MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	123
<i>Estudio descriptivo de los datos</i> .....	123

<i>Inferencia estadística</i> .....	124
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>125</b>
PARÁMETROS DE FUNCIÓN VISUAL .....	128
<i>Agudeza visual</i> .....	128
<i>Sensibilidad al contraste</i> .....	130
<i>Electrorretinografía</i> .....	133
Amplitud de la onda A.....	133
Amplitud de la onda B.....	134
Doble flash .....	136
PARÁMETROS DE FUNCIÓN NO VISUAL: TELEMETRÍA .....	138
PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	145
<i>MDA + 4-HDA</i> .....	146
<i>Restos carbonilos</i> .....	147
<i>Nitritos</i> .....	149
<i>Ratio GSH/GSSG</i> .....	150
DEFENSAS ANTIOXIDANTES .....	152
<i>Capacidad total antioxidante</i> .....	152
<i>Catalasa</i> .....	154
<i>Superóxido dismutasa</i> .....	156
<i>Glutación S-transferasa</i> .....	158
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>161</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>195</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>199</b>

## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Volúmenes utilizados en la recta patrón de determinación de proteínas por el método Bradford.....	102
Tabla 2. Volúmenes utilizados en la recta patrón para la determinación de lípidos peroxidados.....	104
Tabla 3. Parámetros analizados en el grupo de animales de referencia SDxLE en el estudio de los ritmos circadianos.....	140
Tabla 4. Parámetros analizados en el grupo de animales transgénicos P23HxLE en el estudio de los ritmos circadianos.....	141
Tabla 5. Diferencias entre los parámetros analizados en el grupo de animales transgénicos P23HxLE en el estudio de los ritmos circadianos.....	144

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Corte sagital del globo ocular.....	13
Figura 2. Representación esquemática de las diferentes capas de la retina y los tipos celulares que la componen.....	17
Figura 3. Imagen obtenida por inmunocitoquímica de los fotorreceptores, conos y bastones.....	19
Figura 4. Imagen representativa de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en retina humana.....	22
Figura 5. Representación de la morfología de los 5 tipos de células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipCGR) encontrados en la retina de rata.....	23
Figura 6. Distintos test de visión para evaluar la sensibilidad al contraste (A) y la agudeza visual (B) Cartas ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) de contraste 100% (izquierda), de 2,5% (centro) y de 1,25% (derecha).....	28
Figura 7. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno.....	40
Figura 8. Reducción del oxígeno para formar agua.....	48
Figura 9. Reacción de síntesis de óxido nítrico (NO) catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).....	52
Figura 10. Mecanismo de actuación del glutatión reducido (GSH).....	60
Figura 11. Estructuras de las 4 principales catequinas que encontramos en el té verde.....	75
Figura 12. Diseño experimental del estudio.....	90
Figura 13. Principales ondas de análisis del ERG (ondas a y b) y potenciales oscilatorios.....	95
Figura 14. Protocolo para la obtención de homogeneizados de las muestras de tejido hepático.....	101
Figura 15. Protocolo del método Bradford para la cuantificación de proteínas.....	103
Figura 16. Reacción de hidrólisis producida en la recta patrón para la cuantificación de lípidos peroxidados.....	105
Figura 17. Protocolo de medida de los niveles de peroxidación lipídica (LPO).....	106
Figura 18. Protocolo de cuantificación de restos carbonilos.....	108

Figura 19. Protocolo de análisis de daño nitrosativo, mediante la cuantificación de los niveles de nitritos. ....	110
Figura 20. Protocolo para la determinación de la ratio entre glutathion reducido (GSH) y glutathion oxidado (GSSG). ....	112
Figura 21. Reacción producida en nuestro protocolo de análisis de la capacidad total antioxidante.....	113
Figura 22. Protocolo de medida de la capacidad total antioxidante.....	115
Figura 23. Reacción catalizada por la enzima catalasa (CAT) .....	116
Figura 24. Protocolo para la determinación de la actividad catalasa presente en las muestras. ....	117
Figura 25. Sistema bioquímico de la enzima superóxido dismutasa (SOD) .....	118
Figura 26. Estequema de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) .....	119
Figura 27. Protocolo de cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).....	121
Figura 28. Reacción catalizada por la enzima Glutathión S-transferasa (GST) en nuestro protocolo de medida.....	122
Figura 29. Protocolo de cuantificación de la actividad Glutathión S-transferasa (GST). ....	123
Figura 30. Valores de resolución espacial obtenidos mediante optomotor en promedio entre el sentido de las agujas del reloj y en contra de las agujas del reloj en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento y a distintas edades. ....	130
Figura 31. Sensibilidad al contraste obtenida por el aparato optomotor a distintas frecuencias espaciales (0,022, 0,042, 0,089 y 0,175 ciclos/°), a P180. ....	131
Figura 32. Valores de sensibilidad al contraste a una frecuencia espacial de 0,089 c/g obtenidos mediante Optomotor en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento y a distintas edades. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).....	132
Figura 33. Amplitud de la onda a obtenida mediante electroretinograma a distintas intensidades de estímulo en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo) .....	134
Figura 34. Amplitud de la onda b obtenida mediante electroretinograma a distintas intensidades de estímulo en las ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). ....	136
Figura 35. Representación de la respuesta de los conos y los bastones a la onda b obtenida mediante el protocolo de doble flash de intensidad $1,4 \log \text{ cd.s/m}^2$ en ERG, en las ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en	

los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). .....	138
Figura 36. Ritmos circadianos. Representación de los actogramas obtenidos en ratas transgénicas P23HxLE y SDxLE en los parámetros de temperatura corporal y actividad locomotora, durante 7 días de registro a P180. ....	139
Figura 37. Ritmos circadianos de la temperatura corporal y la actividad locomotora de ratas P23HxLE. ....	145
Figura 38. Niveles de MDA y 4-HDA (lípidos peroxidados) en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). MDA: malonaldehído.....	146
Figura 39. Niveles de restos carbonilos (proteínas oxidadas) en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).....	148
Figura 40. Niveles de nitritos en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). ....	150
Figura 41. Ratio entre el GSH y el glutatión oxidado GSSG, medido en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado .....	151
Figura 42. Niveles de capacidad total antioxidante en microequivalentes Trolox/mg de proteína, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). TAS: capacidad total antioxidante .....	154
Figura 43. Niveles de la actividad de la enzima catalasa en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).....	156
Figura 44. Niveles de actividad de la enzima SOD en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. ....	158
Figura 45. Niveles de actividad de la enzima Glutatión S-transferasa en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. ....	160



**RESUMEN**



Retinosis Pigmentaria (RP) es el término utilizado para designar un conjunto de alteraciones hereditarias y neurodegenerativas de la retina, caracterizadas por una afectación global de las capas celulares retinianas que desemboca en una desorganización y remodelación de las mismas, causando afectación visual y pudiendo finalizar en ceguera total en los pacientes que la sufren.

Independientemente de la causa primaria, potencia la progresión de la enfermedad el incremento de estrés oxidativo que se produce en la retina y que favorece los procesos de inflamación y apoptosis, dañando macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos. Además, se ha observado niveles elevados de estrés oxidativo en la retina, humor acuoso y plasma en pacientes y modelos animales de la enfermedad. Asimismo, este estrés oxidativo no sólo afecta a nivel ocular, sino que también se ha demostrado una alteración del estado oxidativo hepático en el modelo animal de RP, la rata P23H.

Melatonina (MT) y galato de epigallocatequina (EGCG) son dos moléculas naturales con propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, neuroprotectoras y antioxidantes, que se han demostrado útiles como tratamiento en otras enfermedades oculares como degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinopatía diabética, en las cuales el estrés oxidativo también tiene un papel clave en la progresión de la enfermedad.

Las ratas P23H de la línea 1 se cruzaron con ratas Long Evans (LE) pigmentadas normales para producir descendencia P23HxLE, de modo que exhibieron las condiciones clínicas de RP. Como grupo de referencia, las ratas Sprague Dawley (SD) también se cruzaron con ratas LE para producir animales pigmentados SDxLE.

Las ratas P23H evaluadas hasta los 180 días mostraron, no sólo una pérdida de la función visual, sino una desincronización de ritmos circadianos y una afectación del estado hepático oxidativo respecto a ratas sanas. Los ritmos circadianos no experimentaron grandes cambios debido, probablemente, a una buena preservación de las células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles hasta estadios avanzados de la enfermedad.

La administración de melatonina y galato de epigallocatequina, a una concentración de 10 mg/kg/día, tanto de forma individual como de forma conjunta, a ratas P23H heterocigotas pigmentadas durante 6 meses supuso una mejora en los parámetros de función visual analizados (agudeza visual, sensibilidad al contraste y registros electroretinográficos), siendo el EGCG y la combinación con MT los mejores tratamientos a la hora de detener la progresión de la enfermedad. Éstos también mejoraron significativamente los mismos parámetros en ratas sanas, indicando un posible efecto beneficioso en los daños producidos como consecuencia de la edad. A nivel de ritmos circadianos, mediante telemetría se detectó un mayor índice de desincronización entre los animales afectados por RP y los animales de referencia, que se redujo únicamente con el tratamiento con MT. En cuanto a los parámetros bioquímicos analizados, las ratas P23H presentaron mayores niveles de estrés oxidativo y menor capacidad antioxidante comparados con las ratas de referencia. MT, de forma individual y conjuntamente a EGCG demostró ser capaz de reducir los niveles de marcadores oxidativos, mientras que el EGCG individualmente produjo menores mejorías. En el caso de los parámetros antioxidantes, MT incrementó los niveles globales antioxidantes y la actividad de las enzimas CAT y SOD, mientras que su combinación con EGCG produjo cambios menores. La administración de antioxidantes a las ratas de referencia disminuyó los niveles antioxidantes totales e incrementó algunos parámetros oxidativos respecto a aquellas con vehículo.

Podemos concluir que el tratamiento con MT y/o EGCG mejora la función visual, sincronización circadiana y/o estrés oxidativo hepático en las ratas P23H, modelo de RP, además de tener efectos sobre los animales de referencia.

Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar, en los animales P23H, por qué el EGCG tiene mayor beneficio a nivel visual siendo MT la que tiene mayor beneficio a nivel circadiano y bioquímico; y también determinar, en los animales de referencia, el efecto real que produce la administración de sustancias antioxidantes sobre organismos sanos.

*ABSTRACT*



Retinitis Pigmentosa (RP) is a group of inherited neurodegenerative diseases in which a mutation triggers a progressive loss of visual function affecting not only the photoreceptors, but the rest of retinal layers as well, ending with a complete disorganization and remodeling of the retina. Although people who suffer from this disease present night blindness and loss of the peripheral visual field in early stages, the consequent degeneration that cones suffer as a result of the death of rods finishes with the loss of central vision and a complete blindness.

Regardless of the primary cause,, the progression of the disease is enhanced by the increase in oxidative stress that occurs in the retina and that favors the processes of inflammation and apoptosis, damaging macromolecules such as DNA, proteins and lipids. In addition, increased oxidative damage is observed in the retina, aqueous humor, and plasma of RP animal models and patients. Not only the retina is affected, but the hepatic oxidative status is also affected by free radicals in an animal model of RP, P23H rat.

Melatonin and epigallocatechin-3-gallate are both natural molecules with anti-inflammatory, antiapoptotic and antioxidant properties that have been demonstrated to be useful as treatment for multiple ocular diseases such as age-related macular degeneration, glaucoma and diabetic retinopathy, in which oxidative stress plays a key role.

Line 1 P23H rats were crossed with pigmented normal Long Evans (LE) rats to produce offspring, so that they exhibited the clinical conditions of RP. As a reference group, Sprague Dawley (SD) rats were also crossed with LE rats to produce pigmented animals. P23HxLE and SDxLE were divided into 4 groups, and each one received different antioxidant treatments in drinking water for 6 months: no treatment (sham group), melatonin 10mg/kg (MT group), EGCG 10mg/kg (EGCG group) and a combined treatment with melatonin and EGCG in equal parts, administering 10 mg/kg of each drug (MT+EGCG group). Retinal visual function was assessed based on optomotor and electroretinogram responses. Daily locomotor activity and core body temperature were assessed to measure the circadian rhythm, as an indicator of non-visual function of the retina. Finally, we measured hepatic malondialdehyde (MDA) and 4-

hydroxyalkenal (4-HDA) concentrations, protein carbonyl groups and GSH/GSSG ratio as oxidative stress markers; nitrite level as a total nitrosative damage marker; total antioxidant capacity as measurement of global antioxidant status; and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione S-transferase (GST) as the main antioxidant enzymes. At P180 all biochemistry parameters were analysed.

P23H transgenic rats exhibited diminished visual acuity compared to the referenced group for the whole period; however, EGCG and MT+EGCG groups showed a statistically significant improvement in their values from P90. At P180, SDxLE rats showed a better visual acuity threshold with MT and EGCG treatments compared to the sham group. P23HxLE and SDxLE rats showed differences in contrast sensitivity at P30, but the differences disappeared from P90 to P180, with better results in EGCG and MT+EGCG groups in both, P23HxLE and SDxLE animals. In P23H rats, electroretinographic responses showed a significant reduction in the a- and b-wave amplitudes, indicating the loss of rods and cones in the photoreceptor layer and the progression of the disease throughout the different retina layers. Using both optomotor and ERG, MT+EGCG and EGCG were the best treatments that improved visual function and helped reduce the progression of the disease. None of the treatments were capable of showing a difference in the a-wave amplitude in P23HxLE. However, we noticed better results in a-wave amplitude in SDxLE rats treated with MT, EGCG and MT+EGCG, achieving statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) compared to the sham group. Cone response assessed with double flash protocol did not show any improvements due to antioxidant treatment in neither the P23HxLE results nor the SDxLE values at the light intensity tested.

While analyzing the telemetry parameters, we did not find marked differences between P60 and P180 ages in P23HxLE rats. At P180, P23HxLE showed decreased levels of locomotor activity compared to the wild type group, and a desincronization index that reflected more than 7 hours difference between the time of minimum temperature and the time of minimum activity. MT treatment improved the desincronization index compared to vehicle P23HxLE. The EGCG group experimented a deterioration in the activity period and lower values in the interstability parameter, which quantifies the synchronization to the 24-h light–dark cycle. MT+EGCG did not



report any beneficial or adverse effect in the circadian rhythm of the P23HxLE rats. In the SDxLE rats, MT increased temperature amplitude and improved the desynchronization index as in P23HxLE rats. The EGCG group showed lower levels of activity mesor, indicating that these animals were less active than of the sham group. The MT+EGCG group results showed higher values in temperature amplitude and relative amplitude of activity.

While analyzing the biochemistry results, the P23HxLE rats exhibited higher values of lipid peroxidation. Rats treated with MT showed improvements reducing MDA and 4-HDA concentrations. The EGCG group showed no differences to vehicle group in the oxidative parameters studied. The combined MT+EGCG treatment exhibited the best measurement improvements; only the GSH/GSSG ratio, which is an indicator of general oxidative status, reached significant differences. Looking for the antioxidant defenses, the P23HxLE rats in the sham group showed 78% of the hepatic total antioxidant capacity of the wild type animals, with a reduction of the activity of CAT, SOD and GST. In these animals, MT improved, with a 42% increase in CAT activity, and 26% in SOD activity. Although EGCG increased the total antioxidant capacity levels in 32% and GST activity in almost 44%, we did not find any effect in the CAT and SOD enzymes. Unexpectedly, combined MT+EGCG treatment showed a slight improvement in the total antioxidant capacity (less than 23%).

In the SDxLE rats, MDA and 4-HDA concentrations were not significantly modified by none of the three treatments. MT reduced protein carbonyl groups and nitrite levels, which could be translated in a better oxidative status compared to untreated rats. EGCG also reduced protein carbonyl groups, without any significant changes in nitrite levels or GSH/GSSG ratio compared to sham group. Finally, MT+EGCG treatment did not significantly modify any of the oxidative markers tested in SDxLE rats. While checking for antioxidant defenses, the three treated groups exhibited lower total antioxidant capacity in the MT-treated group was 37,5% lower than the sham group, EGCG treatment reduced total hepatic antioxidant capacity by almost 42% and the group treated with the MT+EGCG combination had the least loss of total antioxidant

capacity (33%). MT group in wild type animals also reduced CAT activity values by 44%; For EGCG and EGCG+MT the reduction in SOD and GST levels was not significant.

To sum up, the administration of melatonin and epigallocatechin gallate, at a concentration of 10 mg/kg/day, both individually or jointly, to pigmented heterozygous P23H rats for 6 months, resulted in an improvement in the parameters of visual function analysed (visual acuity, contrast sensitivity and electroretinographic recordings), being the EGCG and the combination with MT the best treatments to stop the progression of the disease. They also significantly improved the same parameters in healthy rats, indicating a possible beneficial effect in the age-related damage. At the level of circadian rhythms, telemetry detected a greater rate of desynchronization between the animals affected by RP and the wild type animals, which was reduced only with the MT treatment. Regarding the biochemical parameters analyzed, the P23H rats showed higher levels of oxidative stress and lower antioxidant capacity compared with the wild type rats. MT, individually and jointly to EGCG demonstrated to be able to reduce the levels of oxidative markers, while the EGCG individually produced minor improvements. In the case of the antioxidant parameters, MT increased the overall antioxidant levels and the activity of the CAT and SOD enzymes, while its combination with EGCG produced minor changes. The administration of antioxidants to the wild type rats decreased the total antioxidant levels and increased some oxidative parameters with respect to those with vehicle.

We can conclude that treatment with MT and/or EGCG improves visual function, circadian synchronization and/or hepatic oxidative stress in rats P23H, a RP model, as well as having effects on reference animals.

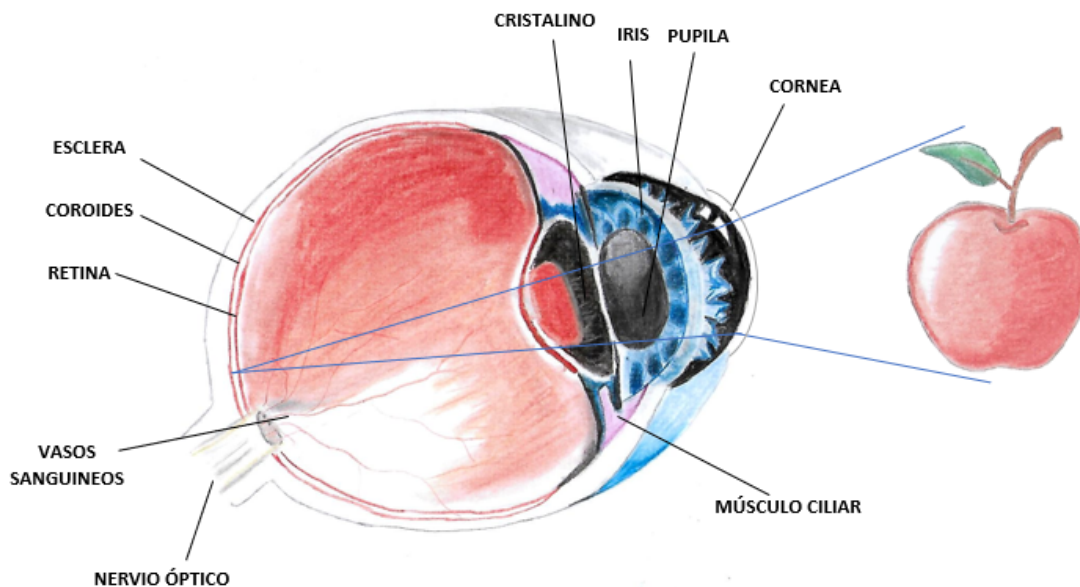
However, more studies are needed to determine, in animals P23H, why EGCG has greater benefit at the visual level with MT having the greatest benefit at the circadian and biochemical level; and also to determine, in the reference animals, the real effect produced by the administration of antioxidant substances on healthy organisms.

## INTRODUCCIÓN



La visión es el sentido que se entiende como más importante de los cinco que los seres vivos nos servimos para percibir y entender el mundo que nos rodea.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que actualmente existen 253 millones de personas con alguna discapacidad visual, de las cuales, 36 millones serían completamente ciegas.



*Figura 1. Corte sagital del globo ocular.  
Adaptado de (1).*

Si realizamos un corte sagital del ojo, podemos dividirlo en 3 secciones (ver Figura 1) (2):

- la más externa, compuesta por la **esclera**, considerada la pared de soporte del ojo y que se continúa en la parte anterior con la **córnea**. Ésta última, aproximadamente una sexta parte de la cobertura ocular, es una capa externa y transparente gracias a la disposición de sus fibras de colágeno, que cubre la cámara anterior del ojo, separada por humor acuoso del iris y la pupila y que, junto al cristalino, forman los medios refractivos transparentes que consiguen una imagen nítida a nivel de la capa de la retina.

- la capa intermedia, úvea, altamente vascularizada, la cual a su vez se subdivide en dos partes:
  - la anterior formada por el **iris**, con función muscular de esfínter, y en cuya parte central encontramos la **pupila** (su regulación, dependiendo de las condiciones de luminosidad del ambiente, controla la cantidad de luz que entra en el ojo, gracias al músculo dilatador de la pupila y el esfínter pupilar), y el **cuerpo ciliar**, que produce el humor acuoso y que está formado a su vez por los músculos ciliares, que modifican la forma del cristalino según relajen o contraigan la zónula, en un proceso conocido como acomodación.
  - la posterior formada por la **coroides**, capa vascular del ojo, encargada del mantenimiento térmico ocular, vascularización de capas más externas de la retina, etc.
- la capa interna, parte sensorial del ojo, y conocida como **retina**.

## RETINA

La retina es el tejido sensible a la luz que recubre la cara interna de la parte posterior del globo ocular. Se forma durante la embriogénesis a partir del ectodermo del tubo neural, de ahí que constituya parte del sistema nervioso central. La retina no solo está compuesta por neuronas, sino también por otras células no neuronales, que junto a las anteriores forman una estructura altamente organizada y especializada.

### ESTRUCTURA

Las retinas de todos los animales vertebrados se pueden dividir en 10 capas (3), siendo desde la más interna, en contacto con el vítreo, a la más externa, junto a la coroides (Ver Figura 2):

1. Membrana Limitante Interna (MLI): es la capa más interna de la retina, en contacto con el vítreo, y compuesta por las terminaciones de las células de Müller y una membrana basal. En la región anterior se continúa con el cuerpo

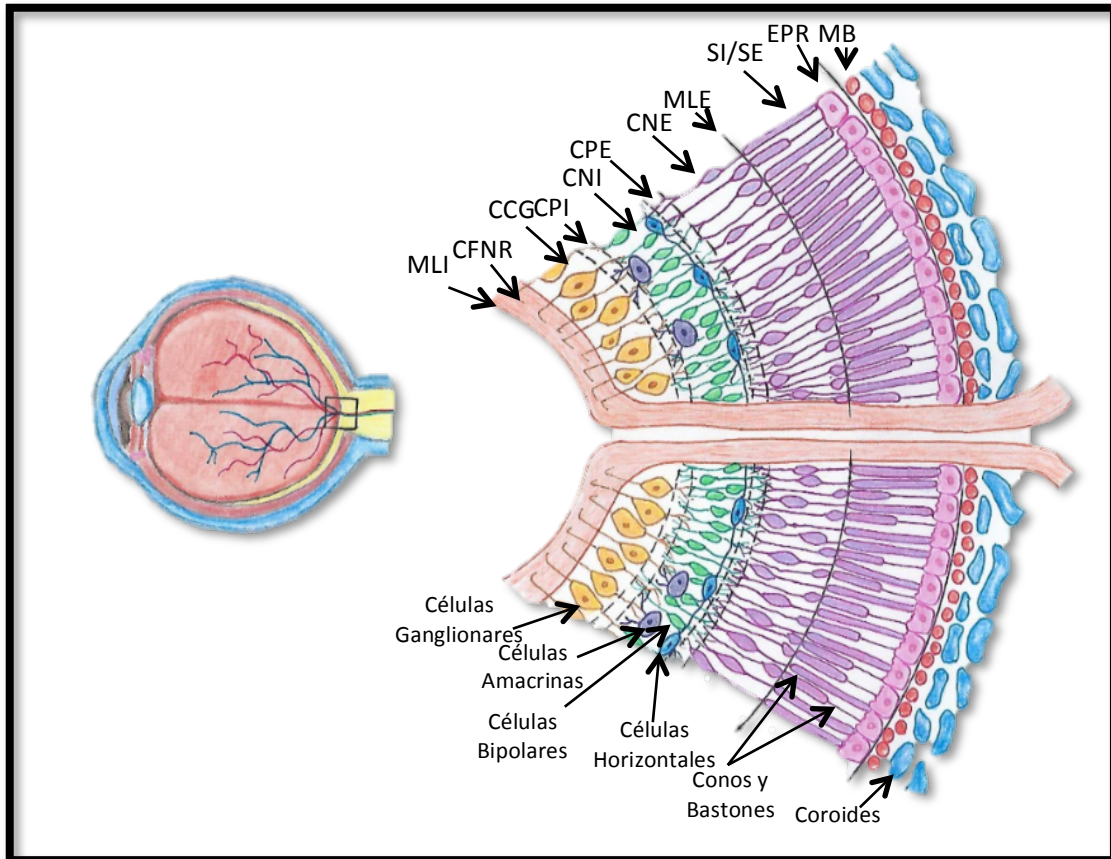
ciliar, y a nivel del disco óptico, los procesos terminales de los astrocitos sustituyen a los de las células de Müller.

2. Capa de Fibras Nerviosas de la Retina (CFNR): constituida por los axones de las células ganglionares, que se disponen paralelos a la superficie de la retina y abandonan el ojo formando el nervio óptico. A su nivel está dispuesto el plexo capilar retiniano superficial.
3. Capa de Células Ganglionares (CCG): capa de una única célula de grosor (excepto en la zona perifoveal donde puede estar constituida por hasta 8 ó 10 células, y en la región temporal al disco óptico donde la constituyen 2 células). En esta capa no solo encontramos células ganglionares de la retina (CGR), sino también los procesos gliales de las células de Müller que las separan, así como algunas células amacrinas o cuerpos de células de Müller “desplazados” (*displaced*).
4. Capa Plexiforme Interna (CPI): constituida por las conexiones sinápticas entre los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares. En esta capa encontramos las sinapsis de las neuronas de segundo y tercer orden en el “mecanismo de la visión” (*visual pathway*). También podemos encontrar conexiones entre procesos de células amacrinas y axones de células bipolares o cuerpos de células ganglionares y dendritas; también encontramos conexiones entre distintos tipos de células amacrinas y entre neuronas interplexiformes y células amacrinas. En esta capa se encuentran las uniones en hendidura (*gap junctions*) de las células amacrinas y en algunos casos podemos observar cuerpos de células ganglionares y amacrinas desplazadas.
5. Capa Nuclear Interna (CNI): compuesta por los cuerpos celulares principalmente de células bipolares, horizontales, amacrinas, neuronas interplexiformes, células de Müller y alguna célula ganglionar desplazada. La vasculatura retiniana del plexo capilar profundo también se encuentra en esta capa.

6. Capa Plexiforme Externa (CPE): a este nivel encontramos las sinapsis entre las células fotorreceptoras (conos y bastones) con las células que componen la CNI, mediante los pedículos de los conos y las esférulas de los bastones con las dendritas de las células comentadas anteriormente con sinapsis tipo *ribbon* o cintilla.
7. Capa Nuclear Externa (CNE): contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores, conos y bastones.
8. Membrana Limitante Externa (MLE): está compuesta por las uniones adherentes o zonulas adherens entre los fotorreceptores y entre éstos y las células de Müller, a nivel de los segmentos internos (SI). Esta banda tendría como función la de actuar como una barrera ante moléculas de alto peso molecular, como las proteínas (4).
9. Capa de los segmentos internos y externos de conos y bastones (SI/SE): como su propio nombre indica, estaría compuesta por los segmentos internos y externos de los conos y los bastones.
10. Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR): compuesto por una monocapa de células pigmentadas, de forma hexagonal, altamente polarizadas apico-basalmente, productoras de melanina. Se encuentra estrechamente unido a la coroides por su región basolateral, donde está en contacto con la membrana de Bruch (MB): esta multicapa especializada permite la interacción a través de su matriz, de las células del EPR con el flujo sanguíneo de los coriocapilares. Estas células no solo contienen gránulos pigmentados (o melanosomas), sino ciertos orgánulos responsables de la digestión de las membranas de los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores. Además, participa en el proceso de absorción de la luz, transporte epitelial, homeostasis de los niveles iónicos y secreción y modulación del sistema inmunitario, del ciclo de retinol además de formar la barrera hematorretiniana externa por las uniones estrechas (*tight junctions*) entre ellas. La barrera hematorretiniana interna está formada por las uniones estrechas a nivel del endotelio capilar retiniano. Ambas son las encargadas,



junto con la barrera hematoacuosa, de mantener el interior del globo ocular aislado de sustancias, algunas de ellas nocivas, del torrente circulatorio (5).



**Figura 2.** Representación esquemática de las diferentes capas de la retina y los tipos celulares que la componen. Adaptado de (6).

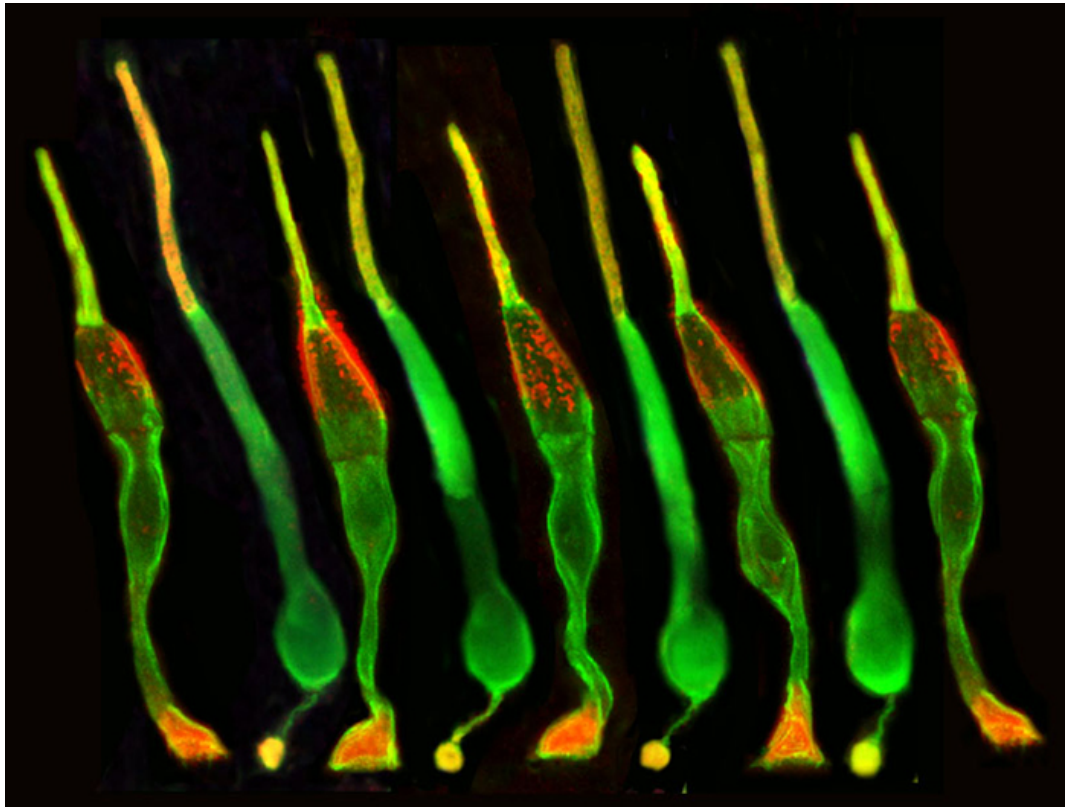
El globo ocular es el órgano receptor de la luz reflejada por los objetos; esta luz, tras atravesar la córnea y el cristalino, alcanza la parte posterior del globo ocular, donde será reflejada por el EPR y encontrará la capa de los fotorreceptores de la retina. Estas células poseen unos fotopigmentos que se activan por los fotones de la luz y convierten ésta en una señal neural por el proceso de la fototransducción. Señal que se transmite a través de las diferentes células retinianas hasta alcanzar el nervio óptico. Desde aquí se envía la información hasta el córtex visual, a una región específica del cerebro, las áreas 17, 18 y 19 de Brodman, que rodean la cisura calcarina en el lóbulo occipital, donde se procesa y “crea” una imagen detallada y con profundidad de lo que estamos viendo.

## FOTORRECEPTORES: CONOS Y BASTONES

Las retinas de los animales vertebrados contienen dos tipos distintos de fotorreceptores: los conos y los bastones. Ambos pueden dividirse en 6 partes:

1. El segmento externo (SE, *Outer Segment*, OS): en esta región encontraremos los pigmentos visuales responsables de la conversión de la luz en señales neurales. Están formados por numerosos discos apilados unos sobre otros, procedentes de invaginaciones creadas a partir de la membrana plasmática del cilio (siguiente región de los fotorreceptores). En la membrana de estos discos es donde se van a localizar los fotopigmentos. Para mantener una buena función visual es necesario que la longitud del SE permanezca constante, por lo que su proceso de renovación está altamente controlado y regulado: se produce un incremento en el número de fagosomas de las células del EPR, los cuales destruyen los discos, a la vez que se crean nuevos en la región del cilio del fotorreceptor, previamente comentado (7). Existen ciertas diferencias entre los SE de los bastones y los conos: debido a su forma cónica, la base de éstos últimos es más ancha que la de los bastones y de una longitud más corta; además, mientras que el SE de los bastones está compuesto de discos membranosos aislados de la propia membrana plasmática de la que proceden, los de los conos son continuos con ésta.
2. Cilio conector: mencionado en el caso anterior, une los segmentos interno y SE de los fotorreceptores.
3. El segmento interno (SI, *Inner Segment*, IS): altamente cargado de mitocondrias, ribosomas y distintos orgánulos como ribosomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE). En esta sección se produce la energía necesaria para que el fotorreceptor sea capaz de funcionar y se sintetizan los pigmentos que posteriormente se anclarán a la membrana plasmática y formarán parte de los discos membranosos del SE.
4. Fibra externa, que conecta el SI con el cuerpo celular.
5. El cuerpo celular del fotorreceptor, que contiene el núcleo del mismo.

- La fibra interna, un proceso axonal que finaliza en la terminación sináptica, donde se encuentran las vesículas sinápticas que liberarán los neurotransmisores a las células bipolares y horizontales durante la sinapsis (3).



*Figura 3. Imagen obtenida por inmunocitoquímica de los fotorreceptores, conos y bastones. Reproducida con permiso del Prof. Nicolás Cuenca, Universidad de Alicante Los fotorreceptores fueron teñidos con  $\alpha$ -sinucleína (en rojo), rodopsina y arrestina de cono (en verde).*

A pesar de todas estas similitudes, existen ciertos aspectos en los que difieren ambos tipos celulares y que definen sus actividades específicas:

- Horario de renovación de los discos: el proceso de renovación de los SE está controlado por los ritmos circadianos, siendo el amanecer la hora de máxima renovación de los SE de los bastones y el atardecer el momento de mayor actividad de degradación/síntesis de los de los conos.
- Conexión sináptica: los terminales sinápticos de los bastones se conocen como esférulas, y liberan glutamato como neurotransmisor en las vesículas sinápticas; estos procesos permiten 2 conexiones sinápticas, una central con las

dendritas de células bipolares y otra lateral con las de las células horizontales; por el contrario, las terminaciones de los conos se denominan pedículos, aunque liberan glutamato al igual que los bastones. En estas terminaciones dendríticas encontramos una estructura conocida como triada (8, 9) en la que podemos distinguir 3 tipos de conexiones sinápticas: dos procesos laterales procedentes de células horizontales, y un proceso central que se corresponde con una célula bipolar. También es posible encontrar conexiones tipo hendidura en los laterales de los conos (telodendria), que permiten las conexiones eléctricas entre bastones y conos adyacentes.

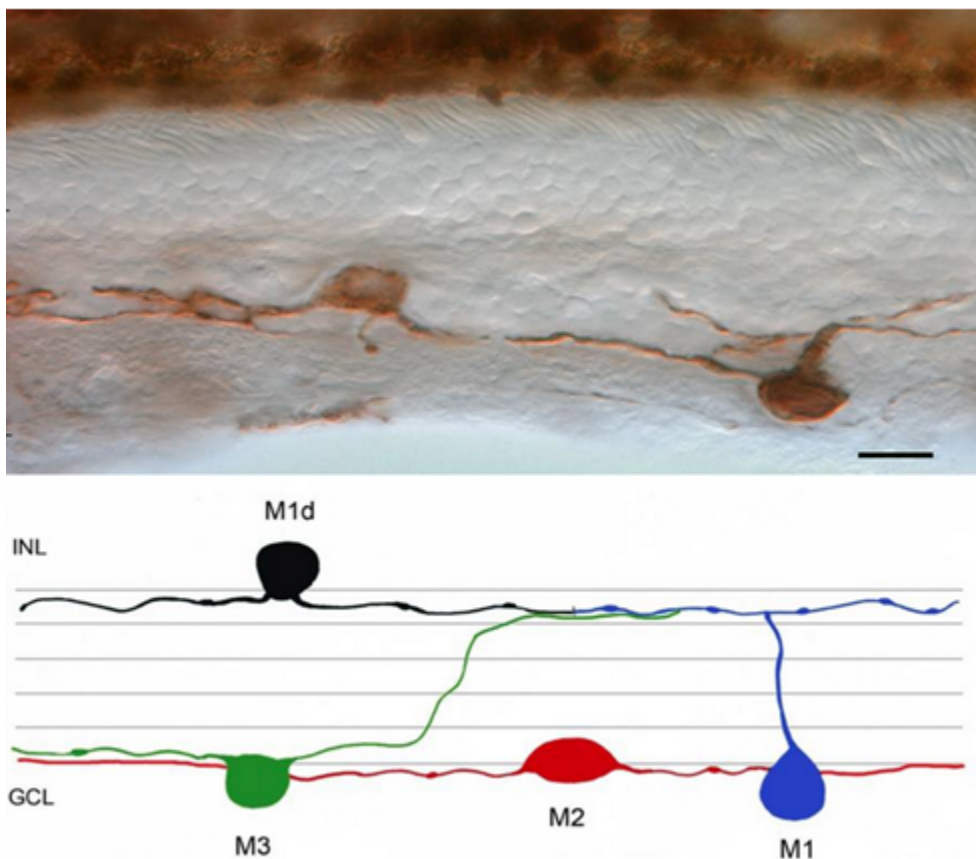
3. Existe un único tipo de pigmento visual en el caso de los bastones, la rodopsina, sensible a la luz verde y azul, mientras que en el caso de los conos existen 3 tipos de fotopigmentos, responsables de la consecuente existencia de 3 tipos de conos: conos-S, o conos de luz de longitud de onda corta cuyo pigmento nos permite la discriminación del color azul; conos-M, o conos de luz de longitud de onda media, color verde, y finalmente conos-L o conos de luz de longitud de onda larga, de color rojo. En las retinas de los primates, incluyendo por supuesto las humanas, encontramos los 3 tipos de conos, lo que aporta un tipo de visión denominada tricromática. En el caso de los roedores por ejemplo, sólo encontramos los conos de los tipos S y M-L, teniendo, por lo tanto, visión dicromática y siendo incapaces de reconocer el color rojo.
4. Los bastones son células muy sensibles a la luz, sin embargo se saturan rápidamente y su respuesta es lenta. Nos permiten la visión en condiciones de baja luminosidad, lo que se conoce como visión escotópica. Los conos son células mucho menos sensibles a la luz pero su respuesta de adaptación es mucho más rápida y son difícilmente saturables. Son responsables de la visión fotópica, es decir, nos permiten la visión en color, en condiciones de luz, y nos aporta una imagen definida y detallada de los objetos (10). Para obtener una respuesta de grado similar, en el caso de los bastones necesitaríamos un único fotón, mientras que en el caso de los conos se requerirían al menos 100 (11).

5. También en la distribución de los fotorreceptores encontramos diferencias claras: en la retina central de los primates, y particularmente de los humanos, vamos a encontrar una mayor predominancia de los conos, existiendo una región específica, la fovea, donde sólo vamos a encontrar este tipo celular y que va a ser la región asociada a nuestra mayor percepción del detalle, es decir, los conos van a ser los responsables de nuestra agudeza visual (AV). Conforme nos vamos alejando hacia la periferia, los bastones comienzan a aparecer, disponiéndose entre los conos para acabar ocupando prácticamente la CNE de la retina periférica. Esto ocurriría en la mayoría de los mamíferos, que presentan una retina dominada por los bastones, aunque su configuración macular difiere de unos a otros; estudios sugieren que en la retina humana podríamos encontrar entre 80 y 110 millones de bastones y un total de 4-5 millones de conos (3, 12).
6. Finalmente, hablar de la cantidad de conexiones sinápticas e información que son capaces de transmitir cada uno de ellos: los conos presentan varios tipos de células bipolares de conos con las que contactar, las cuales además responden de manera diferente a los estímulos lumínicos; en el caso de los bastones sólo existe un único tipo. Otra diferencia la encontraríamos en la conexión establecida con las CGR: en el caso de las bipolares de bastones, éstas no contactan directamente con las células ganglionares, sino que es necesaria una conexión intermedia con células amacrinas que transmita la información; entre estas células amacrinas destacan las células A11 y A17, aunque también encontramos otras como las células amacrinas dopaminérgicas A18, de gran relevancia. En el caso de los conos, por el contrario, se establece una conexión directa entre las células bipolares de cono y las dendritas de las células ganglionares (13). Todo esto podría traducirse en que el grado de convergencia que encontramos en el circuito que une a los conos con las CGR es menos convergente, sobre todo en la mácula, lo cual es necesario para obtener una máxima AV en dicha área. El hecho de que el circuito de los bastones sea más convergente lo convierte en un mejor detector de la luz, ya que la unión de numerosas señales, de pequeña intensidad, procedentes de distintos bastones

generará una respuesta mayor sobre una célula bipolar. Esta misma convergencia es la responsable de la disminución en la resolución espacial, que encontramos en el sistema de los bastones.

## CÉLULAS GANGLIONARES

A pesar de que anteriormente se ha establecido que conos y bastones son los únicos fotorreceptores de la retina, hacia el inicio del siglo XXI se descubrió un tercer tipo, dentro del grupo de CGR, las células ganglionares retinianas fotosensibles.



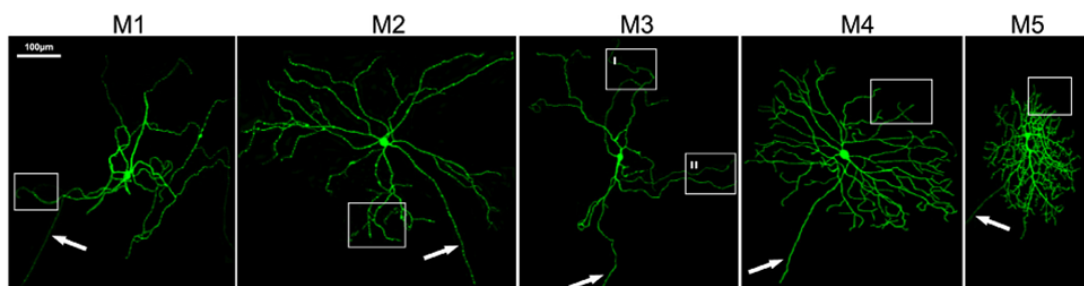
**Figura 4.** Imagen representativa de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en retina humana. Adaptado de (14).

Éstas utilizan un fotorpigmento distinto a los anteriormente mencionados, la melanopsina, descubierto por primera vez en los melanocitos de *Xenopus laevis* (de ahí su nombre) (15). Esta proteína G transmembrana es mucho menos sensible a la luz, da una respuesta más lenta y presenta una resolución espacial mucho más baja. Sin embargo, a diferencia de los otros fotorreceptores, estas células son capaces de



comunicarse directamente con los centros visuales cerebrales, aportando información al cerebro sobre los niveles de luz ambientales (16) y llevan a cabo su propio mecanismo de fototransducción, muy similar al observado al proceso dado en invertebrados (17). Estas neuronas, bautizadas con el nombre de células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs) compondrían menos de un 5% del total de células ganglionares. Entre sus funciones encontraríamos el control del reflejo pupilar en función de la luz, regulación neuroendocrina (producción de melatonina), sincronización de los ritmos de sueño/vigilia (ritmos circadianos) (15, 16, 18, 19). También participan a través de su actuación sobre la zona sub-paraventricular en procesos implicados en la termorregulación y regulación hormonal (20).

Existen también diversas subclases dentro de este grupo celular, las cuales se diferenciarán en su morfología, fisiología y proyecciones; dependiendo de la especie existirán más o menos subtipos, encontrando 5 tipos en los roedores (ver Figura 5) y 2 en primates y humanos (18, 21). En el caso de los roedores, el subtipo M1 sería la responsable de la sincronización lumínica (*photoentrainment*) circadiana y el reflejo pupilar y actuaría independientemente del resto mientras que la M4 contribuye a la sensibilidad al contraste (SC) y formaría clusters con el subtipo M2 (17); el M5 participarían en mecanismos de la visión, concretamente en la visión del color, postulándose candidatas a ser las responsables de la influencia del color en las alteraciones en los ritmos circadianos; éste a su vez formaría clusters con el subtipo celular M3 (22). Las células M2-M5 participarían en el análisis de la forma del estímulo visual y todas menos M5 responden al movimiento del estímulo, participando en la determinación de la velocidad del mismo (23).



**Figura 5.** Representación de la morfología de los 5 tipos de células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipCGR) encontrados en la retina de rata. Adaptado de (24).

## SISTEMA INMUNITARIO DE LA RETINA

Como ya se ha comentado previamente, además de existir células neuronales en la retina, podemos encontrar varios tipos de células no neuronales en varias de las capas de la misma. Es necesario mencionar, debido a su importancia las células de Müller, los astrocitos (componentes de la conocida macroglía) y las células de la microglía. Ambos conjuntos conformarían la llamada neuroglía. La glía es un conjunto de células pertenecientes al sistema inmunitario que residen tanto en la retina como a nivel del nervio óptico, y que son responsables de dar una respuesta rápida ante la presencia de cualquier tipo de daño, para salvaguardar el tejido nervioso, del cual, como ya se ha mencionado previamente, la retina forma parte (25).

Las **células de Müller** son las principales y más grandes células neurogliales que encontramos en la retina. Se extienden de forma que están en contacto, no sólo con las células neuronales sino también con la capa de vasos sanguíneos retinianos. Entre sus funciones debemos nombrar, la captación y reciclaje de neurotransmisores, componentes del ácido retinoico y ciertos iones, el control del metabolismo y aporte de nutrientes a la retina, producción de factores de crecimiento para el mantenimiento retiniano y finalmente la regulación del flujo sanguíneo y mantenimiento de la barrera hematorretiniana. Al establecer contacto con las células neuronales, son partícipes activos en el proceso de la neurotransmisión, captando y eliminando los neurotransmisores como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutamato, y de esta forma, previniendo la neurotoxicidad que podrían crear altos niveles de estas moléculas en la retina (26, 27). Un aspecto a tener en cuenta al estudiar la salud retiniana, es el hecho de que estas células contribuyen en la respuesta obtenida en los electroretinogramas (ERG) gracias a su participación en el control de los niveles de iones de potasio (28). También presentan canales iónicos de sodio y calcio, además de una amplia variedad de receptores de aminoácidos, catecolaminas, hormonas y factores de crecimiento entre otros, gracias a los cuales modulan la respuesta neuronal (29, 30).

Los **astrocitos** son un tipo de célula glial que no procede del neuroepitelio retiniano, sin embargo formará parte de la retina gracias a su entrada a través del



nervio óptico en desarrollo. Debido a esto, en su distribución destaca claramente una predominancia en la zona de la papila óptica y sus niveles van disminuyendo hacia la retina central, desapareciendo finalmente en la ora serrata (28). Los procesos de los astrocitos se disponen a lo largo de los axones de las CGR, recorriendo la CFNR. Forman una especie de red de apoyo para dicha capa de fibras nerviosas y las CCG. Contribuyen a nivel de la MLI y presentarían algunas de las funciones de las células de Müller (3, 31). Estas células también presentan un papel fundamental en el control de la barrera hematorretiniana, ya que se ha demostrado que secretan una serie de factores capaces de modular y mantener esta barrera, además de ser capaces de controlar el flujo sanguíneo de los vasos sanguíneos en función de la actividad neuronal (32).

Finalmente, las **células de la microglía**, consideradas piezas clave en los procesos inflamatorios. En el sistema nervioso central (SNC), este tipo celular está continuamente controlando el tejido, y es capaz de actuar rápidamente ante cualquier daño, movilizándose, y sintetizando y liberando multitud de citoquinas, quimiocinas, factores neurotróficos y neurotransmisores, los cuales les permitirán interactuar con los distintos tipos celulares y desencadenar efectos protectores o citotóxicos (dependiendo del daño y del tejido). Bajo condiciones fisiológicas, no sólo son importantes elementos en el proceso de la inflamación, sino que participan en el desarrollo de las conexiones sinápticas, neurogénesis y contribuyen a la homeostasis del cerebro. Ante un daño tisular agudo, la microglía actúa como parte del sistema inmune innato. A pesar de ser células importantes en los procesos inflamatorios, también son capaces de detectar y responder antes daños neurológicos a través de mecanismos no inflamatorios. Sin embargo, hay que tener en cuenta algo sumamente importante en relación a estas células: una respuesta inflamatoria prolongada ante un daño activará de forma crónica la microglía, desencadenando el proceso conocido como gliosis crónica, es decir, produciéndose una excesiva proliferación e hipertrofia de las células gliales que, no sólo dejarán de actuar de forma beneficiosa y neuroprotectora, sino que ejercerán el efecto contrario, neurotóxico. A este respecto existen multitud de estudios que demuestran el importante papel de estos tipos celulares en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas y en su

progresión, incrementando la permeabilidad vascular, infiltración de componentes tóxicos, en incluso estimulando la neovascularización (25, 33-38).

## **VISIÓN**

Numerosas conexiones entre las neuronas retinianas y el resto de células que componen la retina, son las responsables de la imagen final que se forma de los objetos que observamos. A grandes rasgos, la luz reflejada por los objetos atraviesa todas las capas de la retina, se refleja en el EPR e inicia el ciclo visual a nivel de los fotorreceptores. Una vez la luz alcanza los fotorreceptores dispuestos en sus SE, se inicia una cascada de reacciones que permiten la transducción y la transmisión de información desde los conos y los bastones hacia las células bipolares y amacrinas, y desde éstas, hasta las células ganglionares, cuyos axones finalmente la enviarán, a través del nervio óptico, hasta el córtex visual (3). Dentro de todo este proceso, es indispensable la reacción de la fototransducción. Ésta es la responsable de la conversión de los fotones de luz que llegan a los fotorreceptores, a señales eléctricas, y en este paso es indispensable la actuación de los pigmentos visuales mencionados previamente: la rodopsina en los bastones y las distintas opsinas en los conos. Presentan ciertas diferencias en sus cadenas de aminoácidos, sin embargo, todos ellos comparten la presencia en su estructura del 11-cis-retinal, un cromóforo derivado de la vitamina A y cuyo cambio estructural tras la captación de un fotón de luz, inicia la fototransducción. Modificaciones en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas son las causantes de modificaciones estructurales de las mismas, las cuales impiden una correcta actuación y producen la degeneración de los fotorreceptores causando enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la Retinosis Pigmentaria (RP) (39-41).

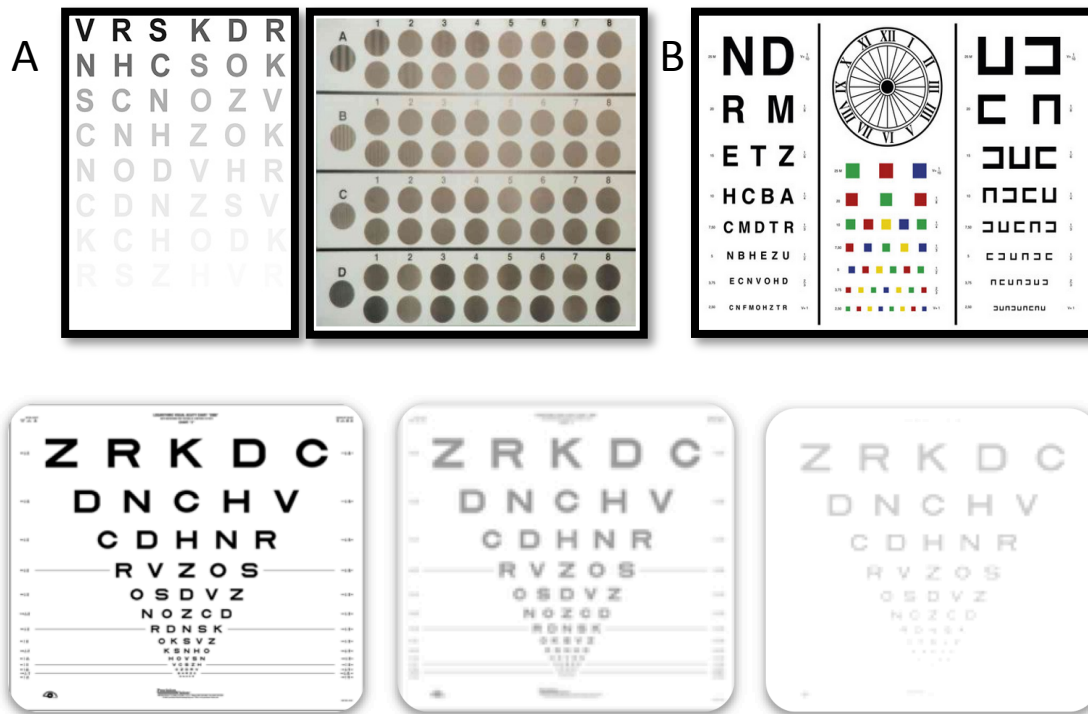
Como ya se ha descrito previamente, las células ganglionares son las responsables de enviar la información recibida y transmitida a lo largo de toda la retina a través de sus axones hasta el cerebro. Estas células se dividen en unos 20 subcategorías, las cuales se diferencian en sus diferentes estructuras dendríticas y conexiones sinápticas (42, 43). Al establecer sinapsis con distintas células bipolares y amacrinas, y a distintos niveles dentro de la organización de capas retiniana, la

información que reciben también será diferente: color y tamaño del objeto, así como velocidad y dirección del movimiento (44).

Al igual que son los conos los principales responsables de nuestra capacidad para discernir los detalles de los objetos, es decir, de nuestra AV, en el caso de la SC, lo son las células ganglionares (45, 46). El contraste es la diferencia de brillo que existe en un patrón, entre las fases blancas y negras. La menor diferencia detectada posible se conoce como el umbral y se determina a una frecuencia espacial concreta. La relación de la SC con su frecuencia espacial se denomina función de la sensibilidad al contraste (FSC, *spatial contrast sensitivity function, CSF*) (47). Este parámetro nos sirve para evaluar de forma más completa la calidad del sistema visual, y nos aporta una curva que determinará o no una estimulación de la frecuencia espacial de las células ganglionares óptima.

A la hora de analizar estos dos parámetros se utilizan diferentes técnicas, ya estemos hablando de clínica humana o investigación con modelos animales:

En el primer caso estaríamos refiriéndonos a unos test específicos, utilizados en las consultas de Oftalmología, como los que se muestran en la Figura 6. En estos exámenes, se observan unas letras las cuales irán variando en cuanto al tamaño o el contraste, en función del parámetro analizado.



**Figura 6.** Distintos test de visión para evaluar la sensibilidad al contraste (A) y la agudeza visual (B) Cartas ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) de contraste 100% (izquierda), de 2,5% (centro) y de 1,25% (derecha). Adaptado de (48).

En el segundo caso, actualmente existe un método no invasivo que nos aporta información de la degeneración experimentada por el animal (roedor) en los conos y los bastones, conocido como Optomotor (OptoMotry®; CerebralMechanics, Lethbride, Alberta, Canada (48). Además, no es necesario el sacrificio del animal tras dicho estudio, por lo que permite el análisis de un mismo animal a lo largo del tiempo (49).

## FUNCIONES NO VISUALES DE LA RETINA

A pesar de que la retina se relaciona principalmente con el sentido de la vista, también presenta otras muchas funciones no visuales imprescindibles para la vida, algunas de las cuales ya se han introducido previamente. Entre ellas ha de destacar el control de los ritmos circadianos.

La luz es detectada por 3 tipos distintos de neuronas presentes en la retina: los conos y bastones, de los cuales se ha hablado previamente, y las ipCGRs. Éstas últimas

están implicadas en procesos no visuales como la regulación de los ritmos circadianos, la respuesta pupilar a la luz, desarrollo de la vasculatura retiniana, etc. (50). Por ritmos circadianos entendemos un conjunto de oscilaciones de aproximadamente 24 horas, producidas a nivel endógeno, pero sincronizadas con cambios medioambientales como por ejemplo los ciclos de día/noche o las estaciones, derivados del movimiento de rotación y traslación de la Tierra. Factores como la temperatura corporal, los niveles de hormonas y el ritmo de sueño y vigilia entre otros, presentan ritmos circadianos, de ahí la importancia biológica que presenta el correcto control de este sistema. El principal centro regulador de los ritmos circadianos en los vertebrados se encuentra en el cerebro, concretamente en el núcleo supraquiasmático (NSQ), a nivel del hipotálamo: la luz alcanza la retina y se transmite a través del tracto retino-hipotalámico hasta el NSQ, donde se establecerán las señales que correspondan: como ejemplo, la luz durante el día suprime la síntesis y liberación de melatonina pineal (51). Sin embargo, no es el único “reloj” regulador del sistema circadiano, si no que existen múltiples reguladores circadianos en distintos tejidos periféricos que conjuntamente trabajarán para lograr un correcto control de los ritmos (52). Numerosos estudios apoyan la idea de la existencia de un reloj circadiano a nivel de la retina: ciertos parámetros como los niveles de neurotransmisores como el GABA o la dopamina o de pigmentos visuales o procesos como la fagocitosis de los SE de los fotorreceptores van a presentar variaciones en función del momento del día en el que se analicen (53, 54).

El centro de control de los ritmos de sueño y vigilia se sitúa en el cerebro, como hemos comentado a nivel del NSQ del hipotálamo, que está en contacto directo con el quiasma óptico, relacionándose de esta forma con el exterior. Este reloj circadiano presenta una oscilación endógena de aproximadamente 24 horas y a su vez ha de estar sincronizado con el ciclo de 24 horas exógeno, a fin de permitir las actividades durante el periodo luminoso. Además existen ciertos parámetros corporales regulados por este “reloj biológico” como serían la utilización óptima de nuestras habilidades cognitivas, el estado de vigilancia y el control de la temperatura corporal, más típicos del día, y la secreción de la hormona melatonina, control del sueño y la consolidación mnésica o consolidación de la memoria y los recuerdos (hecho indispensable en los procesos de aprendizaje), más típicos de noche (55, 56). Una buena sincronización del ritmo

circadiano es importante debido a que también estaría relacionado en el control de proceso de apoptosis, división celular y reparación del ADN, además de en procesos inmunológicos (55, 57, 58).

El reloj circadiano deriva de los llamados “genes reloj”, los cuales permiten mantener en todos los órganos y tejidos periféricos la sincronía circadiana, ya que se expresan en la mayoría de las células; a pesar de éstos, es necesaria la correcta actuación de una compleja red de conexiones que regularán a su vez la secreción de hormonas y procesos metabólicos (58).

En esta ritmicidad circadiana es necesario destacar los genes *Per 1 y 2*, *Cry 1 y 2*, *Bmal1* y *Clock* (57). Se ha estudiado la expresión de estos activadores/represores transcripcionales en todas las células de la retina y hay que destacar el hecho de que se presenten en mayor o menor medida en todas las células, mostrando oscilaciones en función del momento del día (53, 59-62), y demostrando que la retina presenta un ritmo circadiano independiente del establecido por el NSQ que le permite adaptarse a las diferentes condiciones lumínicas del ambiente (59, 63, 64). Además, esto apoya estudios en los que se demuestra que pacientes que padecen ciertas enfermedades degenerativas de la retina pero en los que se mantiene la percepción de la luz, mantienen la ritmicidad de sus ritmos biológicos mucho mejor que aquellas personas que son incapaces de percibirla después de la evolución de la enfermedad (20, 65).

Cuando hablamos de ritmos biológicos y control de los estados de sueño y vigilia, hay que mencionar una hormona secretada principalmente por la glándula pineal y de gran relevancia para el correcto control de estos procesos: melatonina.

Se han observado alteraciones en los patrones de sueño en personas de edad avanzada y en pacientes que sufren patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, Huntington... (66, 67). Con la edad se produce un descenso en la síntesis de melatonina; esta hormona, junto a la dopamina son los principales neurotransmisores que participan en la regulación del ciclo del día y la noche, de ahí que la desorganización retiniana que se produce en ciertas patologías neurodegenerativas como la RP o en la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) avanzada pueda afectar a la regulación de las fases del sistema circadiano en respuesta a la luz (51).

Pacientes que sufren la enfermedad RP, en estadíos terminales de la misma, presentan una mala calidad del sueño y disminución de parámetros como la latencia, la duración y la eficiencia del sueño (68). Algo parecido sucede en los casos de aquellas personas que trabajan a turnos, donde se observa un patrón alterado en la producción de melatonina y, de igual forma, se da una alteración de los ritmos circadianos, debido a la existencia de una desincronización entre los ritmos de producción del cortisol y melatonina y los pico de máxima y mínima temperatura corporal. Existen un sinnúmero de estudios que demuestran la importancia de un correcto patrón del sueño cuando hablamos de la salud: personas que trabajan por la noche o a turnos presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones médicas crónicas, enfermedades cardiovasculares, obesidad, irregularidades hormonales, cáncer, problemas gastrointestinales... (69).

## RETINOSIS PIGMENTARIA

La retina humana es una compleja estructura cuya correcta función depende de una correcta organización de neuronas, células gliales y vasos sanguíneos. Cuando alguno de estos componentes falla, toda la retina se ve comprometida, afectando a la calidad de nuestra visión y demás funciones no visuales.

Existen numerosas causas por las que la retina se puede ver dañada: enfermedades neurodegenerativas hereditarias, asociadas al envejecimiento, por procesos inflamatorios o infecciosos o asociadas a otras enfermedades sistémicas, desprendimiento de retina regmatógeno posterior a un desprendimiento de vítreo posterior u otros daños/traumas producidos por algún agente externo que pueden desembocar también en lesiones retinianas entre otros.

Dentro de grupo de Distrofias Hereditarias de la Retina (DHR) destaca, por su alta prevalencia, la RP. Se otorga el término RP a un conjunto de enfermedades degenerativas de la retina, hereditarias, que afectan preferentemente a las células fotorreceptoras, bastones y secundariamente conos, causando una desorganización de

la retina, soliendo llegar, con el avance de la enfermedad, en estadíos avanzados a alcanzar la ceguera legal. En España a efectos normativos, para ser afiliado a la O.N.C.E (Organización Nacional de Ciegos Españoles) se considera ceguera legal cuando la AV del mejor ojo es inferior a 1/10 y/o el paciente presenta un campo visual (CV) reducido en su periferia a los 10° centrales o inferior (70). La DHR con pérdida predominante de conos y por tanto de la visión central, es la Enfermedad de Stargardt (71).

## PREVALENCIA E INCIDENCIA

La RP es la primera causa de ceguera hereditaria (72), que afecta actualmente a 1 de cada 3.500 personas en el mundo desarrollado, aunque su prevalencia varía en función del país o de la etnia de la que hablemos (73-78).

Su baja incidencia hace que se englobe en las conocidas como “enfermedades raras”, aunque la padecen aproximadamente 1,6 millones de personas en todo el mundo, y representa una de las principales causas de afectación visual y ceguera en personas menores de 60 años.

## HISTORIA

La primera descripción realizada de esta enfermedad, la realizó Rüdiger F. Ovelgün en 1744 en el que hablaba de una familia cuyos miembros sufrían ceguera nocturna; sin embargo, se le atribuye a Franz Cornelius Donders en 1855 y 1857, que fue realmente quien introdujo por primera vez el término “Retinosis Pigmentaria” para describir esta enfermedad, utilizando un oftalmoscopio. También se han encontrado descripciones de síntomas parecidos en el análisis de casos realizados por Schon y Von Ammon en 1938 y las de Van Trigt en 1853 y Ruete en 1854 (79-81).

El primer artículo encontrado en “*PubMed*” data del año 1878, en el cual David Webster (82) analiza varios casos de pacientes que sufren de RP y trata de establecer las causas de la misma: se postulaba la implicación de la consanguinidad y la sífilis como algunas de las principales causas de la enfermedad. También se observaban familias en las que la enfermedad se remontaba a aproximadamente 200 años antes y que afectaba a prácticamente la mitad de la descendencia. Por los conocimientos



actuales se puede comprender que el factor genético es sumamente importante en todas las modalidades de herencia de la RP. El hecho de poseer padres con parentescos familiares incrementa la probabilidad de heredar el gen por parte del hijo: por esto había médicos que otorgaban a la consanguinidad un papel tan importante, y otros en cambio no veían relación alguna en los casos que estudiaban. La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* y que, en el caso de no ser tratada, acaba afectando al SNC y al sistema vascular. A nivel ocular causa daños en capa vascular (coroides), cristalino, iris, retina, conjuntiva, esclera, córnea, nervio óptico, nervios craneales que participan en los movimientos extraoculares, y mecanismos retinomotores. Una de las afectaciones más comunes es la coriorretinitis, que presenta algunos rasgos comunes con la RP como son la ceguera nocturna y cierta pigmentación en el fondo de ojo, con lo cual es de obligado diagnóstico diferencial, sobre todo en formas de afectación unilateral (83). Estas complicaciones de la sífilis podrían haberse visto confundidas en el siglo XIX con RP, dando pie a pensar en que la aparición de la degeneración retiniana fuese secundaria a la otra patología, cuando en realidad no es así (tampoco los autores se ponían de acuerdo ya que existían casos donde se encontraba relación entre ambas enfermedades y otros no).

## SINTOMATOLOGÍA

A pesar de estas discrepancias en torno a la enfermedad en el pasado, las cuales se han ido aclarando gracias al avance de la Ciencia, existen ciertos síntomas claros:

- Ceguera nocturna o nictalopía: se produce por la afectación de los bastones, apareciendo dificultad de visión en condiciones de baja luminosidad. Debido a la heterogeneidad en las mutaciones e interindividual, puede aparecer tanto en la infancia como en la adolescencia. Además su detección actualmente tiende a volverse cada vez más complicada, debido al exceso de iluminación artificial con las que convivimos.

- Visión en túnel: la degeneración de los bastones, que se disponen mayoritariamente en la periferia de la retina, va a dar lugar a una pérdida del CV periférico. Estas alteraciones campimétricas comienzan entre los 30° y 50°, donde encontramos la mayor densidad de bastones. A partir de aquí, la degeneración irá progresando y, en casos evolucionados, el paciente mantendrá exclusivamente la región central: la correspondiente a la mácula, donde sólo encontraremos conos.
- Modificaciones tanto en la AV como en la SC (84, 85), al igual que en las amplitudes de las ondas a y b de los ERG. La onda a está originada en la capa de los fotorreceptores, mientras que la onda b se origina en la capa de las células bipolares y de Müller (86). Las variaciones serán de mayor o menor grado y aparecerán antes o después en función del tipo de mutación que se presencie: de herencia dominante (adRP), recesiva (arRP) o ligada a X (XIRP). Estas alteraciones electrofisiológicas se observan antes que los síntomas y, dependiendo del estadio en el que se encuentre el paciente, se apreciarán cambios en la amplitud y latencia de la respuesta dada por los bastones (en fases tempranas) como también de la de los conos (fases más avanzadas). En estadios terminales ambas respuestas serán nulas.
- En las exploraciones realizadas en el fondo de ojo, se observan acúmulos de pigmento, generalmente de morfología similar a espículas óseas, a nivel de la periferia o media periferia, los cuales son responsables del nombre de esta enfermedad. Aunque en esta enfermedad generalmente las primeras células en verse afectadas son los fotorreceptores, con el progresivo avance de la misma se van a ver alteradas el resto de células que conforman la retina, entre ellas las células del EPR. Ante la pérdida de los fotorreceptores, se produce una migración por parte de estas células hacia la retina neural donde se disponen alrededor de los vasos sanguíneos y cerca de la MLI (87). Además estas células, a pesar de que comparten ciertas características con aquellas que permanecen a nivel del EPR (microvellosidades a nivel apical, uniones intercelulares y lámina basal), no presentan gránulos de lipofuscina y carecen de invaginaciones en el plasmalema formando en su lugar, procesos basales con forma de dedo

orientados hacia la matriz extracelular. Además son inmunonegativas a la proteína de unión al retinaldehído (CRALBP), molécula importante en las células del EPR y que participa en el ciclo visual (88).

- También se va a observar la cabeza del nervio óptico de un color pálido amarillento, y una esclerosis de los vasos sanguíneos arteriolares debido al acúmulo de matriz extracelular entre el endotelio vascular y las células pigmentadas (89).
- En muchos casos se han observado alteraciones de la visión cromática en fases tardías de la enfermedad, debidas a la degeneración de los conos, consecuencia de la apoptosis de los bastones (90, 91).

## FORMAS HEREDITARIAS

Al existir numerosas formas de RP, pueden ser transmitidas por todas las formas posibles de herencia monogénica: **autosómica dominante** (adRP), responsable del 30-40% de los casos; **autosómica recesiva** (arRP), 50-60% de los casos; y **recesiva ligada al cromosoma X** (XIRP), la menos común, afectando al 5-15% de los pacientes, y que es responsable de las formas más severas de la enfermedad. Existen algunos casos en los que la enfermedad aparece sin que existan antecedentes familiares, debido a una mutación nueva en un gen de herencia aD, a una etiología multifactorial o fenocopias medioambientales o descendencia de unos progenitores que estén afectados como mínimo por una mutación de herencia aD (92, 93).

Además, a todo esto hay que añadir la posibilidad de que la enfermedad esté asociada a otras enfermedades no oculares: formas sindrómicas de la RP, de las cuales existen más de 30 tipos. Destacar el **Síndrome de Usher**, responsable del 10-20% de los casos de RP, y que cursa con una mutación que causa sordera neurosensorial de distinta gravedad según el tipo de Usher, desde el nacimiento (tipo I), leve o moderada, no progresiva (tipo II) o pérdida progresiva con los años (tipo III), dependiendo de la mutación (94, 95); el **síndrome de Bardet-Biedl** es una ciliopatía autosómica recesiva causa del 5-6% de los casos con RP y caracterizada por distrofia de

bastones y conos, dificultades en el aprendizaje, polidactilia (en aproximadamente el 95% de los casos), obesidad (entre el 72 y el 92% de los pacientes padecen obesidad en la niñez y va empeorando con la edad), malformaciones genitales y afectación renal (96-98).

## MUTACIONES CAUSANTES

Existen más de 60 genes los cuales pueden verse afectados por mutaciones, desembocando en la enfermedad RP. Las mutaciones van describiéndose y actualizando con rapidez (99-101). Su actualización aparece en <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>. De éstos, el gen de la rodopsina es uno de los más importantes, habiéndose detectado más de 140 mutaciones (91, 99).

Las formas más frecuentes que se dan en los casos de adRP están asociadas a mutaciones en el gen de la rodopsina (RHO) (102). Éstas alcanzarían el 25% de las mutaciones de este tipo de herencia y se han clasificado en 6 grupos en función dónde encontramos la mutación y el efecto biológico que desencadena (103). Sin embargo, la mayoría se encontrarían en los primeros 2 grupos:

1. Grupo 1: Aquí encontramos aquellas mutaciones en las cuales la proteína experimenta un correcto plegamiento, pero no es capaz de transportarse correctamente al SE de los bastones. Estas mutaciones suelen producirse predominantemente en el extremo C-terminal de la proteína, afectando al transporte post-Golgi de la rodopsina. Un ejemplo lo encontraríamos en el modelo animal S334ter: este animal presentaría un codón de terminación en el residuo 334, el cual produciría una rodopsina carente de los últimos 15 aminoácidos del extremos C-terminal, y todos sus sitios de fosforilación (104). Estas proteínas interferirían de varias formas en la viabilidad celular, desembocando en la muerte de los fotorreceptores: interfiriendo en el tráfico vesicular normal, afectando a procesos que se dan a nivel de la membrana plasmática y/o por el acúmulo de proteína mutada degradada por el proteasoma en el interior celular.

2. Grupo 2: la sustitución de la prolina por la histidina en la posición 23 en el gen de la rodopsina (P23H-RHO) pertenecería a las mutaciones de la categoría 2. Estas mutaciones conllevan un mal plegamiento de la rodopsina, por lo que son retenidas por el RE, siendo incapaces de formar un cromóforo funcional con el 11-cis retinal. Serán, por lo tanto, transportados al citoplasma para su posterior degradación por el proteasoma. En las ratas P23H línea 3 (P23H-3 RHO) no se han identificado mecanismos celulares de señalización implicados en el proceso de degeneración de los receptores, distintos del conocido como “respuesta a proteínas mal plegadas” (*Unfolded Protein Response*, UPR), y que es llevado a cabo por el sistema proteasoma-ubiquitina (*Ubiquitin-Proteasome System*, UPS). Este proceso se inicia por la activación de 3 mecanismos de señalización y se necesita para controlar la capacidad del RE en el proceso de plegamiento de proteínas y en el reestablecimiento de la homeostasis celular. El UPR también desencadena el mecanismo de apoptosis, eliminando cualquier célula incapaz de reestablecer correctamente el plegamiento proteico. Se ha demostrado que los fotorreceptores del modelo P23H-3 RHO presentan activada la caspasa-7 inducida por el estrés del RE y presentan también un aumento en la expresión génica de Bip y CHOP (chaperona y factor de transcripción pro-apoptótico, respectivamente). Estos resultados sugieren que el estrés en el RE persiste en los fotorreceptores P23H-3 RHO, lo cual estimularía una señalización apoptótica en estos animales. Sin embargo existen otros mecanismos pocos estudiados que también se ven implicados, mediados por los niveles de  $Ca^{2+}$ , desencadenando la activación de caspasas y calpainas. También la autofagia, principal mecanismo de degradación tras la activación del UPR en células neuronales, podría estar implicado por la regulación positiva de ciertas proteínas que favorecen la formación de los fagosomas, en los casos de estrés crónico del RE. La autofagia se produce de forma basal en los fotorreceptores, en el procesamiento de los SE. En las enfermedades degenerativas retinianas, se observa una activación de la UPR y la alteración de la cascada de señalización de la autofagia (105-108). En otros modelos de mutaciones pertenecientes a esta categoría (T17M, mutación que también impide la

correcta unión de la rodopsina con el 11-cis retinal, y por lo tanto presenta efectos similares a la mutación P23H) también se han demostrado niveles elevados de proteínas pro-apoptóticas en retina (109).

3. Grupo 3: en estas mutaciones encontramos problemas a nivel de la endocitosis. Un ejemplo es el caso de las mutaciones de la arginina en posición 135, responsables de una variante severa de la enfermedad. En estos casos encontramos una proteína hiperfosforilada que presenta gran afinidad por la arrestina visual, traslocándola del citoplasma a la membrana plasmática y a los compartimentos endocíticos, alterando además la morfología de los compartimentos endosomales y dañando las funciones endocíticas mediadas por receptor de la célula (110).
4. No van a afectar al plegamiento *per se*, pero sí a su estabilidad y a las modificaciones post-traduccionales. Una mutación en posición 4, añadiendo una carga positiva, a la vez que se producen en la asparagina en posición 2 un fallo de glicosilación. La combinación de ambos errores lleva a una modificación del sitio de unión del cromóforo, el cual se liberará más rápidamente de lo debido: la molécula opsínica es más tóxica para la célula cuando no se encuentra unida al 11-cis retinal; también presenta menor resistencia al calor. Esta mutación también causa acúmulo de la proteína en el RE y/o fallos a nivel de transporte a los SE de los fotorreceptores, encontrando variaciones en la membrana lipídica de los discos. También se ha visto estimulada la activación de los mecanismos autofágicos y apoptóticos, iguales que en las mutaciones anteriores (111, 112).
5. Los mutantes de esta clase no presentan defectos en el plegamiento iniciales obvios, pero muestran un incremento en la tasa de activación de la transducina. Mutaciones como M44T y V137M, se incluirían en esta categoría: se producen modificaciones a nivel de las hélices transmembrana de la proteína, que no alteran el plegamiento de la rodopsina, pero que alteran el equilibrio de la cascada de reacciones producidas en la fototransducción (113).

6. Los mutantes que parecen plegarse correctamente pero que llevan a la activación constitutiva de la opsina en ausencia de cromóforo y en el periodo de oscuridad formarían parte de este grupo. Las mutaciones de este grupo, sin embargo, causarían ceguera nocturna estacional congénita, y no adRP (103).

## FISIOPATOLOGÍA

Se ha observado que en las degeneraciones retinianas como la RP, a pesar de que la causa inicial de las enfermedades sean mutaciones que afecten a un tipo celular en concreto, como por ejemplo la mutación P23H que afecta únicamente a los bastones, se produce un incremento del estrés oxidativo que sufren los fotorreceptores, lo que ocasiona la muerte progresiva de los mismos, lo que a su vez produce alteraciones visuales y una pérdida gradual de otras funciones no visuales de la retina. La hipótesis del estrés oxidativo se basa en la idea de que la muerte de los bastones en los estadios iniciales de la enfermedad conlleva un incremento en los niveles de oxígeno ( $O_2$ ) en la retina, que produce un desequilibrio en el estado redox. Los conos son incapaces de hacer frente a este exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), por lo que sufren también el proceso de apoptosis, produciendo una atrofia general de la retina y favoreciendo la progresión de la enfermedad (114, 115). Además, se ha comprobado una disminución en los niveles de los sistemas antioxidantes tanto de pacientes como de modelos animales que sufren esta enfermedad, lo cual apoyaría esta teoría (116).

## ESTRÉS OXIDATIVO

### RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) son moléculas que poseen un electrón desapareado en su última capa. Esta definición incluye átomos (como el de hidrógeno), metales de transición y moléculas (como la de  $O_2$ , que presenta dos electrones desapareados, cada uno de ellos en un orbital de unión  $\pi^*$  diferente) (Figura 7). El electrón

desapareado o solitario tiene un momento magnético o *spin* no compensado llamado “magnetón Bohr”. Esta característica los convierte en elementos altamente reactivos y con una vida corta. Una vez generados, los RL difunden unos pocos angstroms antes de interactuar con otra molécula. La situación más estable para las moléculas es presentar los electrones de su última capa apareados, por lo que, aquellas que no los presenten, tenderán a captar electrones (agentes oxidantes) o cederlos (agentes reductores) a otras moléculas para alcanzar la situación energética más estable.

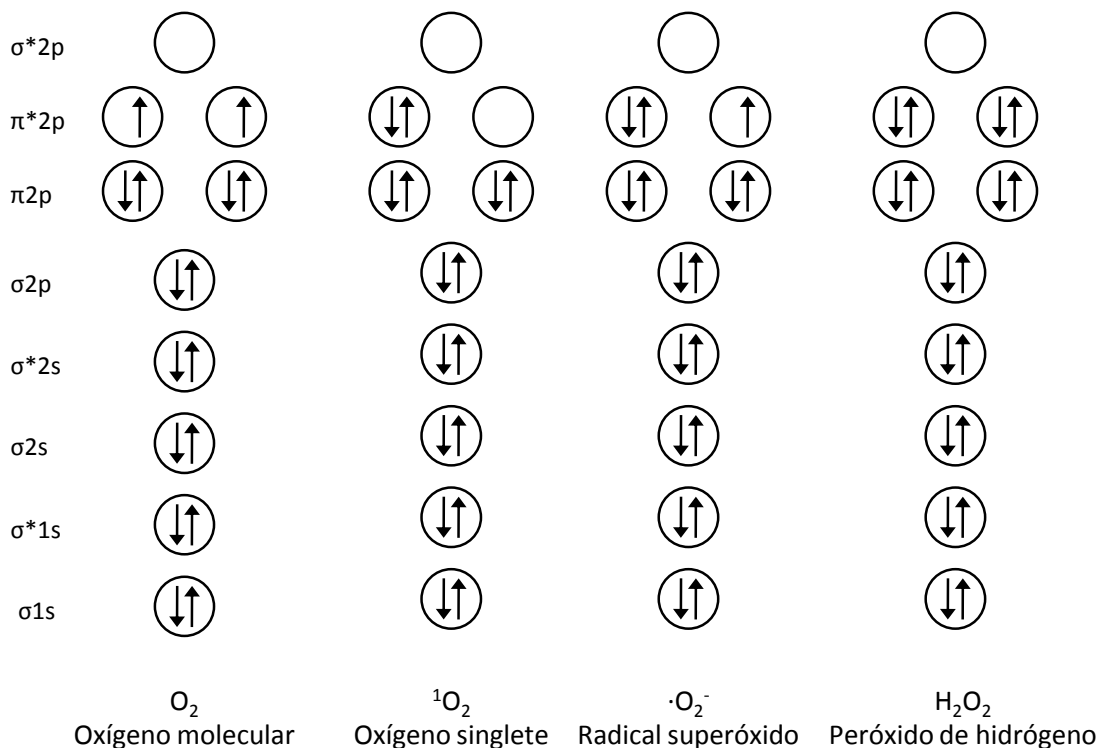


Figura 7. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno.

Si interactúa con un no-radical puede continuar indefinidamente, ya que, el RL que ha captado un electrón y ha estabilizado su última capa, lo ha hecho a expensas de la inestabilidad de otra molécula, la cual se convierte a su vez en RL y repetirá el proceso descrito (reacciones en cadena como las que se producen en la peroxidación lipídica (LPO)); si son dos radicales los que entran en contacto, en las condiciones adecuadas, podrían combinarse dándose lo que se conoce como reacciones terminales. Habitualmente los metales de transición se disponen en los centros activos de las enzimas oxidasas, oxigenasas... aceptando y donando electrones en reacciones de oxidación/reducción (117). Entre los RL encontramos hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), superóxido



( $O_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), dióxido de nitrógeno ( $\cdot NO_2$ ), peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ) y lípido peroxilo ( $LOO^{\cdot}$ ). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ozono ( $O_3$ ), singlete de oxígeno ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ), peróxido lipídico ( $LOOH$ ), no son RL; sin embargo pueden desembocar fácilmente en reacciones productoras de RL en los organismos vivos (118-120), por lo que se conocen junto a los RL genéricamente como ROS (*Reactive Oxygen Species*) o EROs.

El radical  $O_2^{\cdot-}$  se considera una especie reactiva de oxígeno primaria que se forma por la reducción de un único electrón de la molécula de  $O_2$ . Su posterior conversión a  $H_2O_2$  es llevada a cabo por la acción de una familia de enzimas conocidas como superóxido dismutasa (SOD), las cuales se encuentran tanto en el citosol como en la mitocondria. El producto de la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$ , no presenta electrones desapareados, pero es uno de los agentes oxidantes más potentes conocidos; además tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares y posee una vida media relativamente larga. El  $H_2O_2$  es rápidamente metabolizado a productos no tóxicos, por la enzima catalasa (CAT), que lo descompone en  $H_2O$  y  $O_2$ . Aunque si no es enzimáticamente destruido, es la molécula precursora del radical más tóxico, el radical  $\cdot OH$ . El  $H_2O_2$  se reduce en presencia de un metal de transición, generalmente el  $Fe^{2+}$ , dando lugar al  $\cdot OH$  en la conocida como la reacción de Fenton (121). Este radical tiene una vida media in vivo de  $1 \times 10^{-9}$  segundos y viaja solo unos pocos Angströms antes de dañar alguna molécula vulnerable.

El radical  $O_2^{\cdot-}$  también puede dar lugar a otro producto altamente tóxico, tras su combinación con el radical  $\cdot NO$ , produciéndose el anión  $ONOO^{\cdot}$ . Éste último forma parte de los RNS (*Reactive Nitrogen Species*), o Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), elementos que desempeñan un papel fundamental en el estrés oxidativo, ya que niveles elevados dan lugar al estrés nitrosativo, que puede desembocar en daño a nivel de las proteínas. Aunque no es un radical, tiene la capacidad de dañar una gran variedad de moléculas e iniciar procesos peroxidativos. Además de su toxicidad *per se*, se degrada convirtiéndose en radicales  $\cdot OH$  u otros agentes de toxicidad similar.

El singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) (presenta los dos electrones en el mismo orbital) se forma por la adición de energía a la molécula de  $\text{O}_2$ . Esto se produce en el organismo por varias vías, y se observa una mayor cantidad de este oxidante en piel y ojos debido a la acción del sol (122).

## IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Estos RL no sólo son perjudiciales para el organismo, muchas de ellas, a las concentraciones y condiciones adecuadas, también son beneficiosas para el organismo: unos niveles adecuados de radicales en una zona del organismo afectada por un patógeno, o que presenta algún tipo de traumatismo, es capaz de estimular el proceso de inflamación y activar la respuesta inmunitaria, para resolver la situación; algunos de ellos como el  $\cdot\text{NO}$  también son indispensables para la vida, ya que actúan como moléculas señalizadoras en múltiples procesos biológicos como la regulación de la presión sanguínea, neurotransmisor, relajación del músculo liso... (123-125). Mantener estable este equilibrio entre ambos efectos es muy importante para la vida, ya que los niveles bajos o moderados de ERO y ERN mantendrán un correcto funcionamiento del organismo vivo, mientras que cuando el daño “se cronifica” y mantiene durante un tiempo excesivo, estos niveles se elevan, generando el estrés oxidativo. Lo definimos como un desequilibrio que se produce en el organismo, cuando los niveles de especies oxidantes superan a aquellas sintetizadas para eliminarlas, y que se conocen como moléculas antioxidantes (126).

El estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de numerosas patologías crónicas y degenerativas como cáncer, artritis, envejecimiento, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y neurodegenerativas, ya que tanto ERO como ERN son capaces de interactuar con biomoléculas como son lípidos, proteínas y material genético. La retina es uno de los tejidos más susceptibles a su daño debido a 3 razones: en primer lugar los ácidos grasos poliinsaturados (*Poly- Unsaturated Fatty Acids*, PUFAs) son los lípidos más susceptibles de experimentar daños por parte de los RL, y éstos son los principales componentes de las membranas celulares de los SE de los fotorreceptores; este tejido se encuentra expuesto continuamente a radiaciones UV, gases nocivos, contaminación... fuentes exógenas de RL. Finalmente, la retina es

uno de los mayores consumidores de  $O_2$  del organismo, lo cual favorecería la producción de EROs, que a su vez favorecen la aparición y/o progresión de enfermedades oculares (127, 128).

## EFFECTOS PERJUDICIALES

Los RL, por su alta reactividad, interaccionan con diversas macromoléculas y tienen efectos perjudiciales sobre su estructura y función.

### 1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los radicales  $\cdot OH$  y  $ONOO^-$ , cuando son producidos en exceso, pueden dañar los PUFAs de las membranas celulares en un proceso conocido como LPO. Este tipo de ácidos grasos son los más vulnerables a la hora de sufrir oxidación por parte de los RL debido a la presencia de un mayor número de dobles enlaces en su estructura. Este proceso se divide en varias etapas (129): La **iniciación** de la LPO se produce por diversos mecanismos; uno de ellos sería el ataque de un radical libre sobre alguno de los dobles enlaces del ácido graso. Pueden iniciar este proceso el anión  $O_2^-$ , radical perhidroxilo ( $HO_2\cdot$ ),  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$  y  $O_3$ . El RL capta un hidrógeno de uno de los carbonos de los grupos metilo de la cadena carbonada, formándose un radical alquilo que se estabilizará por resonancia formándose un dieno conjugado, que puede reaccionar a su vez con una molécula de  $O_2$ , formando endoperóxidos, hidroperóxidos y cicloperóxidos. Estos productos pueden a su vez, interaccionar con otros carbonos metilenos de otros PUFAs adyacentes, iniciando la **propagación y ramificación** de una reacción en cadena que sólo terminará (cuarta y última etapa: **terminación**) cuando estos radicales interaccionen con moléculas antioxidantes o cuando no existan más moléculas sobre las que continúe la reacción, es decir, se termine el sustrato y la reacción no pueda proseguir. Este proceso va a afectar a diversas propiedades de la membrana plasmática como son la fluidez de membrana, su composición en ácidos grasos o la permeabilidad selectiva hacia ciertas moléculas, desembocando en la pérdida de su funcionalidad y muerte de la célula afectada (130, 131).

Esta reacción desemboca en la formación de ciertos aldehídos, entre los que destacan el malonildialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y la acroleína, que son citotóxicos y mutagénicos. El HNE es un aldehído capaz de reaccionar con fosfolípidos y grupos sulfhidrilo y amino de residuos de histidina, lisina y cistidina de proteínas de la membrana plasmática, alterando la funcionalidad celular (132-134). La acroleína es otro aldehído de cadena corta que procede, no solo de la LPO, sino también de fuentes exógenas como el humo del tabaco, los aceites cocinados y ciertos alimentos que contengan carbohidratos y que sean cocinados, pueden desembocar en la producción de acroleína, por la conversión de glucosa (135). Esta molécula interacciona con los grupos tioles de los residuos de cisteína entre 110 y 150 veces más rápido que el HNE, causando la inactivación de ciertas enzimas como la aldosa reductasa y la protein-tirosin fosfatasa 1B. Se han encontrado elevados niveles de este aldehído en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (136). El MDA es un producto obtenido tanto de la LPO como de la síntesis de prostaglandinas (PG), que es capaz de interactuar con el ADN formando productos modificados de las bases nitrogenadas, como la pirimidopurinona, por lo que se conoce como agente mutágeno. También es capaz de reaccionar con proteínas, estimulando la respuesta inflamatoria y pro-fibrogénicas (137, 138).

## 2. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

---

Las proteínas también pueden verse dañadas por ERO/ERN, llevando a cambios estructurales y pérdida de la actividad enzimática. No siempre es necesaria la afectación de la membrana plasmática por parte de estas especies reactivas para que se produzca la proteólisis, aunque si bien es cierto que las modificaciones que se producen en los lípidos de la membrana plasmática, y que alteran su fluidez y composición, favorecen la proteólisis (139); también hay que tener en cuenta que no todos los sistemas antioxidantes protegen a todas las moléculas del daño oxidativo, debido a los diferentes mecanismos por los cuales las proteínas se ven alteradas. El radical  $\text{OH}^\cdot$  es uno de los mayores responsables de la alteración y degradación de las proteínas, alterando su peso molecular por procesos de agregación o fragmentación, modificando su carga eléctrica, induciendo la pérdida de los residuos de tirosina de su

composición y la producción de bitirosina, formada por la interacción de dos residuos tirosilo o un aminoácido tirosina y un residuo tirosil (favoreciendo la agregación de proteínas). Los RL también son capaces de favorecer la proteólisis por parte de los mecanismos propios de la célula (140-142).

### 3. DAÑO SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

---

El exceso de RL también conlleva modificaciones a nivel del material genético. Todas las bases nitrogenadas pueden experimentar modificaciones o lesiones oxidativas que pueden causar mutaciones (143). Sin embargo, son las bases pirimidínicas las más susceptibles de padecer alteraciones en sus estructuras. Los RL pueden afectar tanto a los procesos de transcripción, traducción y replicación del ADN como a los sistemas de reparación que protegen a la célula frente a todos estos cambios. Como modificaciones del ADN encontramos la pérdida de bases nitrogenadas por acción de los RL en los residuos azucarados de las bases, roturas de la cadena de ADN por la unión de ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*) a los azúcares en presencia de  $Fe^{2+}$ , modificaciones de las bases de ADN dando lugar a productos como la 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxicitosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, 5-hidroxiuracil, timina glicol y la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. Cuando estas modificaciones no pueden ser resueltas por los sistemas de reparación del ADN se producen las mutaciones, alteraciones estructurales, e incluso pérdida parcial o total de cromosomas, con las consecuencias derivadas de esto (144). También se pueden producir interacciones entre el ADN y proteínas e intercambio de material genético entre cromátidas hermanas (145). Una de las lesiones más comunes que encontramos asociadas a daño de ADN es el 8-hidroxi-guanina, producto que difiere de la base nitrogenada guanina en la presencia de un átomo de oxígeno en lugar de un hidrógeno en la posición C8 del anillo imidazol de la guanina. Su unión con la base adenina disminuye de forma severa la estabilidad de la cadena de ADN. Su reparación es llevada a cabo por las enzimas glicosilasas que forman parte del sistema reparador de excisión de bases, las cuales también se ven afectadas por EROs (146). Otro mecanismo que eliminaría esta modificación sería

llevado a cabo por una enzima endonucleasa; ambas liberarían o la base nitrogenada (8-hidroxi guanina) o el nucleósido (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) (147-149).

#### 4. DAÑO A MITOCONDRIAS

---

Hay que destacar que el ADN mitocondrial (ADNmit) se encuentra mucho más desprotegido ante el daño oxidativo debido a la ausencia de histonas, intrones en su secuencia y sistemas de reparación de ADN, con una tasa de mutaciones que puede variar de entre 1:5.000 a 1:500.000, 10 veces más alta que la del ADN nuclear (ADNn) (150). La mitocondria es el principal orgánulo responsable de la producción de ATP por el mecanismo de fosforilación oxidativa, OXPHOS. Como se explica en el apartado siguiente, encontraremos altos niveles de EROs, debido a que es el responsable de aproximadamente el 90% de los RL producidos por las células, los cuales pueden dar lugar a mutaciones en el propio genoma mitocondrial. Dicho genoma es el responsable de una gran parte de los componentes proteicos que conforman el sistema OXPHOS. Mutaciones a nivel del ADNmit podrían traducirse en una mayor producción de RL por parte de la mitocondria; existen enfermedades neurodegenerativas derivadas de mutaciones en el ADNmit en las que se ha observado unos niveles mayores de estrés oxidativo, aunque todavía está por esclarecer cuál sería exactamente su implicación en estas enfermedades (151, 152).

#### FUENTES DE RADICALES LIBRES

Las ERO y ERN pueden proceder tanto de fuentes endógenas como exógenas. Los RL endógenos son producidos por numerosas vías: en la activación de las células del sistema inmunitario, inflamación, situaciones de estrés, ejercicio excesivo, isquemia, infección, cáncer, edad... Las fuentes exógenas podrían ser: contaminación del agua y del aire, humo del tabaco (tabaco *per se*), alcohol, metales pesados o de transición (cadmio, mercurio plomo, hierro, arsénico), ciertos fármacos (ciclosporinas, tacrólimus, gentamicina, bleomicina), solventes orgánicos, alimentación (carne ahumada, aceite usado, grasas) (153-157). Tras su entrada en el cuerpo a través de las distintas vías, estos componentes exógenos se descomponen o metabolizan en RL.

## 1. ENDÓGENAS

---

### 1.1. Mitocondria - Sistema OXPHOS

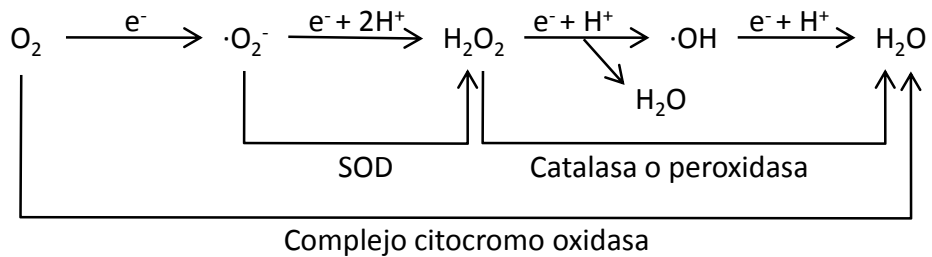
---

El  $O_2$  es un elemento indispensable para la vida. Cuando las células de los organismos aerobios utilizan  $O_2$ , se genera energía en forma de adenosín trifosfato (ATP); sin embargo, la consecuencia directa es la producción de RL.

Como ya se ha comentado, la principal fuente de RL en la célula la vamos a encontrar en la mitocondria, ya que es el responsable de la producción de energía para la supervivencia de la célula, utilizando aproximadamente el 90% del  $O_2$  consumido, a través de cadena respiratoria mitocondrial, la cual integra tanto la cadena transportadora de electrones como la fosforilación oxidativa final. Lo que también se conoce como **sistema OXPHOS**. Está compuesto por 5 complejos proteicos (complejos I-V) localizados en la membrana mitocondrial interna y cuya expresión va a estar controlada tanto por el ADN genómico como mitocondrial. En la mitocondria encontramos numerosas vías metabólicas, como el complejo piruvato deshidrogenasa, el ciclo de la carnitina, biosíntesis de pirimidinas, metabolismo de aminoácidos, síntesis del grupo hemo y de centros Fe-S, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs, entre otros (158). Los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (fosfato) (NAD(P)H) y de flavina adenina ( $FADH_2$ ) son unas moléculas producidas en el proceso de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs, y que van a ejercer su función en este proceso como transportadores de electrones. Otros elementos transportadores de electrones que van a participar en la cadena van a ser el coenzima Q, los citocromos y proteínas ferro-sulfuradas y cúpricas. Esta transferencia de electrones que se produce a lo largo de los diferentes complejos proteicos va a generar un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial, traduciéndose en una separación de las cargas y la aparición de un gradiente de protones ( $H^+$ ). El aceptor final de estos electrones es el  $O_2$  molecular que será reducido por dos electrones formando una molécula de  $H_2O$  en el complejo IV (citocromo oxidasa), con el consiguiente bombeo de dos  $H^+$ , hacia el espacio intermembrana mitocondrial. La síntesis de ATP se llevará a cabo gracias al gradiente de protones que

se ha ido creando a lo largo de todo el proceso, y lo realizará el complejo V, también conocido como ATP sintasa (159, 160).

También se ha demostrado que entre el 0,4 y el 4% del  $O_2$  consumido por el sistema OXPHOS es transformado en radicales  $O_2^{\cdot-}$  en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (citocromo c oxidoreductasa) por la captación de un único electrón (Figura 8). El complejo I libera estos aniones  $O_2^{\cdot-}$  a la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III los libera a ambos lados de la membrana interna. Este radical puede ser transformado a  $H_2O_2$  por la manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD), y finalmente a  $H_2O$  por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) o peroxirredoxina III. Esto se conoce como la *paradoja del oxígeno* ya que, este elemento es indispensable para la supervivencia del organismo y al mismo tiempo es fuente de RL, que afectan al correcto funcionamiento celular (161, 162). Además, aunque el anión  $O_2^{\cdot-}$  no es capaz de atravesar la membrana lipídica, tras su conversión a  $H_2O_2$ , sí que puede hacerlo, pudiendo de esta forma interaccionar con multitud de moléculas y creando nuevas especies reactivas.



**Figura 8.** Reducción del oxígeno para formar agua.  
SOD: Superóxido dismutasa.

Se ha visto que con la edad y en numerosas patologías degenerativas como Alzheimer, Parkinson, síndrome de Leigh, retinopatía diabética, DMAE, neuropatía óptica hereditaria de Leber, RP... los sistemas antioxidantes de la mitocondria son incapaces de hacer frente a la producción de EROs, con lo cual se da un aumento en sus niveles, creando un estado de estrés oxidativo en el interior mitocondrial y celular que termina dañando a lípidos, proteínas y ADN, y que finalizará con la muerte de la célula (163-165).



## 1.2. NAD(P)H Oxidasas

---

Otra de las principales fuentes de ERO que existen a nivel mitocondrial es una familia de enzimas conocidas como **NAD(P)H oxidasas (NOX)**, las cuales participan en el proceso de conversión del  $O_2$  en el anión  $O_2^{\cdot-}$ , utilizando la coenzima NADH como agente donador de electrones, con la posterior liberación de RL al medio. Este complejo de proteínas es de gran importancia para la respuesta del sistema inmunitario innato, ya que se expresa en la membrana de células fagocíticas, principalmente neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y células dendríticas, participando en los procesos de inflamación y destrucción de microorganismos patógenos mediante la producción y liberación de ERO. Está compuesta por dos subunidades de membrana y 3 componentes citoplasmáticos; en estado inactivo, estas 3 subunidades se encuentran formando un complejo citoplasmático, pero en el momento de la activación del sistema (desencadenado por señales moleculares procedentes de agentes patógenos como citoquinas o factores quimioatrayentes), se translocan a la membrana junto a las otras dos unidades, para formar un complejo activo (166).

Tras la activación del sistema NOX se va a producir un incremento del consumo de  $O_2$ , con el objetivo de aumentar la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , mediante el consumo de NAD(P)H; este radical se liberará en el interior de vacuolas fagocíticas o directamente al medio extracelular. Este proceso recibe el nombre de explosión respiratoria. Por la acción de la enzima SOD, el anión  $O_2^{\cdot-}$  se transformará en  $H_2O_2$ , que a su vez servirá de sustrato a enzimas peroxidasas que lo utilizarán para oxidar elementos halógenos y crear ácidos hipohalogenosos, como el ácido hipocloroso (HClO). Sin embargo, es un delicado equilibrio que se ha observado alterado en numerosas patologías como la artritis reumatoide, la enfermedad granulomatosa crónica, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa entre otras, en las cuales se produce una inflamación crónica del tejido afectado, ya sea piel, algún componente del sistema digestivo, pulmones o infecciones recurrentes de patógenos oportunistas debido a mutaciones en alguna de las subunidades de esa familia de enzimas (166-170).

### 1.3. Citocromo P450

---

**Citocromo P450** (CYP450) es el nombre por el que se conoce a una superfamilia de enzimas con actividad monooxigenasa, en la que encontramos más de 50 isoformas, divididas en 18 familias. Se encuadran dentro del conocido sistema de monooxigenasas microsomales, localizado mayoritariamente en las membranas del retículo plasmático de los tejidos. Son conocidas por su papel en el proceso de detoxificación de xenobióticos, convirtiendo estas moléculas en otras de carácter más hidrosoluble y, por tanto, más fácilmente excretables a través de la orina (171, 172). Catalizan reacciones de monooxigenación de una amplia variedad de compuestos como etanol, fármacos y drogas, además de participar en la degradación de biomoléculas como ácidos grasos, esteroides, eicosanoides e hidroperóxidos lipídicos, entre otros. Todo esto es posible gracias a las múltiples isoformas que existen, y a su selectividad frente a sustratos específicos (173). Además, también participan en reacciones de reducción, hidrólisis e hidratación. Presentan una amplia distribución en todo el organismo, sin embargo, el hígado es el órgano estudiado principalmente por ser uno de los lugares fundamentales para el metabolismo de fármacos y otras sustancias exógenas. Estas enzimas pueden clasificarse en 4 grupos en función de cómo adquieren los electrones: directamente del NADPH, a través de un grupo prostético FAD/FMN (llamado CPR) y por una reductasa que presenta FAD y una ferrosulfoproteína. Existe una cuarta clase de estas enzimas que no necesitan para su actuación de ninguna molécula donadora de electrones. Están formadas una hemoproteína con un átomo de hierro y una flavoproteína que será la responsable de la transmisión de electrones desde el NADPH hasta el sustrato del CYP450. Una alternativa a la presencia del grupo FAD/FMN sería el citocromo b5 como donador de electrones, sin embargo es menos eficaz. La enzima NADPH reductasa es la responsable de la reducción del ion  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  gracias a un electrón del NADPH; el sitio de unión de los fármacos se encuentra cercano a este grupo hemo. La posterior oxidación para regenerar el  $\text{Fe}^{3+}$  se lleva a cabo por la adición de un átomo de oxígeno, y tras la adición de dos átomos se generará una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (174, 175). Una de las isoformas de mayor importancia es el CYP2E1. Se ha demostrado un incremento en los niveles de esta enzima en los procesos de hepatotoxicidad y cáncer, al igual que en

otras patologías como obesidad, debido a la liberación de RL durante su funcionamiento, los cuales interactúan con PUFAs, desencadenando el proceso de LPO, que finalmente inducirá la muerte celular por apoptosis (176). También se ha visto que en el mecanismo de acción del CYP450 se producirían RL como el anión  $O_2^{\cdot-}$  (debido al posible deterioro del complejo P450 oxidado) y  $H_2O_2$  (debido tanto a la dismutación del anión  $O_2^{\cdot-}$  como al deterioro del peroxicitocromo P450) (177). Este complejo enzimático presenta una alta tasa de producción de EROs, ya que se encuentra en continuo funcionamiento, aun en ausencia de sustratos, oxidando moléculas de NADPH. Niveles de actividad elevados del citocromo P450 aumentan los niveles de enzimas antioxidantes como glutatión y CAT, siendo un indicativo del nivel de estrés oxidativo que experimenta la célula y, por tanto, un punto de inflexión a tener en cuenta sobre el papel y la importancia de este sistema en el ser humano.

#### 1.4. Óxido nítrico sintasa (NOS)

---

Esta familia de enzimas (EC 1.14.13.39) compuesta por 3 isoformas de la misma, es responsable de la síntesis del NO, por la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina (ver Figura 9). Estas 3 isoenzimas son: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). Las dos primeras se expresan de forma constitutiva en el organismo, aunque por diferentes tipos celulares: eNOS se encuentra principalmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, siendo un elemento fundamental para el sistema cardiovascular, mientras que nNOS es expresada mayoritariamente por neuronas, células del músculo esquelético y cardíaco. iNOS se encuentra ausente en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, antes estímulos inflamatorios como citoquinas o lipopolisacáridos procedentes de microorganismos o células del sistema inmunitario, se incrementa su expresión, produciendo altas concentraciones de NO (178). eNOS y nNOS producen NO en un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina, produciendo unas concentraciones de NO del orden nanomolar; sin embargo la isoforma inducible es independiente de ellas pero cuando es estimulada es responsable de concentraciones micromolares de esta molécula (179). Se ha detectado la expresión de esta enzima en la retina de los animales vertebrados: se ha encontrado a nivel de los fotorreceptores, en distintos

tipos de células amacrinas y a nivel de la CCG; se ha detectado la expresión de la isoforma eNOS en los procesos de las células de Müller y la de la nNOS en los procesos de las células bipolares y células horizontales y en los procesos presinápticos de las células amacrinas (180). Todas ellas deben formar homodímeros para poder catalizar la síntesis de NO, pero la unión de iNOS es mucho menos estable, y por lo tanto, favorece la producción de EROs y ERNs. El NO producido, puede interactuar con otros RL y producir otros como  $O_2^-$  y  $ONOO^-$ .

En la estructura de la NOS podemos encontrar 2 dominios: el dominio oxigenasa, que se encuentra en la posición N-terminal, y que presenta un grupo hemo, y el dominio reductasa, dispuesto en el extremo C-terminal y que posee en su estructura un grupo FMN/FAD. Ambos dominios se encuentran unidos por una secuencia de aminoácidos donde se localiza el lugar de unión a la calmodulina (181). De forma simplificada, los electrones del NADPH son cedidos a través del grupo prostético FMN/FAD, en el dominio reductasa, hasta el hierro del grupo hemo, en el dominio oxigenasa. Aquí, gracias a la acción de una molécula de  $O_2$ , y con la participación de la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofactor, la L-arginina se convierte en el intermediario  $N^\omega$ -hidroxi-L-arginina, y éste, en una segunda reacción de monooxigenación consecutiva, en L-citrulina. En esta reacción se produce la liberación del NO (182, 183).

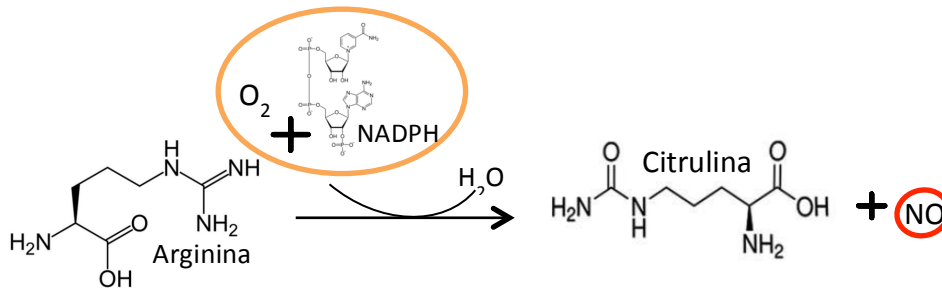


Figura 9. Reacción de síntesis de óxido nítrico (NO) catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).

### 1.5. Xantina oxidasa (XO)

Pertenece a una familia de enzimas responsables de la hidroxilación de las purinas. La XO cataliza la reacción que convierte la hipoxantina en xantina, y ésta, en

ácido úrico. En ambas reacciones se va a dar una reducción del  $O_2$  molecular, produciendo anión  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ .

## 2. FUENTES EXÓGENAS

---

Día a día estamos expuestos a numerosos agentes productores de RL y que afectan a nuestra salud.

El **humo del tabaco** contiene más de 4.800 sustancias tóxicas, muchas de las cuales son pro-oxidantes y carcinógenas. Es responsable de la producción de especies reactivas como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ , acroleína, nitrosaminas, ERNs y monóxido de carbono (CO), entre otras. Son capaces de unirse a los grupos tiol de las proteínas, induciendo cambios estructurales y funcionales (184). Además es una de las principales fuentes de daño a ADN: alteración de bases, rotura de la cadena, daño a genes supresores de tumores e inducción de proto-oncogenes (185, 186).

La **luz** es capaz de inducir la producción de EROs en diferentes tejidos como son la retina y la piel, además de causar daño proteico, al ADN y LPO (187). Los rayos ultravioleta B (UVB) presentan un carácter altamente mutágeno, ya que pueden ser absorbidos directamente por el ADN creando mutaciones a nivel de la cadena. Los rayos ultravioleta A (UVA), son el componente mayoritario de la luz solar, y también se han demostrado capaces de modificar el ADN, además de suprimir el sistema inmunológico, facilitando por tanto la aparición de tumores. Aunque estos últimos prácticamente no son absorbido por el ADN directamente, son capaces de inducir roturas de la cadena y oxidar bases pirimidínicas, efectos llevados a cabo sobre todo por el  $^1O_2$  (188).

El consumo de **alcohol** es una de las principales causas de enfermedades hepáticas que existen en la actualidad. El alcohol es metabolizado por los hepatocitos gracias a la acción de dos enzimas: la alcohol deshidrogenasa (ADH) y el CYP2E1. Se produce acetaldehído y posteriormente acetato, gracias a una enzima mitocondrial. Estos compuestos, junto a la dietilnitrosamina (DEN), habitual no sólo en bebidas alcohólicas, sino también en el humo del tabaco y alimentos como fritos y curados (fuentes exógenas también de RL), van a incrementar los niveles de EROs a nivel

hepático. Además se ha visto que la ingesta de alcohol incrementaría los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de estas enzimas, exacerbando por tanto esta producción de RL. Todo esto desembocaría en una disfunción mitocondrial que retroalimentaría este proceso, llevando a un proceso inflamatorio crónico, que aumentaría los niveles de estrés oxidativo de los hepatocitos por la producción de citoquinas y ciertos factores quimotácticos (189). La inflamación es un proceso destinado a eliminar del organismo al causante de un daño producido en el tejido. Sin embargo, un proceso inflamatorio prolongado no regulado puede inducir daño tisular y es causa de numerosas enfermedades crónicas. Se va a producir la infiltración de numerosas células del sistema inmune como leucocitos, monocitos, neutrófilos... que liberarán múltiples enzimas (proteasas, elastasas, colagenasas, ácido hidrolasas, fosfatasas, lipasas...), especies reactivas ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , ácido hipocloroso...) y mediadores químicos (eicosanoides, componentes del complemento, citoquinas, quemoquinas, óxido nítrico...) y, por lo tanto, inducirán mayor daño tisular y estrés oxidativo (190, 191). Además, células “no fagocíticas” también podrían producir RL en respuesta a esta liberación de sustancias, incrementando de nuevo la cascada de estrés y daño oxidativo. Añadido a todo lo anterior, el alcohol también incrementa la producción de EROs por el aumento de la actividad de enzimas como la xantina oxidoreductasa o la NADPH oxidasa, ambas productoras de RL y de las cuales se ha hablado previamente (192).

Los **metales** son cruciales en una gran variedad de procesos biológicos; sin embargo muchos estudios han demostrado que los metales xenobióticos, que no presentan funciones fisiológicas, como serían el aluminio, el cadmio, el plomo, el mercurio y el arsénico pueden interactuar con macromoléculas biológicas causando daño oxidativo: su capacidad para generar EROs y ERNs, además de alterar la homeostasis redox, serían factores importantes en la toxicidad inducida por estos metales. Esta toxicidad induciría cambios a nivel epigenético, señalización celular anormal y crecimiento celular descontrolado, iniciación del daño celular y estimulación de procesos inflamatorios. Sin embargo, no sólo estos metales causarían daño al organismo: los metales de transición como el cobre, el hierro, el cinc, cobalto y manganeso que participan en numerosos procesos de señalización y metabólicos,

también son capaces de interactuar con proteínas, lípidos y ADN, causando daño a estas macromoléculas e induciendo alteraciones estructurales y funcionales de las mismas, que desembocarán en muerte celular (193-195).

## SISTEMAS ANTIOXIDANTES

El cuerpo tiene multitud de mecanismos de defensa para contrarrestar el estrés oxidativo, que se conocen como sistemas o moléculas antioxidantes. Estos antioxidantes, al igual que en el caso de los RL, pueden ser sintetizadas por el propio organismo (fuentes endógenas) o proceder de la dieta (origen exógeno). Su papel es neutralizar el exceso de RL, protegiendo a las células contra sus efectos tóxicos y contribuyendo a la prevención de las distintas enfermedades. Los compuestos endógenos celulares que combaten estas EROs pueden clasificarse en antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes que participan en la neutralización directa de los RL son la SOD, CAT, GPx, glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST).

## FUENTES ENDÓGENAS

### 1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) es una familia de enzimas que cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$ , convirtiéndolo en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . A pesar de que esta reacción va a producir  $H_2O_2$ , que como ya se ha comentado también es EROs, esta molécula es mucho menos perjudicial para el organismo, y además se ha evitado la producción del radical  $\cdot OH$ , que puede originar graves daños celulares. En el ser humano encontramos 3 isoformas de esta enzima: una forma dependiente de los metales cobre y cinc, y que se encuentra situada en el citosol (CuZnSOD o SOD1), una forma dependiente de manganeso que se dispone a nivel mitocondrial (MnSOD o SOD2) y finalmente, otra isoforma dependiente de cobre y cinc, pero que se encuentra a nivel extracelular (SOD3) (196). Se ha demostrado que mutaciones que afectan a la isoenzima SOD1, son responsables de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como sería la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (197). Aunque su principal localización

es el citosol, también la podemos encontrar en el núcleo, los lisosomas, peroxisomas y la mitocondria. SOD2 es la principal línea de defensa que presentan los organismos aerobios: debido a su localización mitocondrial es la principal responsable de la conversión del radical  $O_2^{\cdot-}$  producido por la cadena transportadora de electrones y el sistema OXPHOS. Además, esta enzima disminuye el estrés oxidativo interaccionando directamente con ERNs, e impidiendo que éstos reaccionen con el anión  $O_2^{\cdot-}$ , formando el anión  $ONOO^-$ , altamente dañino y que puede desembocar en la apoptosis celular (198, 199).

## 2. CATALASA (CAT)

---

La catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es una enzima antioxidante responsable de la descomposición del  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ . Encontramos 3 clases de enzimas con actividad catalasa, que se diferencian en su distribución y estructura. La clase de CAT más abundante en la naturaleza se caracteriza por presentar un átomo de hierro en su centro activo y se va a localizar mayoritariamente en los peroxisomas celulares. Estas enzimas las encontramos tanto en células eucariotas como procariotas (200). Su actividad se divide en dos pasos: en primer lugar se produce la oxidación del grupo hemo de la enzima por la presencia de una molécula de  $H_2O_2$ ; el átomo de hierro presente en el grupo hemo en estado III ( $Fe^{III}$ ) se oxida a hierro IV ( $Fe^{IV}$ ) y se libera una molécula de  $H_2O$ . En el segundo paso, es necesaria una segunda molécula de  $H_2O_2$  para que la enzima vuelva al estadio inicial mediante una reacción de reducción, en la cual el  $Fe^{IV}$  vuelve a  $Fe^{III}$  liberándose otra molécula de  $H_2O$  y una de  $O_2$ . De esta forma, la enzima CAT actúa consumiendo dos moléculas de  $H_2O_2$  y generando dos moléculas de  $H_2O$  y una de  $O_2$  (201, 202).

## 3. GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

---

La glutatión S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18) es una gran familia de enzimas que catalizan reacciones de detoxificación de sustancias. Su función es la conjugación de numerosos compuestos por los grupos tioles de la molécula glutatión (GSH). De esta forma, sustancias dañinas para el organismo y de carácter electrofílico, son reconvertidas en conjugados de GSH, mucho menos perjudiciales y más hidrofílicos.



Debido a su elevado peso molecular por la adición del nuevo grupo químico, se estimula su excreción por orina o bilis.

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas, habiéndose encontrando en animales vertebrados, invertebrados, e incluso plantas (203, 204). Su expresión en los distintos órganos corporales varía en función de los cambios de pH, su estabilidad al calor y distribución (205). Uno de los principales órganos donde vamos a encontrar a estas enzimas va a ser el hígado, conocido por su papel en el metabolismo de compuestos como fármacos, drogas... Las distintas isoenzimas catalizarán diferentes reacciones en función de su especificidad al sustrato, siendo principalmente la adición o sustitución de GSH al centro electrofílico de dicha molécula. En su estructura encontramos un dominio de unión al GSH, en el extremo N-terminal, altamente conservado, y un dominio de unión al sustrato, en el extremo C-terminal, estructuralmente diferente, en función de su especificidad (206). Las GST son capaces de metabolizar compuestos hidroperóxidos, como el MDA, producto resultante de la LPO y, por lo tanto, participa activamente en la reducción de los niveles de estrés oxidativo.

#### 4. GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

---

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) es una familia de proteínas que podemos encontrar, no solo en mamíferos, sino también en reptiles, bacterias, protozoos, plantas... En los mamíferos se han encontrados 8 isoenzimas distintas, cuya función principal es la eliminación del  $H_2O_2$ . En función de la isoenzima de la que estemos hablando podemos encontrar un residuo de selenocisteína o un residuo de cisteína en su sitio activo. En este proceso, se produce primero la reducción de la molécula de  $H_2O_2$ , convirtiendo el residuo de (seleno)-cisteína en un intermediario que será reducido por una molécula de GSH, desembocando en un segundo intermediario que reaccionará de nuevo con una segunda molécula de GSH que restaurará el aminoácido del centro activo de la molécula. De forma simplificada, la glutatión peroxidasa requiere de la actuación de dos moléculas de glutatión reducido, para convertir una única molécula de  $H_2O_2$  en 2 moléculas de  $H_2O$  y una molécula de glutatión oxidado (207). Estas enzimas también participan en el control

del daño oxidativo causado al organismo disminuyendo los niveles del anión  $\text{ONOO}^-$  por su reducción a nitritos, en una reacción similar a la descrita anteriormente (208), y está implicada en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, siendo capaz de reducir peróxidos lipídicos (209, 210). La selenoproteína 1 (GPx1) es la forma más abundante en los mamíferos, y se encuentra expresada principalmente en el hígado y en el riñón. Al participar en la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es considerada una importante enzima antioxidante intracelular: se ha observado en modelos *knock-out* para esta enzima un incremento en la susceptibilidad al estrés oxidativo; sin embargo su sobreexpresión se ha demostrado que causaría problemas en los procesos de señalización en los que participa este radical: una gran cantidad de los procesos fisiológicos en los que participa el  $\text{H}_2\text{O}_2$  están regulados por esa familia de enzimas (211).

## 5. GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

---

Es necesario el control del ratio entre el glutatión oxidado y reducido para un correcto funcionamiento de los mecanismos intracelulares y el mantenimiento de la homeostasis celular. Por esto encontramos la GR (EC 1.8.1.7), responsable de la conversión de una molécula de glutatión oxidado en dos moléculas de glutatión reducido, por la reducción del puente disulfuro que une ambas moléculas y gracias a la acción del coenzima NADPH (212). Debido a la importante función que ejerce el glutatión en su forma oxidada en numerosos procesos celulares, algunos de ellos previamente descritos, como detoxificación de compuestos, reacciones de conjugación en la eliminación de agentes tóxicos y la producción de desoxirribonucleótidos para la síntesis de ADN, esta enzima tiene un papel fundamental para el organismo (213).

## 6. ANTIOXIDANTES METABÓLICOS

---

Los antioxidantes no enzimáticos se dividen en 2 grupos: aquellos sintetizados por el propio metabolismo, es decir, los antioxidantes metabólicos, y aquellos procedentes de los nutrientes que ingerimos en la dieta (o nutritivos) (214). En el grupo de los antioxidantes metabólicos podemos destacar el ácido lipoico, glutatión, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metales, transferrina...

Los antioxidantes de nutrientes, se consideran antioxidantes exógenos ya que son moléculas que no pueden sintetizarse por los distintos mecanismos bioquímicos del organismo. Debido a esto, sus niveles van a depender de nuestra ingesta en la dieta de alimentos que los contengan: la vitamina E, C, carotenoides, trazas de metales (selenio, manganeso, cinc), flavonoides y ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6... (215-217).

### 6.1. Glutación

---

El tripéptido L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina o glutación es una pequeña molécula muy importante en el organismo que se ve implicada en numerosos procesos biológicos: reacciones enzimáticas, síntesis de macromoléculas, metabolismo de productos xenobióticos, toxicidad de RL, sistema inmunológico, cáncer... (218-220).

Este tiol podemos encontrarlo tanto en su forma reducida, GSH, como oxidada, compuesta por dos moléculas de glutación unidas por un puente disulfuro (GSSG), siendo la primera de ellas la forma más abundante en las células. Su localización es aproximadamente el 90% del GSH a nivel citosólico y el 10% restante en la mitocondria; existe un pequeño reservorio a nivel del RE (221). Además, el hígado es el órgano con una mayor concentración de esta molécula, debido a su principal participación en la detoxificación de xenobióticos, proceso explicado anteriormente y en el que es clave el glutación. También es la principal fuente de GSH para el resto de tejidos extrahepáticos (222).

El mantenimiento del ratio GSH/GSSG es indispensable para una correcta homeostasis redox celular: la concentración de las formas oxidadas y reducidas va a estar controlada por las enzimas de síntesis de la molécula, la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y las enzimas GSH sintetasa o GSSG reductasa; la GPx y GST son indispensables en el control de las formas oxidadas y reducidas en procesos de detoxificación y mecanismos antioxidantes, y en el control del ratio de GSH exportado fuera de los hepatocitos) (223-225) (Figura 10).

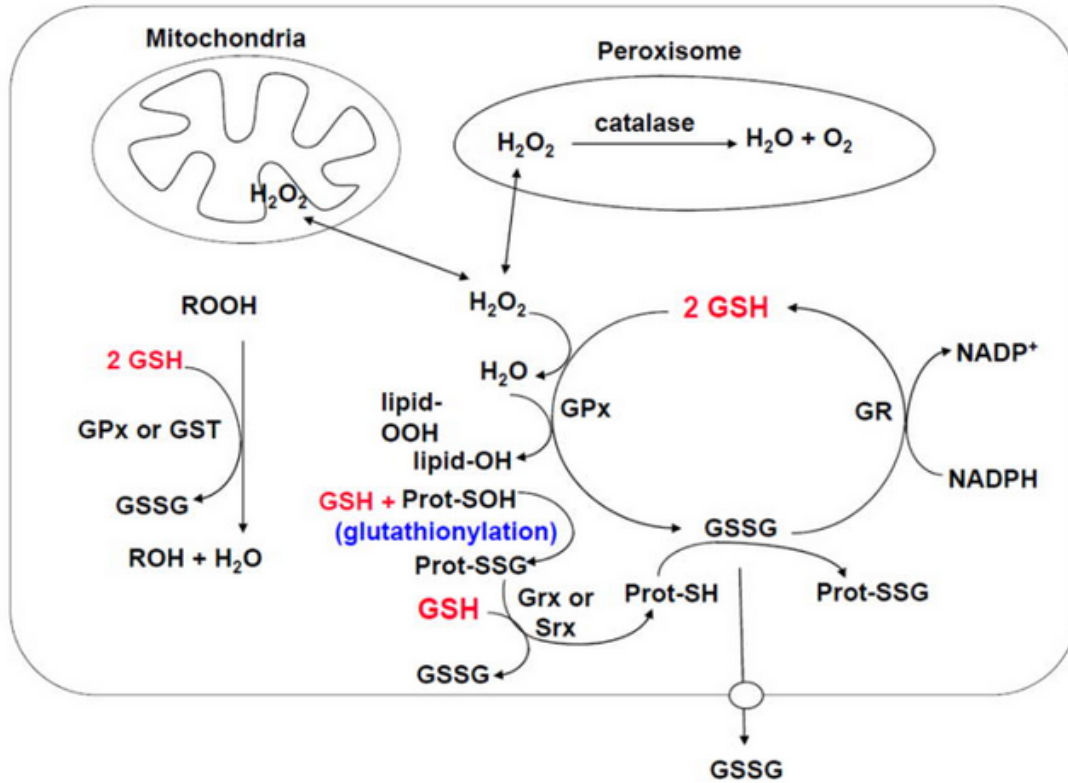


Figura 10. Mecanismo de actuación del glutatión reducido (GSH).

GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSSG: glutatión oxidado, GST: glutatión S-transferasa, NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato. Adaptado de (226).

## 6.2. Coenzima Q10

La coenzima Q es un grupo lipófilo de quinonas que presentan la capacidad de transferir electrones dentro de la capa lipídica de la membrana celular. Su presencia es muy conocida en la membrana plasmática mitocondrial. Aunque ésta es una de sus funciones más conocidas, esta molécula también presenta una importante capacidad antioxidante, a través de la reducción de los radicales lipídicos o aquellos derivados del  $O_2$ : Una de sus principales funciones es la reducción de los radicales de  $\alpha$ -tocoferol y ascorbato formados cuando éstos actúan a su vez como antioxidantes, siendo oxidados por radicales de  $O_2$  o carboxilos (227); de esta forma estas dos moléculas antioxidantes son regeneradas para que puedan volver a actuar, gracias a la reducción de la coenzima Q en la membrana lipídica celular. En todas las membranas celulares podemos encontrar distintas enzimas capaces de reducir los radicales quinol de la coenzima Q generados en su interacción con los radicales de oxígeno o de lípidos: NADH citocromo b5 reductasa, NADH/NADPH oxidorreductasa, NADH coenzima Q

reductasa. Además, las enzimas NADH y la succinato deshidrogenasa que encontramos en la mitocondria, son capaces de mantener a esta molécula parcialmente reducida (228).

A pesar de todo lo dicho anteriormente, la coenzima Q también es fuente de RL debido a la oxidación de las semiquinonas, productos intermediarios formados tras la cesión de un único electrón a la hidroquinona coenzima Q. Esta semiquinona puede ser rápidamente atacada por una molécula de  $O_2$ , formando la forma quinona y liberando en el proceso un radical  $O_2^{\cdot-}$ .

Sin embargo, el cuerpo es incapaz de sintetizar por sí mismo la cantidad suficiente que se necesita para ejercer correctamente su acción, de ahí que también se considere a esta molécula como una vitamina: la vitamina Q, obteniéndola de la dieta (229).

## 7. MELATONINA

---

Previamente se ha hablado de esta molécula debido a su fundamental papel en la regulación del ritmo circadiano en los organismos vivos, sin embargo no es su única utilidad para el organismo. Como explicaremos en el siguiente apartado, melatonina presenta numerosas funciones de importancia biológica, regulando multitud de procesos metabólicos, además de ser una de las principales moléculas antioxidantes del organismo.

Esta molécula presenta ciertas ventajas comparándola con otras moléculas antioxidantes: es de síntesis endógena, aunque también puede ser suministrado al organismo a través de la dieta, ya que se encuentra en alimentos como frutas, verduras, semillas, arroz, trigo, plantas medicinales... (230, 231). Su carácter anfipático le permite atravesar la membrana plasmática celular, accediendo a todas las células del organismo y compartimentos subcelulares. Se estima que es capaz de detoxificar más de 10 radicales gracias a una serie de cascada de reacciones enzimáticas, considerándose un antioxidante de amplio espectro. Se han realizado estudios para determinar la toxicidad de melatonina, llegando a la conclusión de que esta toxicidad

es extremadamente baja y observándose ciertos efectos secundarios, estando la mayoría de ellos relacionados con la fatiga y el sueño (232).

## FUENTES EXÓGENAS

### 1. ÁCIDO ASCÓRBICO

También conocido como vitamina C, es una de las principales moléculas antioxidantes conocidas. Entre sus funciones podemos destacar su capacidad para interactuar con los radicales  $O_2^{\cdot-}$ , alcoxilo y  $ROO^{\cdot}$ , además de con  $H_2O_2$  (aunque esta reacción se lleva a cabo de forma mucho más lenta que las demás) y disminuir la concentración de radicales aminoacídicos. A bajas concentraciones, esta vitamina posee actividad pro-oxidante, interviniendo en la reducción de los iones de hierro ( $Fe^{3+}$ ) y cobre ( $Cu^{2+}$ ), y desembocando en la liberación de radicales  $\cdot OH$  por la reacción de Fenton (233, 234). También participa en la síntesis de colágeno, carnitina y ciertos neurotransmisores, y en el catabolismo de la tirosina. En plantas, por ejemplo, se ha postulado su importancia en la captación del hierro (235-238).

Esta molécula puede ser sintetizada por la mayoría de los eucariotas, excluyendo algunos grupos animales como son los primates, y por lo tanto, los humanos (239, 240). Debido a esto, es necesaria su ingesta a través de la dieta, a través de la toma de alimentos que la contengan como ciertas frutas y verduras, entre otros. Su déficit desencadena ciertos problemas para la salud, siendo el más conocido de ellos el escorbuto.

### 2. VITAMINA E

Las 8 isoformas de tocoferol y tocotrieno  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - se incluyen bajo este nombre genérico. Todas ellas presentan potentes actividades antioxidantes, eliminadoras de RL, sin embargo es la forma  $\alpha$ -tocoferol la más abundante en la naturaleza (241). A pesar de esto, los tocotrienos están cobrando cada día más importancia debido a los estudios que avalan sus propiedades antiinflamatorias, anti-aterogénicas, antidiabéticas y neuroprotectoras (242). Todas las formas de vitamina E, tanto tocoferoles como tocotrienos destacan principalmente por ser capaces de

detener la propagación de reacciones de oxidación en cadena como las que se producen durante la LPO, interaccionando con las membranas celulares (243).

### 3. POLIFENOLES

---

Otro de los grupos principales de moléculas antioxidantes que encontramos en la dieta son los polifenoles. Los podemos encontrar en multitud de frutas y verduras, además de otros alimentos como los cereales, el chocolate, el café, el vino y el té. Dentro de este amplio grupo encontramos distintos subgrupos de compuestos, entre los que destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos, los estilbenos y los lignanos (244). Este grupo heterogéneo de moléculas se caracteriza por sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, vasodilatadoras, antialérgicas, antidiabéticas, antivíricas, estimuladoras del sistema inmunitario y antioxidantes (245, 246). También son capaces de actuar sobre procesos de señalización celular, adhesión celular y alterar la expresión de determinados genes, de ahí que hayan sido ampliamente estudiados como posibles moléculas terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes...(247-251).

#### 3.1. Flavonoides

---

Uno de los más importantes grupos de moléculas que componen la familia de los polifenoles es la de los flavonoides. Lo componen moléculas de bajo peso molecular cuya estructura se va a caracterizar por poseer dos anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo en cada uno de ellos, y unidos por un puente de 3 carbonos, formando un anillo heterocíclico de 6 miembros (C6-C3-C6) (252). Entre sus mecanismos de acción hay que incluir su capacidad para unirse a distintas proteínas y enzimas como las oxidasas, inhibiendo su acción, como al ADN; también son capaces de quelar iones de metales de transición como hierro, cobre y cinc y eliminar RL como  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , peróxidos lipídicos,  $^1O_2$  e hidroperóxidos (253, 254). Dentro de este grupo a su vez, podemos encontrar distintos subgrupos moleculares, donde destacaremos el de las catequinas. Estructuralmente se caracterizan por poseer dos anillos (denominados anillos A (anillo bencenodiol) y B (anillo pirogalol)) con, al menos, un

grupo hidroxilo y conectados por un tercer anillo (anillo C) heterocíclico dihidropirano con un grupo hidroxilo en el carbono 3 (255).

Al igual que el resto de compuestos polifenólicos, las catequinas se encuentran en altas concentraciones en numerosas frutas y verduras, sin embargo, una de las bebidas por excelencia caracterizada por su alta concentración en catequinas es el té verde.

## **ANTIOXIDANTES Y EDAD O ENFERMEDADES DEGENERATIVAS**

Con la edad, los sistemas antioxidantes del organismo disminuyen su actividad, por lo que los agentes externos son capaces de producir un daño mayor en el organismo, lo cual fomenta la aparición y progresión de enfermedades. Se ha demostrado un descenso en los niveles de enzimas antioxidantes como GST, GR, al igual que en el ratio GSH/GSSG, indicativo del estado de estrés oxidativo del organismo (256, 257). Esto a su vez se ha visto acompañado de niveles incrementados de lípidos peroxidados, proteínas oxidadas, daño al material genético (258, 259)... La incidencia de enfermedades degenerativas como serían el Alzheimer, Parkinson etc. se incrementa exponencialmente con la edad, idea respaldada con estudios en los cuales se ha demostrado que tanto pacientes como modelos animales de estas enfermedades experimentan un desequilibrio oxidativo, con una menor capacidad antioxidante y por lo tanto uno niveles mayores de EROs, lo cual favorecería la progresión de la misma (128, 260, 261). Desde hace ya varios años, se ha postulado la idea de utilizar como terapia complementaria en pacientes que sufren de enfermedades en las cuales el estrés oxidativo juega un papel importante, antioxidantes exógenos. Sin embargo, todavía existe discrepancia en cuanto a sus resultados ya que, aunque en muchos de ellos los resultados son positivos (262, 263), también existen otros en los cuales las diferencias no son claras e incluso en algunos casos, son negativas (264, 265). El paso del modelo animal a la práctica clínica es crítico en cuanto a la selección de la molécula antioxidante, al igual que el establecimiento de la dosis y la vía de administración.

En el campo de la Oftalmología, y en especial en las enfermedades degenerativas de la retina, el uso de antioxidantes está especialmente indicado en la



DMAE. El estudio AREDS formuló la utilidad de la suplementación de pacientes afectados de DMAE con vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -carotenos, cinc y cobre. Tras él, se estableció un segundo estudio (AREDS2) en el cual se trató de mejorar esta formulación antioxidante, añadiendo luteína, zeaxantina y ácidos grasos  $\omega$ -3, eliminando los  $\beta$ -carotenos y reduciendo la concentración de cinc: la luteína y zeaxantina así como los ácidos grasos  $\omega$ -3 en el AREDS2 no mostraron eficacia frente a los enfermos no tratados. Se decidió eliminar los  $\beta$ -carotenos ya que se habían encontrado indicios de una mayor incidencia de cáncer de pulmón en fumadores. Además, al contrario que ocurre con la luteína y zeaxantina que actúan a nivel de la retina y el cristalino como antioxidantes naturales, los  $\beta$ -carotenos no se han encontrado a nivel de la retina. Los ácidos grasos  $\omega$ -3 son indispensables para mantener la integridad de las membranas de las células retinianas. Se acepta la administración de este tipo de suplementos por sus posibles beneficios en aquellos enfermos que sufren DMAEs de alto riesgo, incluyendo aquellas con DMAE exudativa avanzada unilateral y signos de alto riesgo en el ojo adelfo (266). Otro de los componentes a utilizar en la terapia antioxidante de la DMAE es la vitamina A, cuya utilidad se ha estudiado en varios ensayos clínicos (267, 268) apoyando que su suplementación podría ayudar a retrasar la progresión de la enfermedad.

En la terapia antioxidante en las DHR los resultados son mucho menos concluyentes. No existen estudios que demuestren claramente los beneficios de las terapias antioxidantes, la mayoría por ser ensayos clínicos con difícil aleatorización por la gran cantidad de variantes a tener en cuenta en una enfermedad rara (como son el tipo de herencia, la mutación, etc). Algunos de ellos han mostrado efectos beneficiosos pero otros altamente deletéreos: a pesar de que se recomienda de forma genérica la suplementación con vitamina A en pacientes con DMAE, está contraindicada en aquellos pacientes afectados por RP con mutaciones del gen *ABCA4* (71).

## MELATONINA

### BIOSÍNTESIS

Melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina aislada y caracterizada por primera vez a partir de glándulas pineales bovinas, por el dermatólogo Aaron Lerner en 1958 (269). A pesar de que la glándula pineal es su principal órgano secretor, también es sintetizada en multitud de órganos como la retina, tiroides, glándulas lacrimales, glándulas de Hardem, tracto gastrointestinal, testículos, piel, riñones, páncreas, bazo, eritrocitos, plaquetas, timo, placenta... (270, 271).

Podría parecer que esta molécula es exclusiva de animales superiores, sin embargo, se ha comprobado su presencia en una gran variedad de seres vivos: organismos unicelulares, bacterias, plantas, invertebrados y animales vertebrados; esta amplia distribución podría explicar el porqué de su gran número de funciones. Esta molécula se identificó en plantas comestibles por primera vez por Hattori y cols. en 1995 (272). Desde entonces se ha encontrado en numerosos tipos de plantas y en distintas partes de las mismas (raíces, tallo, hojas, flores y semillas). Se han detectado cantidades extremadamente elevadas en varias plantas medicinales como serían la manzanilla y la hierba de San Juan, hecho que podría explicar su uso en la medicina tradicional como inductoras del sueño (273).

La melatonina se sintetiza a partir del triptófano, aminoácido esencial y, por lo tanto, imprescindible su ingesta por los alimentos. Este triptófano se captará de la circulación y se convertirá en 5-hidroxitriptófano, por un proceso de hidroxilación catalizado por la triptófano hidroxilasa. En esta reacción es indispensable el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). El 5-hidroxitriptófano se convierte en serotonina (5-hidroxitriptamina) por la acción de una descarboxilasa aromática de aminoácidos L. A continuación se inicia un proceso compuesto por dos pasos, mediante el cual la serotonina se convertirá en melatonina: en primer lugar actúa la enzima arilalquilamina N-acetil transferasa (AA-NAT), que producirá N-acetilserotonina; ésta

es la enzima limitante de todo el proceso de síntesis. El segundo paso consiste en la actuación de la enzima hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT), que dará lugar a melatonina. Los ARNm que codifican estas enzimas van a expresarse en función de los ritmos de día/noche, de ahí el control en la secreción de melatonina por los ritmos circadianos (274, 275).

En el ser humano, la producción de melatonina en la glándula pineal está regulada por las señales recibidas a través del NSQ, las cuales están moduladas por los cambios diarios y estacionales que se producen durante los ciclos del día y de la noche. Su secreción se produce durante la noche, obteniéndose su máximo valor en plasma alrededor de las 3-4 de la madrugada (275). La información referente a la luz se transmite a través de las fibras retino-hipotalámicas: durante el día, en presencia de luz, provoca una inhibición de la síntesis de melatonina a través de esta vía; la administración de luz artificial, de suficiente intensidad y duración es capaz de suprimir la síntesis de melatonina: intensidades de 2.000-2.500 lx durante 2 horas suprime completamente la producción de melatonina por la noche; las intensidades que solemos encontrar a nivel doméstico (50-300 lx) tienen un efecto supresor modesto. Además, la exposición a la luz durante varias noches sucesivas tiene como efecto, no sólo la supresión de la producción de melatonina sino un retardo en la secreción de la misma (retardo de fase) hacia la mañana (275-277). El principal neurotransmisor regulador de la glándula pineal es la noradrenalina, que se libera por la noche, en respuesta a señales estimuladoras originadas en el SNC. Los bloqueantes  $\beta$ 1 adrenérgicos suprimen la secreción nocturna de melatonina al igual que los bloqueantes  $\alpha$ 2 (clonidina) y  $\alpha$ -metil-p-tirosina, que reducen la síntesis de catecolaminas pre-sinápticas (275).

Melatonina producida por los pinealocitos es liberada a la circulación, y actúa como “hormona”, viajando en sangre, uniéndose a sus receptores, localizados en multitud de tejidos diana y desencadenando una serie de respuestas fisiológicas. Entre los procesos en los que influye encontramos: regulación de la reproducción estacional, los ritmos circadianos, los ritmos de la actividad locomotora, y la modulación de la respuesta del sistema inmune. También presenta propiedades oncoestáticas,

antienvejecimiento, regulación de la presión sanguínea, protección ósea y depuración de RL. Sus efectos se extienden al cerebro, el sistema inmune, gastrointestinal, cardiovascular, renal y huesos (278-280).

La disminución en la secreción de melatonina o la interrupción de sus ritmos de producción están siendo ampliamente estudiados en la actualidad como uno de los principales mecanismos de envejecimiento (281-283) y de enfermedades relacionadas con el mismo, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como sería el Alzheimer (284, 285). Sin embargo, aunque se ha visto en pacientes que padecen estas enfermedades alguna de estas características (disminución de la producción de melatonina y/o modificaciones en los ritmos diarios de síntesis de melatonina) todavía no está claro si el descenso en los niveles de melatonina es causa o consecuencia de la edad o de la enfermedad, y los mecanismos responsables de estas modificaciones son todavía desconocidos (286, 287).

## **DISTRIBUCIÓN, FARMACOCINÉTICA Y METABOLISMO**

Los niveles diurnos plasmáticos de melatonina son prácticamente indetectables o muy bajos en la gran mayoría de los adultos y, como ya se ha explicado previamente, tras su secreción esta hormona pasa al torrente circulatorio para llevar a cabo sus funciones, por lo que, el perfil observado en plasma refleja la actividad pineal, en cuanto a su producción (275). Para recorrer el torrente sanguíneo, melatonina se une mayoritariamente a la albúmina (70%), mientras que el resto (30%) circulará libre (288) y pasará a la saliva. Un método alternativo para medir los niveles de melatonina producidos, es el análisis de la saliva (289). Sin embargo, esta molécula presenta una vida media baja, de 30 minutos en plasma, tras lo cual se metaboliza en el hígado y se elimina por orina en forma de 6-sulfatoximelatonina (95%).

Al presentar una alta solubilidad, tanto en medio lipídico como acuoso, es capaz de pasar con facilidad a través de las membranas celulares, pudiendo alcanzar todos los tejidos corporales incluyendo oculares, y pudiendo atravesar la barrera hemato-encefálica para modular la actividad cerebral. Este hecho es muy importante en los neonatos y recién nacidos, en desarrollo del sistema nervioso, en los cuales se

ha relacionado sus niveles de melatonina, medidos en cordón umbilical, con los de la madre, por el paso de melatonina a través de la placenta (290-292). Los niveles más altos de melatonina que podemos encontrar, se dan desde los 3 a los 6 años. A partir de esa edad la producción de melatonina comienza a descender hasta alcanzar unos valores del 20% en las personas adultas (275).

El hígado es el principal órgano donde se lleva a cabo el metabolismo de melatonina, por la hidroxilación de esta molécula en la posición 6, realizada por las isoformas del citocromo P450: CYP1A2 y CYP1A1, y en menor medida, CYP1B1. De esta reacción obtendremos 6-hidroximelatonina, que sufrirá una conjugación con un grupo ácido sulfúrico (la mayoría, entre un 70 y un 80%) o glucurónico (<5%), tras lo cual será excretada por orina y heces (280, 293). Sin embargo, el hígado no es el único tejido donde melatonina puede metabolizarse, aunque el proceso es diferente, y por mecanismos no-enzimáticos en todas las células. También puede ser metabolizada por RL u otras moléculas oxidantes, de forma extracelular donde se convierte en la 3,6-hidroximelatonina cíclica, al captar dos radicales ·OH. N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinurenamina (AFMK) y N<sup>1</sup>-acetil-5-metoxiquinurenamina (AMK) son dos de los metabolitos procedentes tanto de melatonina como de este último compuesto, más importantes y que presentan una excelente actividad depuradora de RL (279, 280).

La ingesta de ciertas sustancias, como por ejemplo el café, incrementa la viabilidad de melatonina debido a la inhibición del metabolismo hepático. El tabaco, por otro lado, a través de la vía de los hidrocarburos aromáticos policíclicos induce el citocromo CYP1A2 y disminuye los niveles de melatonina inmediatamente después de fumar, sin afectar a los niveles endógenos nocturnos (275).

## MECANISMOS DE ACCIÓN

### MECANISMOS MEDIADOS POR RECEPTOR

Para llevar a cabo la mayoría de sus actividades eliminadoras de RL, melatonina no precisa de ningún tipo de interacción más allá de la que tiene con la

molécula a depurar. Para ejercer el resto de sus funciones encontramos dos receptores: los receptores MT1 (conocido también como Mel1a) y MT2 (Mel1b). Los receptores de melatonina humanos (de los genes *MTNR1A* y *MTNR1B*) presentan diferentes estructuras moleculares, características farmacológicas y lugares cromosómicos (4q35.1 para MT1 y 11q21–q22 para MT2). Estos receptores presentan 350 y 362 aminoácidos de longitud, respectivamente, con unos pesos moleculares de 30-40 kDa y un 55% de homología global en sus aminoácidos (70% si nos referimos a los dominios transmembrana).

Tanto MT1 como MT2 son receptores acoplados a proteínas G, formados por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , en forma de heterotrímeros. Estas proteínas están formadas por 7 dominios transmembrana, y su distribución es ligeramente diferente, ejerciendo además diferentes funciones: MT1 se expresa principalmente en el SNC, hipocampo, sustancia negra y área tegmental ventral, mientras que MT2 se encuentra en células del sistema inmunitario, cerebro (hipotálamo y NSQ), retina, glándula pituitaria, vasos sanguíneos, testículos, riñones, tracto gastrointestinal, glándulas mamarias, tejido adiposo y en la piel (294, 295). En la retina y el SNC encontramos ambos tipos de receptores, donde actúan inhibiendo la liberación de dopamina, de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), disminuyendo la presión intraocular, y la activación neuronal (296). Están implicados en procesos de memoria, estado anímico y locomoción. También se ha observado que alteraciones en sus patrones de expresión desencadenan o facilitan la progresión de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, insomnio, cáncer... (297-300). Existe una amplia distribución de estos receptores, encontrándolos tanto a nivel de la vasculatura, órganos reproductores, tracto gastrointestinal... donde melatonina ejercerá una acción paracrina (296, 301, 302).

El tradicionalmente conocido como MT3, es en realidad un sitio de unión de baja afinidad de melatonina que se encuentra en la enzima citosólica NRH:quinona oxidoreductasa 2.

## MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Este derivado del triptófano es un importante depurador de RL: es capaz de eliminar directamente los radicales  $\cdot\text{OH}$  generados por la reacción de Fenton a partir del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{ONOO}^-$ . Reduce la LPO en el cerebro producida por la intoxicación por agentes generadores de RL y bloquea la toxicidad inducida por  $^1\text{O}_2$  y otros radicales derivados del  $\text{O}_2$  (303).

De forma indirecta, influye en los sistemas de defensa antioxidante, regulando positivamente la expresión de ciertos genes y estimulando la actividad de enzimas antioxidantes, entre las que se incluyen la GPx, GR, SOD, CAT y los niveles de glutatión. También actúa inhibiendo enzimas pro-oxidantes como la NOS y se han descubierto propiedades inmunomoduladoras de la respuesta inmune celular y humoral (304).

No sólo melatonina, sino también los metabolitos que se derivan de ella presentan capacidades antioxidantes: la molécula 6-hidroximelatonina, producida mayoritariamente para permitir la excreción de melatonina por la orina, es capaz de reducir los niveles de LPO, al igual que el daño a ADN y la neuro- hepato- y nefrotoxicidad producida por ciertos metales y compuestos, debido a su capacidad de interactuar directamente con RL y por su capacidad antioxidante. Los principales metabolitos de melatonina son AFMK y AMK; ambos son capaces tanto de interactuar directamente con radicales como  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OOH}$ ,  $\cdot\text{OCCl}_3$ , ... como de inhibir la actividad de enzimas pro-oxidantes y pro-inflamatorias como son la NOS, disminuyendo la concentración intracelular de NO, o la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2)(305, 306). También son capaces de inhibir la síntesis de PG, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina-8 (IL-8), reducir la oxidación de los lípidos y proteínas, y el ataque producido por EROs sobre la cadena de ADN (307).

## SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA

Como ya se ha comentado previamente, melatonina se va a secretar por la noche, independientemente de que se esté sintetizando en animales nocturnos o diurnos; sin embargo, las respuestas que va a provocar van a ser distintas, por lo que

sólo se la puede llamar “hormona del sueño” en el caso de los animales diurnos. Entre estos animales y los nocturnos, se observan unas variaciones diarias en los niveles de los ácidos grasos libres, glucocorticoides, grelina, leptina y glucosa plasmática en anti-fase, debido a la regulación por la luz del SNC, que regula el sistema circadiano, y éste a su vez, regula los “sistemas reloj periféricos” que encontramos en los tejidos (hígado, tejido adiposo, estómago, glándula adrenal e intestino, entre otros). En el caso de la glucosa plasmática, por ejemplo, mientras que en los animales diurnos, como los humanos, mayoritariamente muestran una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina durante el periodo de mayor actividad, es decir, durante el día, en los animales nocturnos, como los roedores, ocurriría esto durante la noche, momento en el que presentan su mayor nivel de actividad (308).

Cuando melatonina es producida por los fotorreceptores retinianos, parece tener un efecto local dentro de la propia retina, además de actuar como un neuromodulador de la función retiniana. Así influiría en las respuestas retinomotoras, modulación de la liberación de neurotransmisores (liberación de dopamina), fagocitosis de los discos de los SE de los bastones y sensibilidad a la luz (274, 278).

En relación con las degeneraciones, la melatonina ha demostrado aumentar la autofagia a favor de la supervivencia celular (309-311). También es un potente antioxidante, dado que interacciona directamente con radicales libres, neutralizándolos (312). Asimismo, se ha demostrado su eficacia antiapoptótica en el EPR (313, 314). Melatonina disminuye en el glaucoma la concentración sináptica de glutamato y por lo tanto induce una neuroprotección frente al daño excitotóxico (315). Además tiene acción sobre la secreción de VEGF y la migración celular (316) y estimula la actividad de la telomerasa en la DMAE (317).

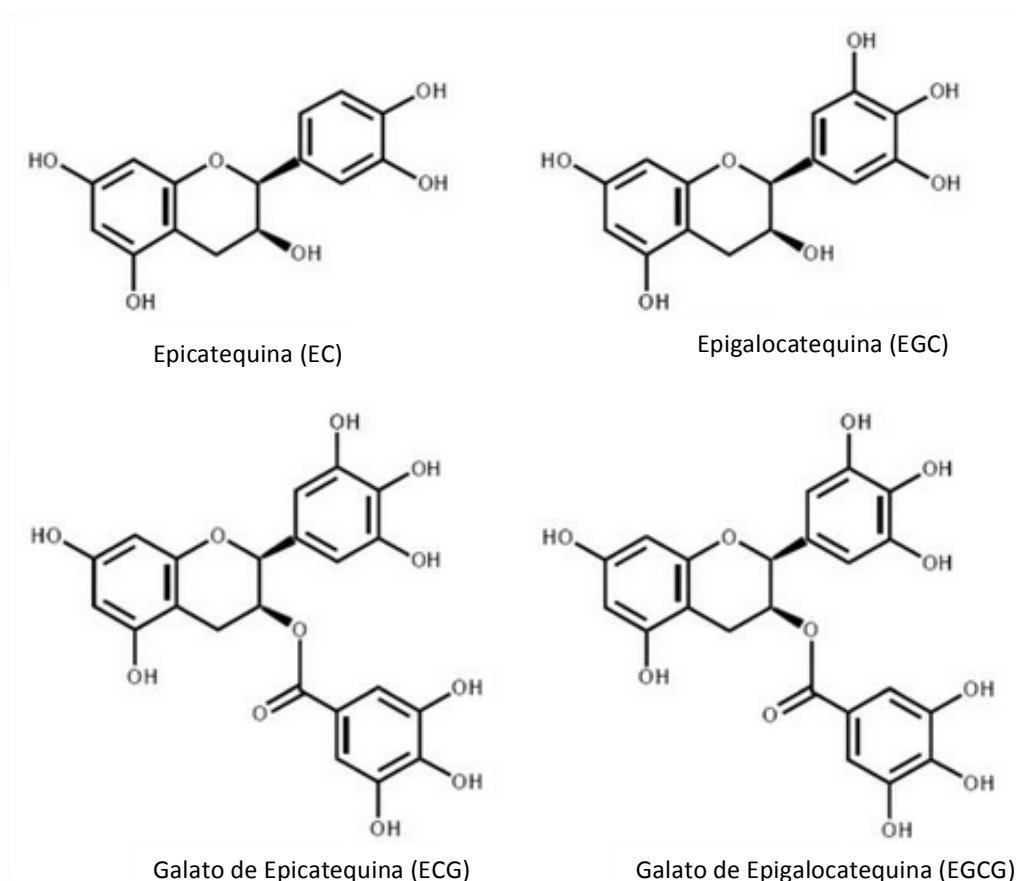


## GALATO DE EPIGALOCATEQUINA

### PRESENTE EN EL TÉ VERDE

El té procede de la planta *Camellia sinensis*, y es la segunda bebida más consumida en el mundo después del agua, calculándose una ingesta diaria de aproximadamente 120 mL por persona. Además, del volumen total de té producido y consumido, aproximadamente un 78% se corresponde con té negro, un 20% con té verde y un 2% con té Oolong. También existen diferencias en cuanto a su popularidad en los distintos países: el té negro es más característico de los países occidentales (Europa y Norteamérica), aunque también se encuentra en algún país asiático; el té verde se encuentra mayoritariamente consumido en China, Japón, la India y ciertos países del norte de África y países del Este. El té Oolong se va a encontrar sobre todo en áreas localizadas del sudeste asiático y Taiwán (318, 319). Las hojas de esta planta van a experimentar distintos procesos de oxidación y fermentación que darán lugar a las distintas variedades de té, las cuales se caracterizarán por distintas concentraciones y tipos de compuestos fenólicos, en función del procesamiento realizado: en el caso del té verde, las hojas recién recogidas van a sufrir un proceso de cocción que tiene como objetivo inactivar las enzimas, obteniendo un compuesto seco y estable que mantendrá sus propiedades beneficiosas. A pesar de esto, es inevitable cierta oxidación de las hojas, por lo que en este té vamos a encontrar entre un 60 y un 80% de la composición de polifenoles como catequinas y el resto como una serie de polímeros de catequinas. En el caso del té negro, las hojas del té van a sufrir un proceso de oxidación y fermentación con el objeto de transformar su contenido de catequinas en otras moléculas conocidas como teaflavinas y tearrubiginas, polifenoles condensados más complejos, responsables del olor y color característicos de estos tipos de té (318). En el tratamiento del té Oolong, la oxidación es más corta que en el caso del té negro, obteniendo una composición intermedia entre el té negro y el té verde. Ambos tipos moleculares se caracterizan por sus potentes capacidades antioxidantes (320).

Algunas de las catequinas que encontramos en la composición del té verde son epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECG), epigallocatequina (EGC) y galato de epigallocatequina (EGCG). Las diferencias estructurales que encontramos entre ellas van a ser las responsables de las diferencias en su eficacia y eficiencia en cuanto a su poder antioxidante (ver Figura 11): el EC posee un grupo orto-dihidroxilo en los carbonos 3 y 4 del anillo B y un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C; el EGC, además de la estructura del EC, presenta tres hidroxilos en los carbonos 3, 4 y 5 del anillo B. Por otro lado, el ECG se diferencia del EC por un dominio galato esterificado en el carbono 3 del anillo C. Para finalizar, el EGCG posee ambas cualidades, los 3 grupos hidroxilo del EGC y el dominio galato del ECG (321). Éste último, es el más abundante de todos ellos, con un 48-55% del total de catequinas, además de ser considerado como la biomolécula más activa debido a la presencia de los dominios y grupos químicos previamente mencionados.



*Figura 11. Estructuras de las 4 principales catequinas que encontramos en el té verde. Adaptado de (322).*

## BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO

Algunos estudios han comprobado que el EGCG va a ser eliminado a través de la bilis, mientras que otras catequinas también podrán ser excretadas por medio de la orina. Además, este compuesto puede ser metabolizado por numerosas vías metabólicas (las principales transformaciones que experimentan son las de glucuronidación, metilación y sulfonación (323)) y alcanzar distintos órganos en función de la vía de administración (324). Diferentes estudios han analizado la biodisponibilidad y absorción de las distintas catequinas del té verde, observándose diferencias entre especies: aunque la absorción del EGCG se da a nivel intestinal tanto en ratas, ratones y humanos, en la caso de las ratas los niveles plasmáticos que se observaron del EGCG fueron menores que otras catequinas; en cambio, al realizar el experimento en ratones se observaron los hallazgos contrarios. En humanos, la

biodisponibilidad del EGCG es también menor respecto al EGC o ECG, sufriendo menos procesos de metilación y conjugación que los otros dos compuestos (325, 326).

## MECANISMO DE ACCIÓN

El EGCG presenta una gran capacidad antioxidante, siendo capaz de influir en las enzimas antioxidantes endógenas como la SOD, CAT, GPx, GR y GST. También se ha demostrado que regula la producción del GSH celular, actuando sobre una de las subunidades catalíticas de la enzima limitante de la síntesis *de novo* de esta molécula (327, 328).

La actividad antioxidante de esta molécula se debe principalmente a la presencia de grupos fenólicos en su estructura, los cuales son sensibles a la oxidación y pueden generar quinonas. Además en el anillo D del EGCG encontramos 3 grupos hidroxilo, lo cual incrementa su capacidad antioxidante respecto a otras catequinas (329). Los anillos fenólicos actúan captando electrones para la eliminación de radicales  $ROO\cdot$  e  $\cdot OH$ , y aniones  $O_2^{\cdot-}$  y previniendo la oxidación de metales como el hierro. Este polifenol también puede influir sobre el estado nitrosativo del organismo, inhibiendo la actividad de la iNOS y, por lo tanto, reduciendo la producción de nitritos y  $ONOO^-$  (330). Presenta una gran importancia como quelante de metales de transición como el aluminio, el manganeso y el hierro: el anillo galato (anillo D) es el que participaría en esta reacción, uniéndose a los iones metálicos a través de los grupos hidroxilos presentes en este anillo. De forma más secundaria, también el anillo B es capaz de llevar a cabo este proceso, dando un ratio final de unión de 4 iones de hierro por cada molécula de EGCG (331). De forma más indirecta EGCG, es capaz de disminuir los niveles de EROs gracias a sus propiedades antiinflamatorias, que inhibirían la activación de NF- $\kappa$ B, e impedirían la formación de estas moléculas en el proceso inflamatorio.

No sólo el EGCG presenta actividad antioxidante, sino que algunos de sus metabolitos como sus derivados metilados pueden inhibir la formación de nitrotirosina mediada por el  $ONOO^-$  y la actividad de la NADPH oxidasa, fuente endógena de RL (332).

## SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA Y APLICACIONES

Para la medicina tradicional China, los tratamientos basados en plantas son uno de sus pilares fundamentales debido a la multitud de propiedades beneficiosas que se ha demostrado, presentan para la salud: antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antivirales y antibacterianas, además de reducir el daño oxidativo producido por el avance de la edad y las enfermedades (333, 334).

El té verde se ha utilizado durante siglos en la medicina tradicional China como complemento o tratamiento de enfermedades como el cáncer, problemas cardiovasculares, óseos, bucales, enfermedades neurodegenerativas... (325, 335). Probablemente debido a que conforma más del 50% de la composición de las catequinas totales en el té verde (en una taza de té de 200 mL obtenida a partir de 2,5 g de hojas de té, Wu y cols. (336) determinaron que se encuentran 90 mg de EGCG), el EGCG es una de las catequinas mejor conocidas y estudiadas, a la cual se le atribuyen propiedades antimutagénicas, antidiabéticas, antibacterianas, antiinflamatorias, antitumorales, hipocolesterolemiantes, antioxidantes..., comprobadas en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales y en ensayos clínicos.

EGCG es capaz de inhibir el desarrollo de tumores por su interacción con numerosas proteínas apoptóticas de la vía de las caspasas, estimulando su acción, y con factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) (337). También es capaz de ejercer su acción sobre proteínas del ciclo celular, factores de crecimiento y proteínquinasas (329). Además de estos mecanismos, el EGCG posee propiedades neuroprotectoras, las cuales se han observado en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, actuando como quelante de metales, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD y disminuyendo los niveles de RL como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (337, 338).

Gracias a su bajo peso molecular y carácter hidrosoluble, las catequinas son capaces de alcanzar los diferentes compartimentos y tejidos oculares (339): córnea, cristalino, retina... para ejercer su acción antioxidante, de ahí que sea un compuesto

estudiado también para tratamiento en enfermedades como cataratas, ojo seco, glaucoma, DMAE, RP... (340-343).

Estudios previos ya han demostrado el efecto beneficioso de EGCG, por sus propiedades antioxidantes, en patologías retinianas como glaucoma (341, 344), DMAE (341), retinopatía diabética (345) y en isquemia retiniana (341, 346, 347).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## HIPÓTESIS

El estrés oxidativo, la apoptosis y los procesos de inflamación son las principales causas de muerte celular a nivel retiniano en las enfermedades retinianas neurodegenerativas. A nivel terapéutico, los antioxidantes naturales, melatonina y EGCG presentan efectos beneficiosos que podrían contrarrestar la progresión de las degeneraciones retinianas, al ser capaces de reducir o inhibir parcialmente estos procesos y estimular las defensas antioxidantes del propio organismo.

La melatonina posee numerosas propiedades imprescindibles para el organismo como regulador de procesos biológicos, pero también destaca por sus capacidades antiinflamatorias, por su gran potencia antioxidante, por lo que podría ser capaz de depurar los radicales libres que se producen debido a la toxicidad de los retinoides en los fotorreceptores durante la degeneración de la retina. Asimismo, los efectos protectores de la melatonina pueden estar relacionados con su efecto directo antiapoptótico a nivel del EPR (313, 314). Además, puede actuar a través de otros mecanismos diferentes de los antioxidantes/antiapoptóticos dado que el EPR posee receptores de melatonina que le permiten actuar localmente (317). También su acción protectora frente a la excitotoxicidad (315) y al daño mitocondrial y de mantenimiento de una adecuada homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (348, 349), podría ser beneficioso en la prevención de la remodelación de los circuitos retinianos observados durante las degeneraciones retinianas (350). Además, es capaz de actuar como una hormona, al ser liberada al torrente sanguíneo y actuar de forma sistémica: encontramos receptores de melatonina distribuidos en distintos órganos y tejidos, por lo que podrá ejercer sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas en todo el organismo. La secreción de melatonina, que en los humanos regula los ritmos circadianos (351-355), está alterada en los pacientes con degeneración retiniana como la RP (356), por lo tanto, reestablecer estos niveles podría disminuir las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En un modelo animal de RP, la pérdida visual y la fragmentación progresiva de los patrones circadianos fueron parcialmente revertidos por melatonina (357).

El galato de epigallocatequina es una de las principales catequinas presentes en el té verde. Esta molécula ha sido estudiada durante mucho tiempo gracias a sus numerosas propiedades beneficiosas para los organismos: antiinflamatorias, antiapoptóticas, neuroprotectoras, antialérgicas, antidiabéticas, antibacterianas y antioxidantes (358). Sus efectos neuroprotectores actúan regulando la expresión de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, cuya producción se ve estimulada en situaciones de estrés oxidativo, de ahí que se haya demostrado su efectividad en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, en las cuales los EROs juegan un papel fundamental en el avance de la enfermedad (359).

Es capaz de alcanzar los tejidos oculares, atravesando la barrera hematorretiniana y ejerciendo su acción sobre la retina y el EPR, y otras estructuras oculares (360-363). Con estos fundamentos se postuló como una molécula de utilidad en el tratamiento de patologías oculares, lo cual ha sido demostrado en glaucoma, DMAE, retinopatía diabética y en isquemia retiniana (341, 345, 347, 364, 365). En ellas existe una clara participación del estrés oxidativo en su patogenia y progresión, al igual que ocurre en la RP.

Por todo esto, la hipótesis de nuestro estudio es que melatonina y/o EGCG pueden enlentecer los daños celulares retinianos en las degeneraciones retinianas contrarrestando el exceso de EROs y ERNs producidos por la enfermedad ya sea de forma directa o indirecta, eliminándolos ellos mismos o estimulando los diferentes sistemas antioxidantes, consiguiendo un mantenimiento de las funciones visuales y no visuales de la retina.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la acción neuroprotectora de melatonina y EGCG frente a los procesos fisiopatológicos que se desencadenan durante la progresión de la RP, utilizando el modelo animal de esta enfermedad, la rata P23H, con vistas a su posible aplicación terapéutica en la prevención y tratamiento de las degeneraciones retinianas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto protector de melatonina y/o EGCG en la progresión de la enfermedad RP en la rata P23H línea 1, heterocigota pigmentada y en el animal de referencia mediante pruebas funcionales:
  - 1.1. Evaluar la AV y la SC mediante un sistema de seguimiento optocinético a animales tratados con distintos antioxidantes y a distintas edades.
  - 1.2. Evaluar la actividad eléctrica retiniana mediante ERG al finalizar el período de administración de los antioxidantes.
  - 1.3. Evaluar el efecto de las moléculas administradas sobre los ritmos circadianos mediante telemetría, realizando el registro de los parámetros de temperatura y actividad a distintas edades.
  - 1.4. Comparar los resultados obtenidos con el grupo que solo recibe vehículo y con los animales de referencia.
  - 1.5. Analizar los mismos parámetros en los animales sanos, para valorar el efecto de la suplementación con antioxidantes en las funciones visual y circadiana de individuos sanos.
2. Evaluar el estado oxidativo hepático de la rata P23H línea 1 heterocigota pigmentada y del animal de referencia tras el tratamiento con melatonina y/o EGCG:
  - 2.1. Analizar los parámetros de estrés oxidativo mediante LPO, restos carbonilos, y ratio GSH/GSSG.
  - 2.2. Analizar el daño nitrosativo por la cuantificación de los niveles de nitritos.
  - 2.3. Comparar los resultados obtenidos con el grupo que solo recibe vehículo y con los animales de referencia.

- 2.4. Analizar los mismos parámetros en los animales de referencia , para valorar el efecto de la suplementación con antioxidantes en los niveles oxidativos sistémicos de individuos sanos.
3. Evaluar distintos sistemas endógenos antioxidantes hepáticos de la rata P23H línea 1 heterocigota pigmentada y del animal de referencia tras el tratamiento con melatonina y/o EGCG:
  - 3.1. Analizar la capacidad total antioxidante, para conocer el estado de defensa de los animales.
  - 3.2. Analizar la actividad enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GST.
  - 3.3. Comparar los resultados obtenidos con el grupo que solo recibe vehiculo y con los animales de referencia.
  - 3.4. Analizar los mismos parámetros en los animales de referencia para valorar el efecto de la suplementación con antioxidantes en los niveles antioxidantes de individuos sanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS



## MODELOS ANIMALES

Para la realización del proyecto se utilizaron dos tipos de ratas, un modelo animal de RP y un grupo de referencia:

- Como modelo de animal neurodegenerativo se trabajó con las ratas pigmentadas P23H-1, heterocigotas para la mutación. Estos animales presentan una degeneración retiniana que se desarrolla a un ritmo intermedio, permitiendo la realización de un tratamiento a largo plazo con los distintos antioxidantes, y la realización de diversas pruebas funcionales para la evaluación visual. Las ratas pigmentadas P23H fueron criadas por el cruce entre ratas normales Long Evans (LE) pigmentadas y ratas homocigotas P23H-1 albinas, modelo transgénico de RP de degeneración rápida. Estas ratas procedían del laboratorio del Prof. Matthew LaVail de la Universidad de California, San Francisco, EEUU, y han sido mantenidas en la colonia en las instalaciones de la Universidad de Zaragoza. Estos animales se obtuvieron por la modificación genética de ratas SD, a las cuales se les incorpora un transgen mutado P23H del ratón C57BL/6J: este transgen se obtiene a partir del fragmento genómico completo del gen de la rodopsina de este ratón (366) que carece de un fragmento en el brazo lambda debido a la mutación P23H. Existen 3 líneas con este transgen que se diferencian en la velocidad de progresión de la enfermedad, siendo la línea 1 la que presenta un avance más rápido, y la línea 2 la más lenta, y la línea 3 una velocidad intermedia. Las ratas homocigotas P23H línea 1 presentan 18 copias del transgen P23H, mientras que las ratas heterocigotas obtenidas tras el cruce de las P23H homocigotas con ratas wild-type, presentan la mitad de copias. También existen diferencias en los niveles de expresión del transgen: la línea 1 presenta una mayor expresión que la línea 3, razón por la cual experimenta una degeneración retiniana más rápida (367). En este modelo animal, al igual que en los pacientes, de forma subsecuente a la muerte de los bastones, se produce una afectación a nivel de los conos, y que avanzará hasta una desestructuración y remodelación retiniana completa que conlleva la ceguera total en estadios tardíos.

- Como grupo de referencia se trabajó con ratas pigmentadas LE cruzadas con ratas albinas Sprague-Dawley (SD). El origen de la rata pigmentada LE se remonta al año 1915, cuando los Drs. Long y Evans cruzaron varias hembras de rata de la raza Wistar, albinas, con un macho salvaje gris. Con este modelo animal se trabaja en una amplia diversidad de estudios, destacando las investigaciones sobre obesidad y comportamiento. Las ratas utilizadas en nuestros experimentos procedían de los Laboratorios Charles River (Barcelona, España).

La rata SD es un modelo animal originado en 1925 por Robert Dawley mediante el cruce de un macho híbrido y una hembra Wistar, ampliamente utilizada en la investigación médica, en investigaciones relacionadas con el envejecimiento, el cáncer, nutrición, obesidad... Las ratas transgénicas P23H poseen un fondo genético albino de rata SD por lo que se seleccionaron para su cruce con ratas LE y obtener de esta forma un grupo referencia de rata pigmentada. Las ratas SD utilizadas para el cruce con ratas LE procedían de los Laboratorios Harlan (Barcelona, España).

Todos los animales fueron criados en colonias en el animalario del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón), con la autorización y supervisión de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI12/14). Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (con una iluminancia variable entre 7 lux y 30 lux en función su posición en la jaula) con comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos y la manipulación de los animales se llevaron a cabo siguiendo Todos los experimentos se realizaron cumpliendo estrictamente la normativa vigente europea (Directiva 201/63/UE), española (Real Decreto 53/2013) y autonómica (Ley 11/2003) para el uso de animales de experimentación, y la Declaración de ARVO para el uso de animales en investigación oftalmológica y de la visión.

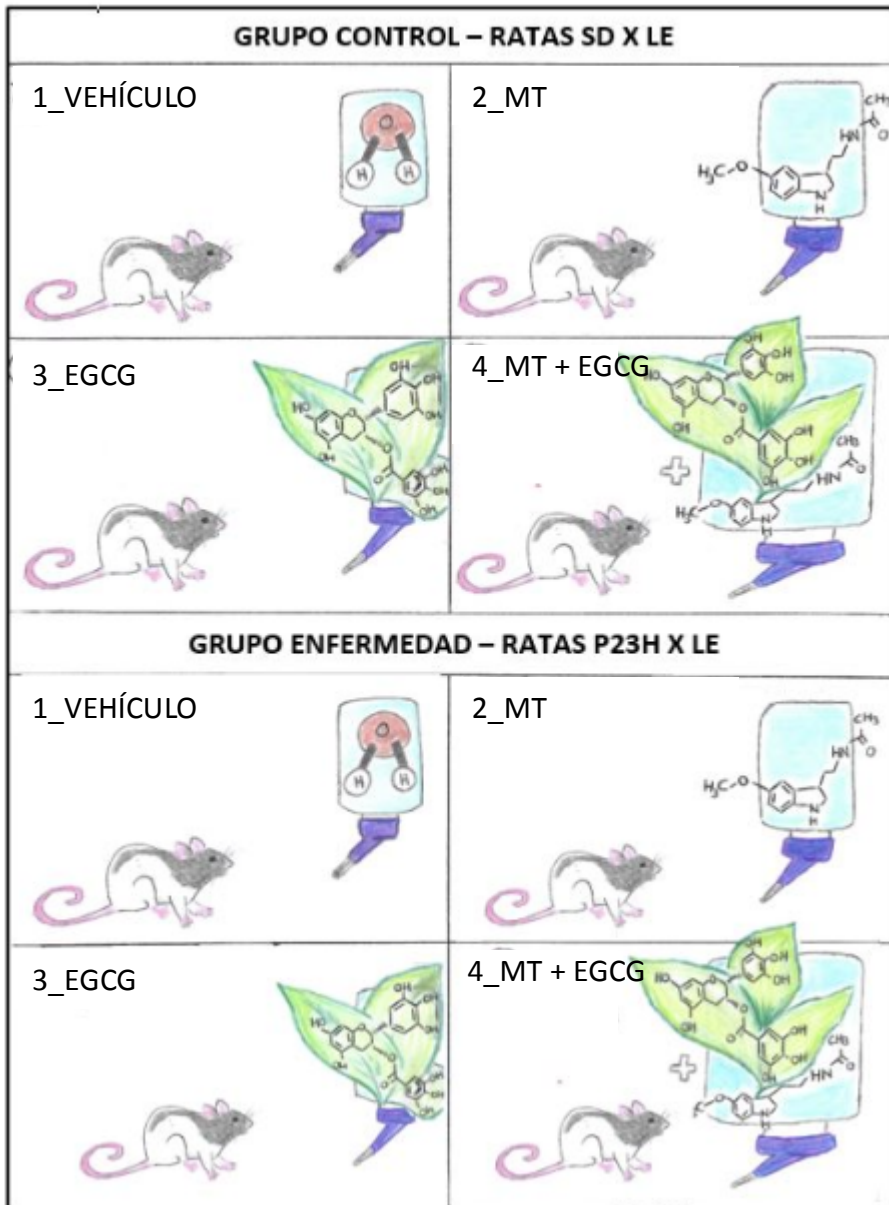


## DISEÑO EXPERIMENTAL

Tanto el grupo formado por el modelo de RP como el grupo de referencia se subdividieron en 4 grupos de estudio, según las sustancias administradas en el agua de bebida (Figura 12):

- Grupo Vehículo: se administró agua de bebida exclusivamente con la misma proporción de etanol que la mínima necesaria para disolver los tratamientos en los otros grupos, como se detalla más adelante.
- Grupo MT: se les administraba el antioxidante melatonina en el agua de bebida a una concentración de 10 mg/Kg/día.
- Grupo EGCG: se les administraba el antioxidante EGCG en el agua de bebida a una concentración de 10 mg/Kg/día.
- Grupo MT+EGCG: se les administraba un tratamiento compuesto por los dos antioxidantes anteriores, melatonina y EGCG, ambos a las concentraciones de 10 mg/Kg/día igualmente en el agua de bebida.

En el caso de los animales P23HxLE, todos ellos eran machos; en el caso de los animales SDxLE, por problemas reproductivos, no pudieron utilizarse únicamente machos y fue necesario incluir hembras para alcanzar la “n” necesaria para el estudio. Para minimizar la influencia que podría producirse en las respuestas debido a factores hormonales, se incluyó una única hembra en los 4 grupos de tratamiento.



**Figura 12.** Diseño experimental del estudio.

Ratas heterocigotas transgénicas P23HxLE y ratas de referencia SDxLE divididas en 4 grupos de tratamiento: grupo vehículo: sin ningún tratamiento antioxidante; grupo MT: tratadas con melatonina; grupo EGCG: tratadas con EGCG y grupo MT+EGCG: tratadas con los dos antioxidantes anteriores de forma combinada.

## PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Previa a la administración de las sustancias en el agua de bebida, fue necesario el cálculo aproximado del consumo de agua por parte de los animales y el peso de los mismos.

La fórmula utilizada para el cálculo correcto de la concentración de cada compuesto que se administraba a los animales fue:

$$\frac{\text{(Dosis del tratamiento x peso del animal x volumen de la botella)}}{\text{consumo de agua estimado}}$$

El peso de los animales P23HxLE al iniciar el tratamiento oscilaba entre 85 y 120 g. En el caso de las ratas SDxLE, fue ligeramente superior: entre 100 y 130 g. El consumo de agua inicial estimado fue de entre 25 y 35 mL de agua. Se realizó un pequeño estudio inicial para decidir la cantidad mínima de etanol empleada en la disolución de las sustancias antioxidantes en las ratas P23HxLE, lo que supuso que estos animales tuvieran un mayor consumo de agua la primera semana; sin embargo, tras la reducción de la concentración de etanol se redujo este consumo hasta equipararse al de las ratas SDxLE. Tanto el peso como el consumo de agua se fueron comprobando semanalmente, para adecuar la cantidad de compuesto preparado en cada vial a los animales.

Dado que melatonina no es soluble en agua fue necesaria la adición de la mínima cantidad de etanol posible para su disolución: un 0,2% de etanol. Para evitar variaciones en los resultados debido al consumo de etanol, se decidió disolver en todos los grupos este porcentaje de etanol en el agua de bebida.

Los tratamientos se cambiaban dos veces a la semana, los lunes y los viernes, para reducir lo máximo posible la oxidación de los tratamientos. Debido a que las moléculas utilizadas como tratamiento son sensibles a la oxidación por la luz, se utilizaron biberones de color negro que impedían el paso de la luz.

Los tratamientos tuvieron una duración total de 6 meses, durante los cuales se realizaron distintas medidas para llevar a cabo la valoración de la función visual y su progresión con el tiempo.

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN VISUAL

Para la obtención de una evaluación funcional completa de la visión tanto en el modelo degenerativo como en el de referencia, se utilizan el sistema Optomotor y el ERG.

### OPTOMOTOR

El sistema Optomotry® (CerebralMechanics, Lethbridge, AB, Canada), es un sistema optocinético, no invasivo, que nos va a permitir de una forma rápida y sencilla, cuantificar la visión espacial de nuestros animales, independientemente de su especie, cepa o entrenamiento previo (368). La valoración de la visión espacial (369, 370) es mucho más sencilla en animales pigmentados que en albinos, tanto por la menor visión de estos últimos como por las conexiones entre ambas vías visuales. Ésta, junto a que el modelo pigmentado es mucho más aproximado al ojo humano, fueron las razones para utilizar animales pigmentados. El aparato está compuesto por un área donde se realizará la prueba, compuesta por 4 monitores de ordenador dispuestos formando un área cuadrangular, encima del cual se sitúa una caja de plexiglás. Uno de los laterales de esta caja es una puerta con bisagras, la cual nos permite colocar al animal en la zona de pruebas, sobre una plataforma que se encuentra justo en el centro, a una altura de 13 cm. Esta plataforma presenta bases de distintos tamaños, adaptándose de esta forma a la edad y tamaño de los animales de estudio.

En la parte superior de la estructura, se encuentra una videocámara, la cual nos permitirá analizar el comportamiento del animal a través de su conexión con un ordenador, grabar sus respuestas... En el cubículo en el que se sitúa el animal durante el experimento, se encuentra ventilado y a oscuras, para que los estímulos que se le apliquen presenten la luminancia adecuada (371).

La técnica se basa en la proyección de líneas, a distintas frecuencias espaciales y de distinto contraste que se mueven a una velocidad constante (12 °/s), creando un cilindro virtual en 3 dimensiones el cual utilizaremos para valorar la discriminación visual de los animales.

Al iniciar el procedimiento, las ratas son colocadas sobre la plataforma, con la tapa de la caja cerrada y permitiendo su libre movimiento. Cuando el estímulo proyectado es percibido por el animal, éste generalmente detiene su movimiento, realizando únicamente un movimiento reflexivo con la cabeza y el cuello, estable y continuo, cuyo giro coincidirá con la dirección de rotación de las bandas que aparecen en la pantalla. Para poder mantener las paredes virtuales del cilindro a una distancia constante y, por tanto, la frecuencia espacial, es necesario que el personal que realice la prueba siga la cabeza del animal con una cruz superpuesta a la imagen del vídeo que aparecerá en el ordenador con el que trabaja. Las coordenadas de posición “x” e “y” del punto de mira fueron utilizadas como centro de rotación del cilindro en la posición de visualización de la rata.

Se evaluó si los animales seguían el cilindro mediante el control de la imagen del cilindro en la ventana del video, el animal y el punto de mira simultáneamente. Así, si la cabeza del animal seguía la rotación del cilindro, lo que era evidente por el movimiento de la cabeza desde el punto de mira, se juzgó que el animal podía ver la rejilla.

El sistema optocinético permite realizar dos pruebas de umbral diferentes para evaluar la función visual de los roedores: AV y SC. La determinación de los umbrales de ambos parámetros va a depender del juicio subjetivo del observador y de su experiencia y entrenamiento previos.

---

## EVALUACIÓN DE LA AGUDEZA VISUAL

Tanto en este caso, como en el análisis de la SC, previo a cada estímulo se va a proyectar sobre las pantallas un estímulo gris, homogéneo. Cuando el observador lo decida, se proyectará el estímulo inicial, de baja frecuencia espacial (0,042 ciclos/°) y máximo contraste (100%), a la velocidad de 12 °/s. Esto se mantendrá durante 5 segundos, tras lo cual se reestablecerá el fondo gris, evitando así la habituación del animal. Si el animal realiza un movimiento de cabeza, que coincide con la dirección de giro que aparece en el programa, el observador seleccionará la opción “Sí” y el sistema incrementará la frecuencia espacial del siguiente estímulo, en esa dirección, con el fin

de determinar el umbral de visión del animal. Si por el contrario, no se ha percibido ningún tipo de movimiento por parte del animal, el estímulo se repetirá hasta en 3 ocasiones, o hasta estar completamente seguros de que el animal es incapaz de percibir nada en el monitor. En este caso, automáticamente se disminuirá la frecuencia espacial. Cuando el animal deja de percibir el estímulo en las dos direcciones (en sentido horario y anti-horario, correspondiéndose con los ojos izquierdo y derecho, respectivamente) se considerará que se ha alcanzado el umbral o valor de máxima agudeza visual.

## **EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD AL CONTRASTE**

Para la evaluación de la sensibilidad al contraste se comienza a una frecuencia espacial inicial de 0,022 ciclos/°, con una rejilla al 100% de contraste, que se va reduciendo de forma sistemática, siguiendo la forma de trabajo previamente descrita, hasta que se identifica el umbral de contraste. Este umbral se calcula mediante la ecuación de Michelson, en la que se utiliza la diferencia de luminancia entre las franjas blancas y negras proyectadas. Se realizó la curva de SC evaluando las frecuencias espaciales 0,022, 0,042, 0,089 y 0,175 ciclos/°, identificando en cada caso, el mínimo contraste que es capaz de generar respuesta por parte del animal.

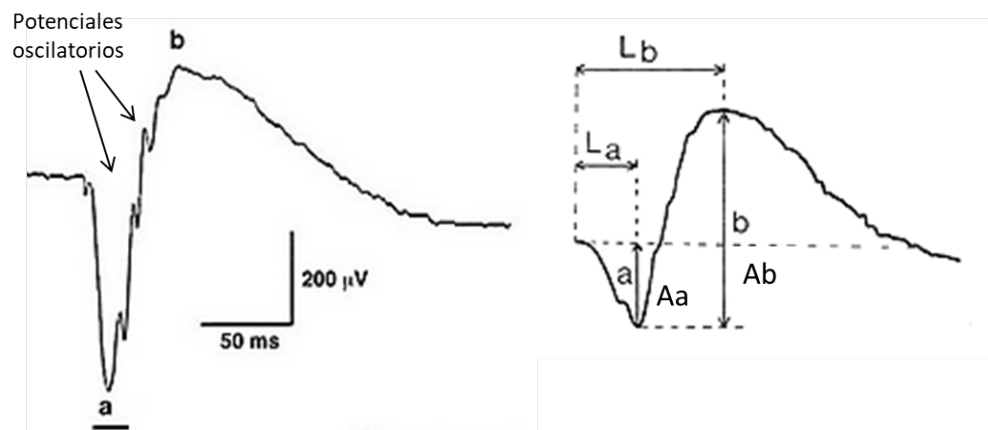
La valoración de ambos parámetros, incluyendo el tiempo necesario para la adaptación del animal al aparato, implica entre 45 y 60 minutos por animal.

La medición, tanto de la AV como la SC se realizó a distintos tiempos: una primera medida con 1 mes (P30), previo al inicio del tratamiento, que nos permitió crear los grupos de estudio de forma homogénea y tras haber comenzado el tratamiento: 2, 3, 4 y 6 meses (P60, P90, P120 y P180).

## **ELECTRORRETINOGRAMA**

Técnica utilizada en el diagnóstico de patologías retinianas, que se basa en el registro de los potenciales eléctricos que se producen en la retina tras un estímulo lumínico. El resultado es una onda final compuesta a su vez por 3 elementos: la onda a, b y c, dándonos información acerca de la funcionalidad de las capas externas de la

retina (fotorreceptores y células bipolares), mientras que no nos informa acerca del estado de las células ganglionares. La onda a (negativa) nos aporta información referente a la capa de los fotorreceptores, la onda b (positiva) sobre las células bipolares y las células de Müller y, finalmente la onda c es producida por la respuesta originada en la capa del EPR, y carece de utilidad a nivel clínico sobre todo por la gran dificultad para su obtención (registro tardío con problemas de mantenimiento de la línea basal). En el registro, en la parte ascendente de la onda b, también vamos a encontrar los potenciales oscilatorios, producidos por la actividad de las células que se encuentran en la capa interna de la retina, principalmente células amacrinas. De los 3 componentes, son las amplitudes de las ondas a y b las de mayor importancia y las que nos aportan más información acerca del estado de la retina (Figura 13).



**Figura 13.** Principales ondas de análisis del ERG (ondas a y b) y potenciales oscilatorios.  
*La: latencia de la onda a; Lb: latencia de la onda b; Aa: amplitud de la onda a; Ab: amplitud de la onda b*  
*Adaptado de (372).*

Existen distintas modalidades, pudiendo realizarse bajo adaptación a oscuridad (ERG escotópico) o a la luz (ERG fotópico) (373, 374). Dado que esta prueba puede inducir opacidad en los medios transparentes (córnea y cristalino) e interferir así en los resultados obtenidos con el optomotor, sólo se realizó un registro único tras los 6 meses de tratamiento (P180) y previo al sacrificio, de forma que no interfiriera en las medidas de AV y SC realizadas. Para poder realizar este examen es necesaria una fuente de luz, unos electrodos y un aparato para amplificar y registrar la señal (375). La luz blanca es la elegida para la estimulación de la retina y, para que ésta sea máxima, se escogió utilizar una luz de campo completo o Ganzfeld (sistema ColorDome). Para la

recogida de los datos se utilizó el sistema de Espion® (Espion® Diagnosys, Cambridge, Reino Unido).

Se realizaron registros tras un mínimo de 8 horas de adaptación en oscuridad, con distintas intensidades del estímulo en condiciones escotópicas, para la valoración de las ondas a y b. En primer lugar es necesaria la anestesia de los animales, utilizando una combinación de ketamina-xilacina a las concentraciones de 90 y 10 mg/kg, respectivamente, mediante una inyección intraperitoneal. La elección de la anestesia fue evitando anestésicos que puden deprimir la respuesta del ERG. Se realizó el registro de ambos ojos de modo simultáneo. Es necesaria la dilatación de la pupila para que se estimule la mayor superficie retiniana posible, para lo cual se administró una gota de tropicamida al 1% (Colircusí Tropicamida®, Alcon, Barcelona, España). También se dispuso una gota de Methocel® al 2% (OmniVision, Puchheim, Alemania) en los dos ojos antes de colocar los electrodos en contacto con la córnea para evitar el desecamiento. Ocasionalmente, se administró una gota de solución salina al 0,9% para prevenir nuevamente deshidratación y favorecer el contacto entre la córnea y el electrodo (un hilo de oro circular). Como electrodos de referencia se utilizaron dos agujas de platino de 25G insertadas en las orejas, junto con un electrodo de tierra situado en la cola del roedor. Los electrodos son necesarios para transferir la señal al amplificador. Todos los experimentos se realizaron en absoluta oscuridad, utilizando lo mínimo imprescindible una bombilla de luz roja que nos permitiese llevar a cabo los procedimientos.

## **VALORACIÓN ESCOTÓPICA**

La onda a es el componente del ERG que refleja principalmente la actividad de la capa de los fotorreceptores. En ella también podemos percibir alteraciones en las células de Müller: estas células son altamente permeables a los iones  $K^+$ , y tras la absorción de un fotón de luz por los conos y bastones, se produce una reducción de éstos en el medio extracelular, que se traduce en cambios en el potencial transmembrana de las células de Müller. Cualquier afectación a nivel de los fotorreceptores se mostrará inicialmente como una reducción de la onda a.



La onda b muestra la transmisión del estímulo desde los fotorreceptores a sus células postsinápticas, especialmente bipolares, amacrinas y modificaciones en las células de Müller. Una alteración en la fotorreceptores como la que se produce en los bastones en la RP, origina una disminución de la amplitud de la onda a; conforme esta pérdida de fotorreceptores progresa, la transmisión de la información a las células bipolares se verá afectada, con la consecuente pérdida progresiva de la amplitud de la onda b. En esta modalidad de ERG se realizaron registros de 3 a 8 exposiciones (en función de la intensidad del estímulo) a flashes individuales de 10  $\mu$ s de duración. Los estímulos se presentaron en diez intensidades crecientes, con valores de luminancia variable entre -3,70 y 2,86  $\log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . Cuando un fotón de luz alcanza los fotorreceptores, la molécula de retinal cambia su configuración, activándose y liberándose del pigmento, proceso que se conoce como blanqueamiento de la rodopsina (376). Para minimizar sus efectos, el intervalo entre los estímulos (ISI) se incrementó progresivamente ya que se podría reducir la amplitud de la onda b en flashes sucesivos. El ISI se incrementó desde los 10 segundos para el estímulo de menor intensidad (-3,70  $\log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) hasta los 120 segundos para el estímulo de intensidad más alta (2,86  $\log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ).

La amplitud de la onda a se midió desde la línea base a la depresión de dicha onda, mientras que la amplitud de la onda b se calculó desde el punto más bajo de la onda a hasta el pico de la onda b. Los resultados de las ondas a y b se promediaron para diferentes registros (377).

---

## PROTOCOLO DE DOBLE FLASH

El protocolo de doble flash nos ayuda a separar la contribución tanto de los conos como de los bastones en condiciones escotópicas. Se empleó de modo similar al descrito en trabajos anteriores (378-380). Un primer flash de acondicionamiento es seguido 1 segundo más tarde por el flash de prueba. La función del primer flash es saturar transitoriamente los bastones de modo que no respondan al flash de prueba. La intensidad del flash de acondicionamiento para el blanqueamiento de los bastones se fijó en 1,4  $\log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  para todas las medidas. La respuesta al flash de prueba (1,4  $\log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ), precedido por el flash de acondicionamiento, se consideró como el reflejo

de la actividad de los conos. La respuesta aislada de los bastones se obtuvo restando la onda generada por el flash de prueba a la onda provocada por el primer flash de acondicionamiento. Generalmente, el promedio de 3 a 5 medidas (con un ISI de 120 segundos para asegurar la plena recuperación de la capacidad de respuesta de los bastones) fue suficiente para obtener respuestas claras.

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN NO VISUAL: TELEMETRÍA

### REGISTRO DE TEMPERATURA Y ACTIVIDAD

Se realizó el registro tanto de la temperatura corporal de los animales como de su actividad locomotora a lo largo del día, gracias a un sensor de telemetría (TA-T20®, Data Sciences International, St. Paul, MN, EEUU) esterilizado, que fue implantado intraperitonealmente, en condiciones asépticas, en la zona habilitada para cirugía del animalario cercana a donde se estabulaban las ratas. La cirugía no supuso la muerte de ningún animal, ni se vio comprometida su salud por ella. Los sensores recogían información cada 10 minutos, durante 1 semana durante la cual los animales se dispusieron en una sala habilitada para el registro y se les molestó lo imprescindible para modificar de la menor forma posible el estado de los animales y sus ciclos de sueño-vigilia y no obtener resultados falseados.

El registro se realizó a P60 y a P180, y la información se recogía gracias a un software específico Dataquest A.R.T (Data Sciences International, Minnesota, EEUU), el cual era responsable de la detección de las señales, su registro y posterior análisis.

Los actogramas, ondas medias, periodogramas y análisis de Fourier se calcularon utilizando un software específicamente diseñado para análisis de series temporales (El Temps® version 1.292, Díez Noguera, Universidad de Barcelona). Para determinar los periodos significativos se realizaron periodogramas Sokolove-Bushell con la corrección de Bonferroni (381) para cada animal durante los dos periodos de registro. Este método permite identificar distintos componentes rítmicos. El

porcentaje de varianza (%V) explicado por cada periodo se utilizó como indicador de la importancia de cada componente.

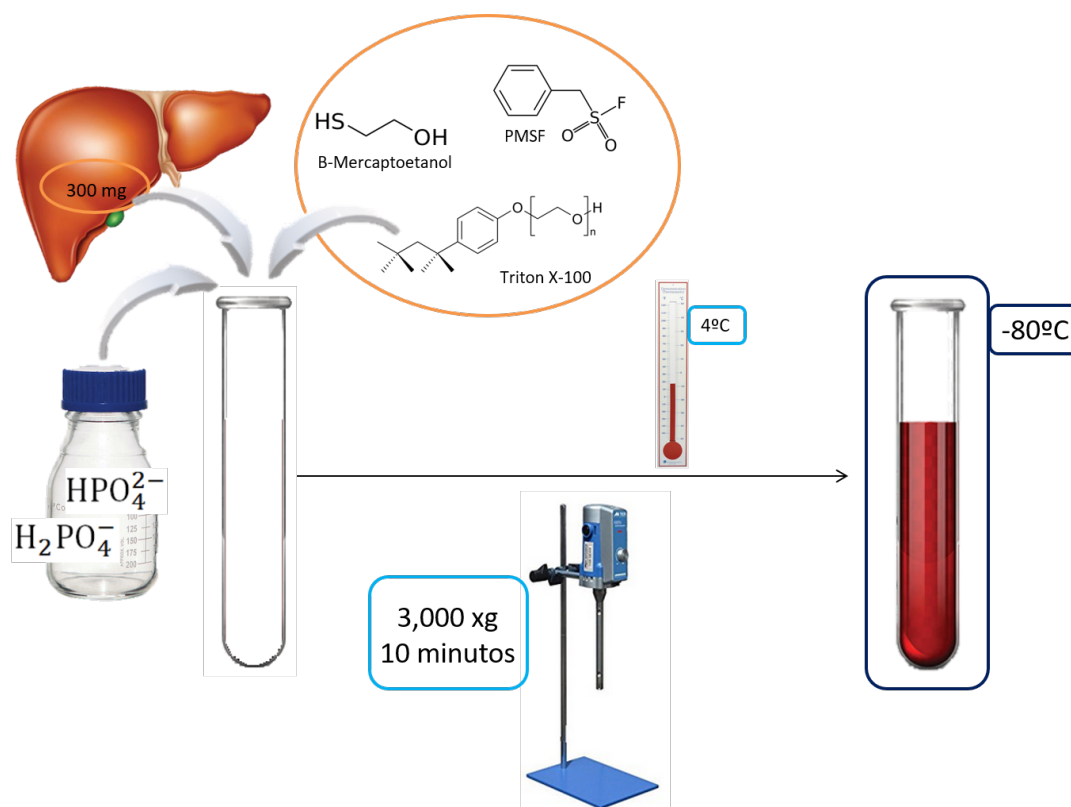
Los registros de temperatura corporal y actividad locomotora también fueron analizados con el programa Circadianware® (Universidad de Murcia). Se analizaron una serie de variables no paramétricas, que cuantifican las principales características de los ritmos circadianos de actividad y descanso, tanto para el parámetro de temperatura corporal como para el de actividad locomotora.

La amplitud relativa (AR) nos indica el ratio entre el período de 10 horas de máxima actividad (representado como M10) junto al de 5 horas de menor actividad (L5) y se calcula según la ecuación:  $(M10-L5) / (M10+L5)$ . Los valores obtenidos están en un rango de 0 a 1, siendo los valores más altos un indicativo de una mayor amplitud del ritmo circadiano. La estabilidad interdiaria (EI), es decir, la estabilidad u homogeneidad entre los diferentes días de la semana, va a presentar unos valores entre 0 y 1, siendo los valores más bajos, los que se correspondan con una peor consistencia en los patrones. La tercera variable se conoce como la variabilidad dentro de cada día (o intradiaria) (VI), y cual cuantifica la fragmentación de los períodos de actividad y descanso dentro del período de 24 horas. Esta variable se cuantifica con valores de 0 a 2, siendo los valores más altos un indicativo de una mayor fragmentación del ritmo, reflejando un mayor número de periodos más cortos, tanto de actividad como de descanso, en lugar de uno de cada tipo de mayor duración. La media de estos 3 parámetros da lugar al índice de funcionalidad circadiana (IFC), obteniendo valores en el rango de 0 a 1, siendo 0 la ausencia de ritmo circadiano y 1 un ritmo circadiano robusto. También se analizaron otras variables como el índice de desincronización, que nos informa acerca de la diferencia de tiempo existente entre el inicio de las 2 horas de menor temperatura (L2) y el inicio de las 2 horas de menor de actividad.

## DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

### HOMOGENEIZADO DE TEJIDOS

Para el correcto análisis bioquímico de los niveles de estrés oxidativo hepático es necesaria la obtención de un correcto homogeneizado de dicho tejido (ver Figura 14), para lo cual se pesaron aproximadamente 300 mg de tejido hepático, a partir del órgano previamente congelado y, evitando en la medida de lo posible su descongelación completa, trabajando siempre en hielo. El tejido se introdujo en un tubo de ensayo y se le añadió el volumen necesario de tampón fosfato (PB) 0,2M pH 7,4, para obtener una dilución final 1/7; 0,5% Triton X-100 (AppliChem Panreac, Barcelona, España, A4975), 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España, M6250) (y 0,1 mg/mL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, P7626) : el objetivo de las adición de los 3 compuestos es conseguir la medida de la concentración correcta de enzimas y proteínas intracelulares, permitiendo su salida del interior celular en el proceso del homogeneizado, y mantener su estructura, evitando la degradación proteica. Con esto, y utilizando un homogeneizador WiseTis® (Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Alemania) se procedió a obtener el homogeneizado, que se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 3,000 xg. Se alicuotó y congeló a -80°C hasta su utilización.



**Figura 14.** Protocolo para la obtención de homogeneizados de las muestras de tejido hepático

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de proteínas de nuestra muestra de tejido hepático se utilizó el método Bradford (382). Este método se basa en la formación de un complejo entre el reactivo azul de Coomassie y las proteínas que se encuentran en la disolución. La reacción se va a producir entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el colorante y los grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios en el pico máximo de absorbancia, que pasa de estar a 465 nm a 595 nm y que son directamente proporcionales a la concentración de proteína. Se realizó utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Madrid, España, B6916) y como estándar la albúmina bovina sérica (Sigma-Aldrich, Madrid, España, A7906), midiendo la absorbancia a 595 nm (Figura 15). Además, este método de análisis es compatible tanto con agentes

reductores como con bajas concentraciones de detergentes, al contrario que otros como el de Lowry y el del ácido bicinconínico.

Protocolo:

1. Preparar el estándar para realizar la curva patrón: para ello se utiliza albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL.
2. Para trabajar con las muestras de hígado es necesario realizar una segunda dilución 1/50 a partir de la que ya teníamos (1/7), para obtener una muestra final a 1/350. Esto es necesario porque la lectura debe estar comprendida entre los estándares inferior y superior de la curva estándar (0,1 y 1,4 mg/mL respectivamente)
3. Dispensar en la placa de 96 pocillos directamente los siguientes volúmenes:

*Tabla 1. Volúmenes utilizados en la recta patrón de determinación de proteínas por el método Bradford*

Concentración	Albúmina 1 mg/mL (μL)	Tampón PB 0,1M (μL)	Muestra tejido hepático dilución 1/350 (μL)
<b>0 mg/mL</b>	0	5	-
<b>0,2 mg/mL</b>	1	4	-
<b>0,4 mg/mL</b>	2	3	-
<b>0,6 mg/mL</b>	3	2	-
<b>0,8 mg/mL</b>	4	1	-
<b>1 mg/mL</b>	5	0	-
<b>Muestras</b>	-	-	5

*PB: Tampón fosfato*

4. Añadir 250 μL del reactivo Bradford en todos los pocillos (realizar todas las medidas por duplicado) y mezclar 30 segundos.
5. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.
6. Leer a 595 nm.

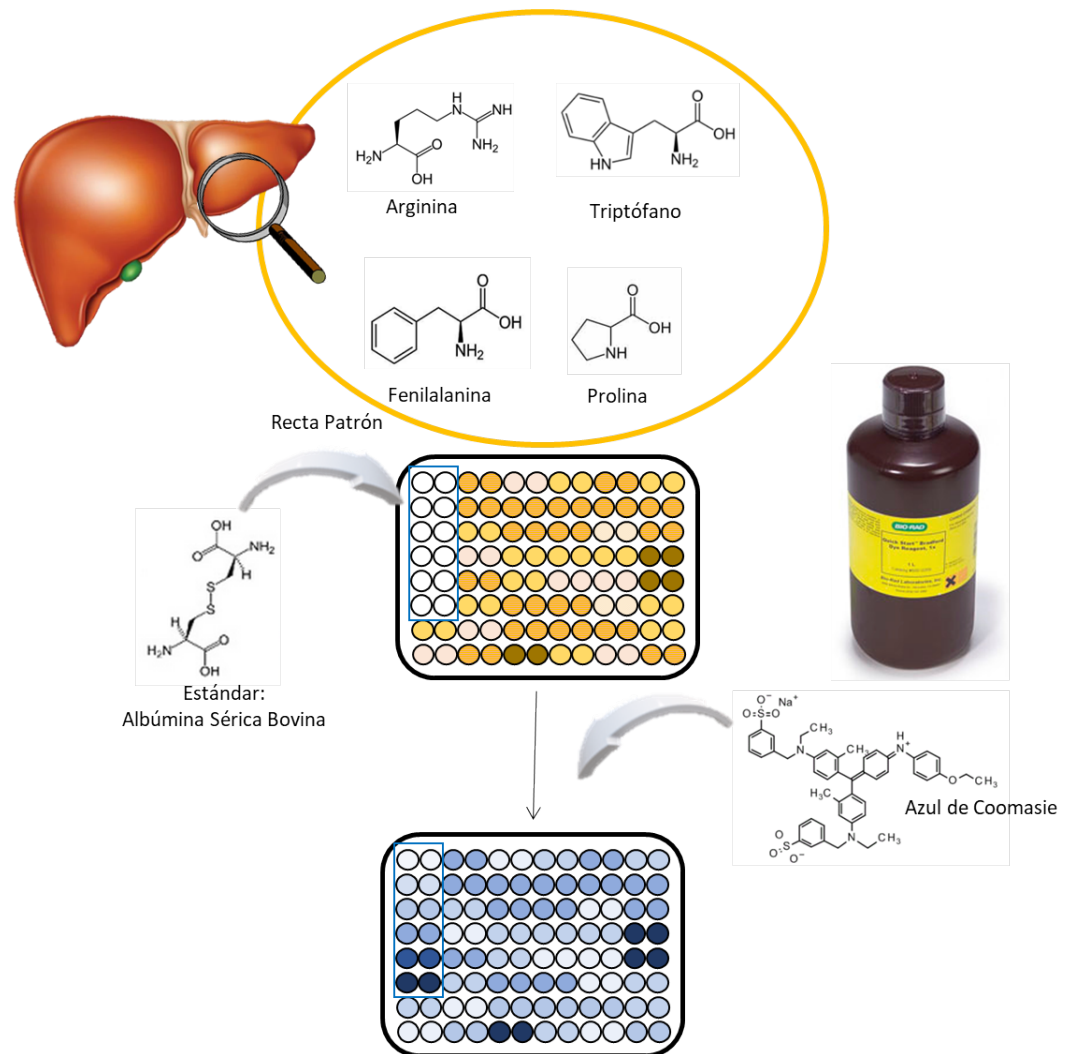


Figura 15. Protocolo del método Bradford para la cuantificación de proteínas

## DAÑO OXIDATIVO

### CUANTIFICACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (MDA +4-HDA)

La LPO es un proceso de oxidación que se produce sobre los lípidos de las membranas plasmáticas celulares y causa la muerte de las mismas por apoptosis. Los ácidos grasos más sensibles a este proceso son los poliinsaturados (PUFAs), debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura, que son atacados por RL como  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$ . Los productos finales de este proceso de LPO son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, sin embargo podemos considerar el MDA y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA) los productos mayoritarios de esta reacción. La determinación de la concentración de MDA + 4-HDA es un indicador del grado de

peroxidación de los lípidos de membranas biológicas, y por lo tanto del nivel de estrés oxidativo celular (383). Este análisis se llevó a cabo mediante un método colorimétrico basado en la reacción del N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA, en condiciones ácidas y a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA o 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable con un pico de máxima absorbancia a 586 nm (384) (Figura 17).

### Protocolo

1. Preparar la disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 108383) 10 mM en PB 0,1 M, a partir de la cual realizaremos la recta de calibrado a concentraciones conocidas (0-10  $\mu\text{M}$ ):

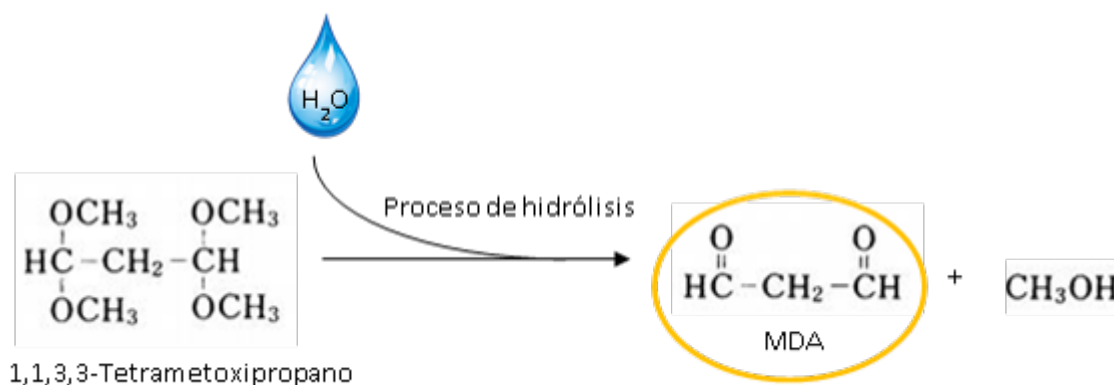
*Tabla 2. Volúmenes utilizados en la recta patrón para la determinación de lípidos peroxidados*

Concentración	TMP ( $\mu\text{L}$ )	PB 0,1M ( $\mu\text{L}$ )
<b>0 <math>\mu\text{M}</math></b>	-	200
<b>2 <math>\mu\text{M}</math></b>	20	180
<b>4 <math>\mu\text{M}</math></b>	40	160
<b>6 <math>\mu\text{M}</math></b>	60	140
<b>8 <math>\mu\text{M}</math></b>	80	120
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	100	100

*TMP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano; PB: Tampón fosfato*

Este compuesto, tras su hidrólisis, libera de forma estequiométrica una molécula de MDA (Figura 16).

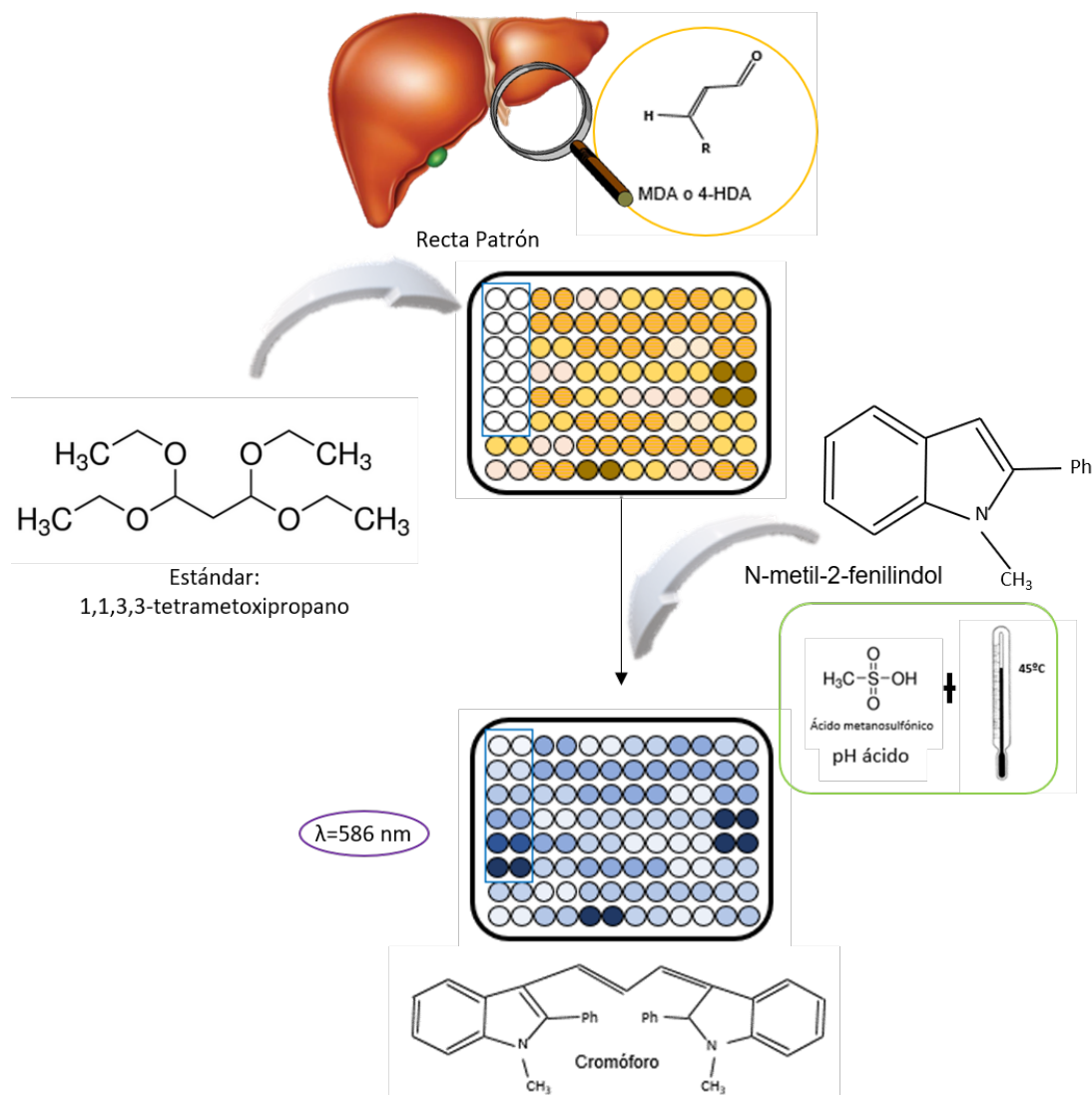




*Figura 16. Reacción de hidrólisis producida en la recta patrón para la cuantificación de lípidos peroxidados.  
MDA: Malonildialdehído*

2. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de muestra de tejido hepático a una dilución 1/7, o 200  $\mu\text{L}$  del estándar correspondiente a los tubos eppendorf (realizar duplicados tanto de las muestras como de los puntos de la curva estándar).
3. Administrar 650  $\mu\text{L}$  de R1/Metanol (N-metil-2-fenilindol (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 404888) y metanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 322415), en relación 1:3 (v/v)) y agitar.
4. Dispensar 150  $\mu\text{L}$  de ácido metanosulfónico 15,4M (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 471356). Agitar
5. Incubar durante 40 minutos a 45°C.
6. Centrifugar a 3.000xg durante 10 minutos, a 4°C.
7. Leer la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.

Las concentraciones de MDA + 4-HDA se corrigieron por las concentraciones de proteínas, expresando las concentraciones finales en nmol MDA + 4-HDA/mg proteína.



**Figura 17.** Protocolo de medida de los niveles de peroxidación lipídica (LPO).  
MDA: Malonildialdehído; 4-HDA: 4-hidroxiálquenos

## CUANTIFICACIÓN DE RESTOS CARBONILO

Las EROs son capaces de interactuar con las biomoléculas celulares causando daños en las mismas. En el caso de las proteínas, el resultado de su oxidación por acción de los RL es la formación de grupos carbonilos estables, siendo su valoración un método de medida para analizar el estrés oxidativo del organismo. El compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, D199303) es capaz de formar aductos dinitrofenil hidrazona estables, cuyos niveles serán equivalentes a la cantidad de residuos carbonilos de la muestra, y se pueden leer espectrofotométricamente a 375 nm (luz UV) (Figura 18). Para este proceso también

es necesario el ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, T4885), que nos permitirá precipitar las proteínas de la muestra en los primeros pasos de la técnica. Los lavados tras las centrifugaciones de las muestras son necesarios para la eliminación del DNPH que no ha reaccionado con los restos carbonilos, y la guanidina se utiliza para re-disolver el pellet de proteínas en el último paso y así poder medir los restos carbonilos por espectrometría.

### Protocolo

1. Disponer de 1 mL de las muestras de tejido hepático a la dilución 1/7, previamente obtenida y añadirles 100  $\mu$ L de tampón fosfato 20 mM y 200  $\mu$ L de una disolución de DNPH 10 mM en HCl (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 84415) 2N.
2. Agitar e incubar durante 1 hora a 37°C.
3. Añadir 325  $\mu$ L de TCA al 50% frío a las muestras e incubar 10 minutos en hielo.
4. Tras la incubación, centrifugar a 3.000 xg durante 10 minutos, a 4°C.
5. Retirar el sobrenadante, y lavar el precipitado 3 veces con 1mL de una solución de etanol (MerckMillipore, Madrid, España, 1009831000):acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 27227), 1:1 (v:v), resuspendiendo el pellet y centrifugándolo a 11.000 xg durante 3 minutos, a 4°C
6. Disolver el precipitado final con 700  $\mu$ L de una solución de guanidina-HCl (Sigma-Aldrich, Madrid, España, G4505) 6M, pH=2.
7. Agitar e incubar durante 15 minutos a 37°C.
8. Centrifugar a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C.
9. Dispensar en una placa de 96 pocillos especial para leer con luz UV 200  $\mu$ L del sobrenadante obtenido, por duplicado, y medir la absorbancia a 375 nm.
10. Realizar el blanco con la solución de guanidina 6M.

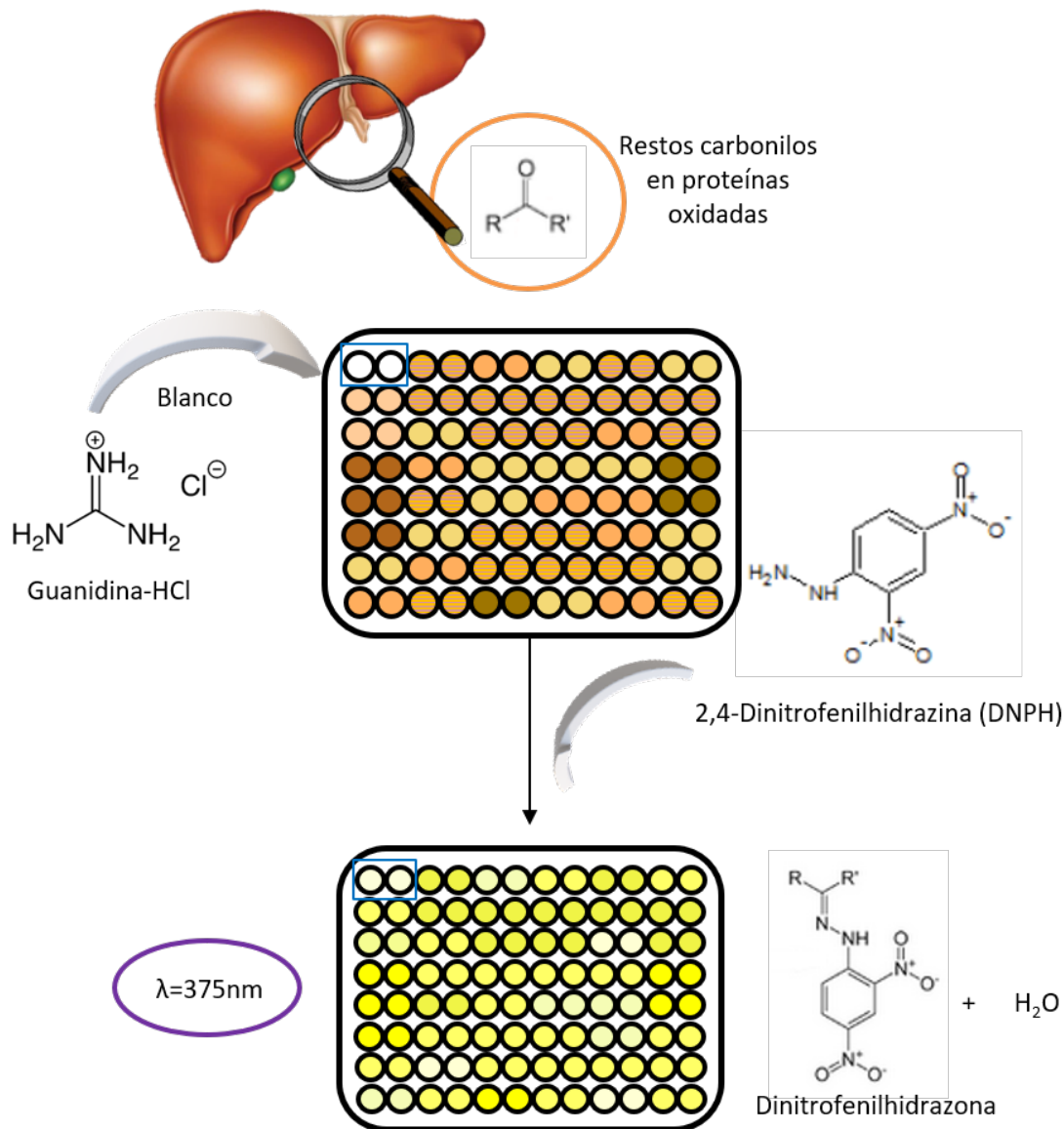


Figura 18. Protocolo de cuantificación de restos carbonilos.

## CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS

El NO es una molécula que participa en multitud de procesos biológico, pero que, sin embargo, también presenta reactividad para interactuar con macromoléculas biológicas, ejerciendo papel de RL. Uno de los métodos más fiables de medir su concentración en muestras biológicas, es la determinación de los niveles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> presentes en las mismas (385). El reactivo de Griess es capaz de interactuar con los nitritos en una reacción de diazotación de la sulfanilamida con ácido nitroso, tras lo cual los nitritos formarán una sal de diazonio, desarrollándose un color rosado cuya

intensidad será mayor cuanto mayor sea la concentración de nitritos en la muestra (386) (Figura 19).

### Protocolo

1. Preparar en primer lugar el estándar de nitritos con nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, M6250) 100  $\mu\text{M}$ , con el cual se obtendrá la recta patrón a concentraciones conocidas (0-30 nmol/mL) sobre la cual interpolar los resultados de las muestras problema.
2. Disponer 100  $\mu\text{L}$  de la muestra a una dilución final 1/42, realizando una dilución intermedia 1/7 sobre los homogeneizados previamente obtenidos, sobre la placa de 96 pocillos. Para la recta patrón disponer otros 100  $\mu\text{L}$  finales del estándar. Trabajar siempre por duplicado.
3. Añadir 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 03553).
4. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Medir los valores de absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro.

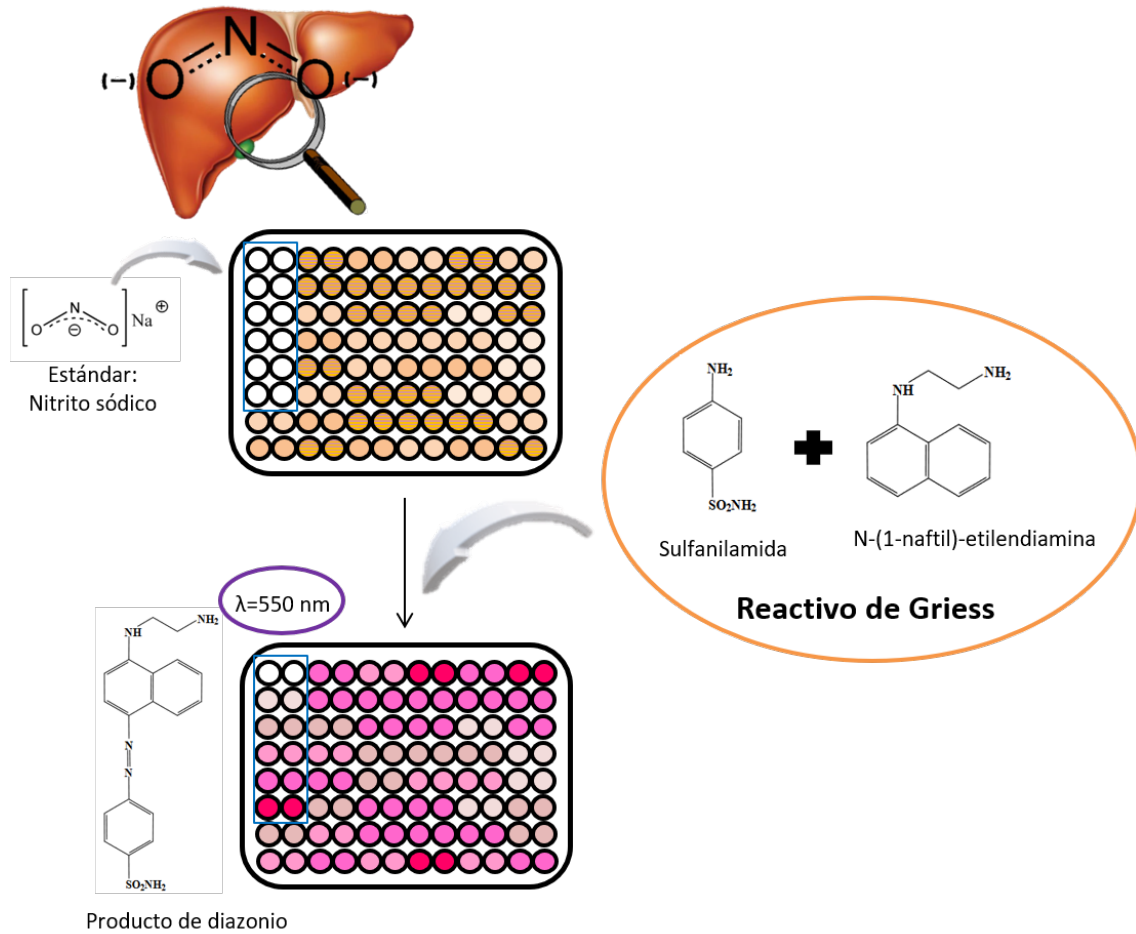


Figura 19. Protocolo de análisis de daño nitrosativo, mediante la cuantificación de los niveles de nitritos.

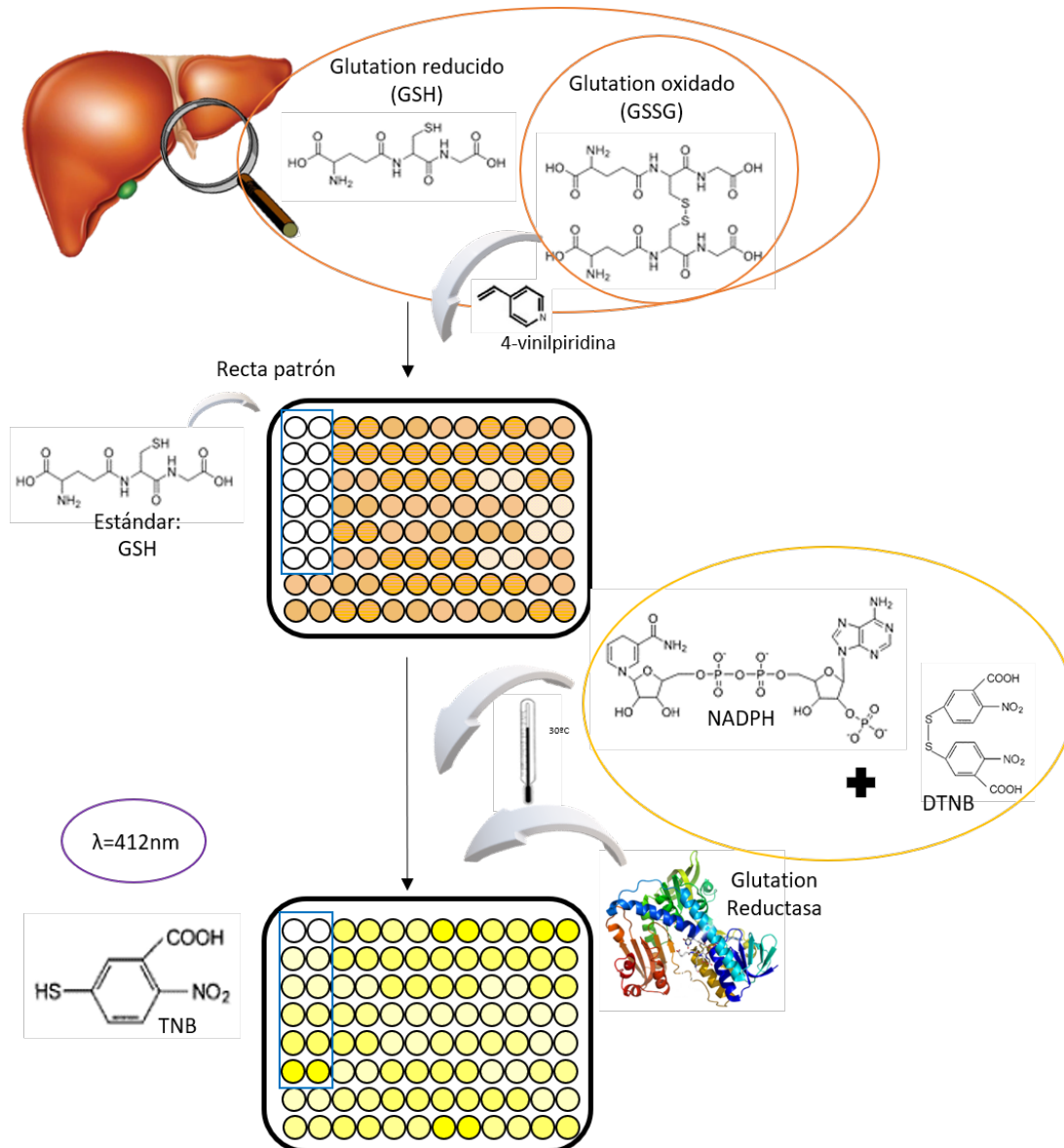
## DETERMINACIÓN DEL RATIO GSH/GSSG

El ratio GSH/GSSG es un parámetro cada vez más utilizado como indicador del estado oxidativo de las células del organismo. Se ha determinado que podemos encontrarlo en una ratio que oscila entre 10 y 300, siendo superior a 100 en condiciones de estabilidad para la célula, pero pudiendo disminuir hasta 10 o incluso menos, al estar bajo condiciones de estrés oxidativo. El GSH es una molécula indispensable para un correcto proceso de proliferación celular: cuando esta ratio desciende, se inducen procesos pro-apoptóticos, como la inhibición de proteínas antiapoptóticas y la estimulación de vías pro-apoptóticas, como por ejemplo, la de las caspasas; cuando la ratio presenta niveles mayores, se estimulan procesos para

prevenir la apoptosis de la célula. Hay muchos estudios clínicos que demuestran que sujetos afectados de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson... presentan un descenso en los niveles de GSH, promoviendo de esta forma la muerte neuronal, y por lo tanto la progresión de la enfermedad (387). El reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico, DTNB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, D8130) es un compuesto capaz de interactuar con el GSH, oxidándose y formando un compuesto amarillo (5-tio-2-ácido nitrobenzoico, TNB) que puede ser medido espectrofotométricamente a 412 nm. La molécula de GSSG formada puede ser revertida a GSH gracias a la acción de la enzima GR y el cofactor NADPH. Los niveles de GSSG son muy inferiores respecto a la molécula anterior, por lo que para su correcta medida es necesaria la adición a la muestra de 4-vinilpiridina (Alfa Aesar Thermo Fisher Scientific, Madrid, España, L13316AC), un agente bloqueante de los grupos tiol que impedirá la reacción del GSH presente en la muestra (Figura 20).

1. Preparar 3 disoluciones de trabajo a partir de una solución tampón 125 mM  $\text{NaHPO}_4$  6,3 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Madrid, España, ED-100G): la disolución (I) contiene una concentración de NADPH (Sigma-Aldrich, Madrid, España, N6505) 0,3 mM; la solución (II) 6 mM de DTNB y la solución (III) 50 unidades/mL de la enzima GR (Sigma-Aldrich, Madrid, España, G3664).
2. Preparar diferentes concentraciones de GSH (Sigma-Aldrich, Madrid, España, G4251) para realizar la recta patrón: 0,02-0,02.
3. Añadir a un tubo eppendorf 700  $\mu\text{L}$  de la solución (I), 100  $\mu\text{L}$  de la solución (II) y 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada (en el caso del blanco), o del estándar o muestra problema. La muestra requiere de una dilución 1/20 sobre la ya existente (1/7), obteniéndose una dilución final 1/140.
4. Mezclar bien con un vortex e incubar durante 2 minutos a 30°C.
5. Dispensar en el mismo tubo 10  $\mu\text{L}$  de la solución (III) y agitar.
6. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla (por duplicado) a una placa de 96 pocillos y leer durante 5 minutos a 412 nm cada 30 segundos.

7. Calcular la variación de absorbancia por minuto ( $\Delta\text{Abs}_{412}/\text{minuto}$ ) y obtener la concentración de GSH de la muestra utilizando la recta patrón.
8. Para calcular la concentración de GSSG se lleva a cabo el mismo protocolo, sin embargo la muestra ha sido previamente tratada con el compuesto 4-vinilpiridina: por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra, añadir 2  $\mu\text{L}$  del compuesto e incubar a 25°C durante 1 hora.



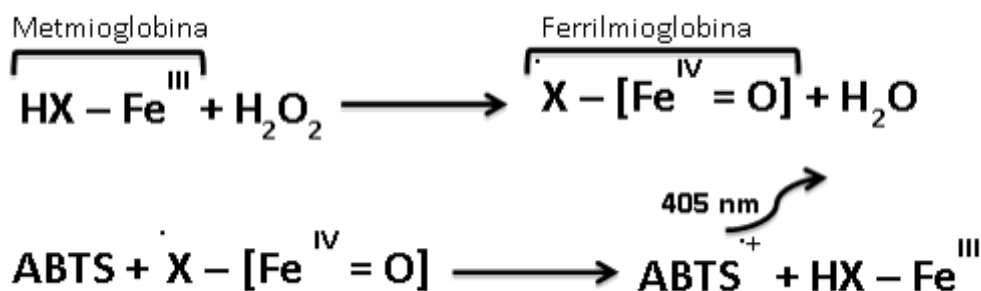
**Figura 20.** Protocolo para la determinación de la ratio entre glutation reducido (GSH) y glutation oxidado (GSSG). TNB: 5-tio-2-ácido nitrobenzoico; DTNB: 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico.



## DEFENSAS ANTIOXIDANTES

### CAPACIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE

La medición de la capacidad antioxidante nos proporciona información acerca de la capacidad global del organismo para contrarrestar la acción de las EROs, la resistencia al daño oxidativo y combatir las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Para la determinación de la capacidad antioxidante total se utilizó un método colorimétrico basado en la formación del radical ferrilmioglobina por la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich, Madrid, España, H1009) con metmioglobina, que oxida el ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, A1888) formando un radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , cromógeno soluble de color verde, con un pico de máxima absorción a 405 nm (Figura 21). La presencia de antioxidantes en la muestra suprime la formación del radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  en una relación dependiente de la concentración. La intensidad del color verde obtenida tras la reacción será inversamente proporcional a la concentración de sustancias antioxidantes.

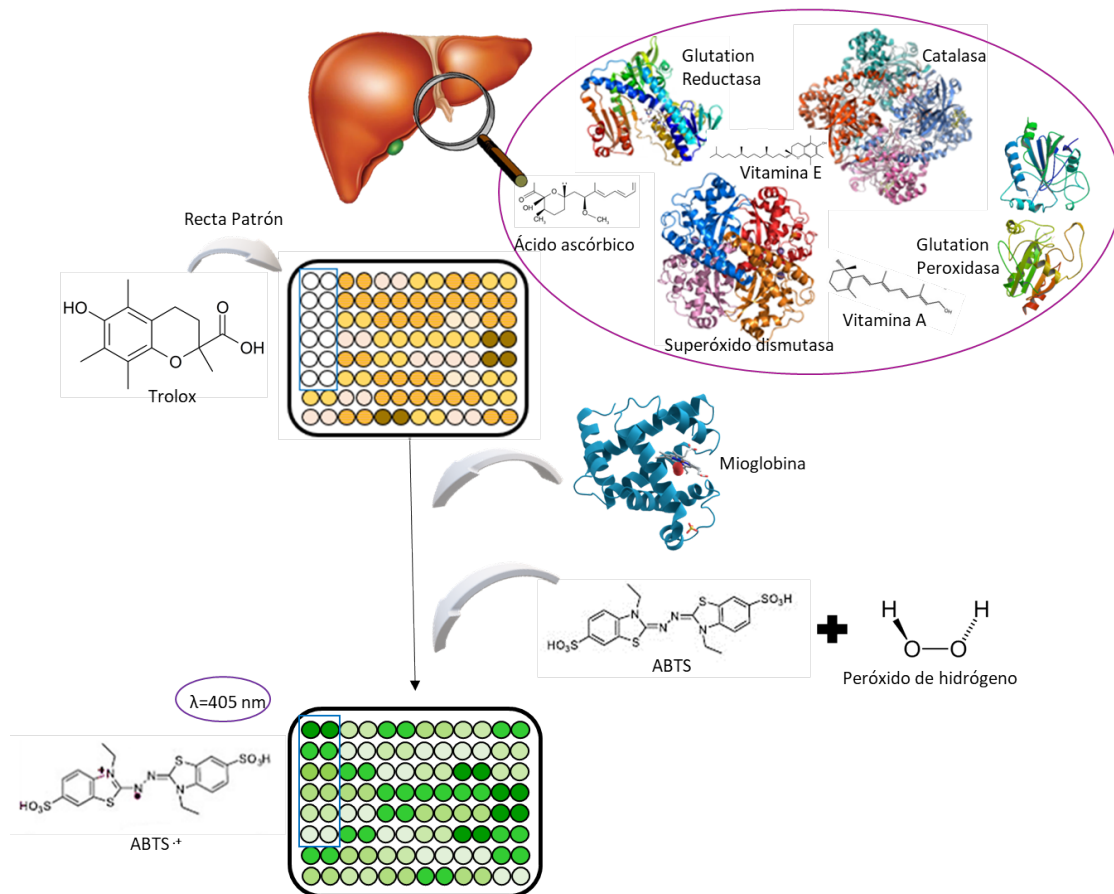


**Figura 21.** Reacción producida en nuestro protocolo de análisis de la capacidad total antioxidante. ABTS: 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico].

Se utiliza el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 238813), compuesto análogo de la vitamina E (o  $\alpha$ -tocoferol), a concentraciones conocidas (0-0,42 mM), para realizar una curva de calibrado. La capacidad total antioxidante se expresó como mmoles equivalentes de Trolox por litro (Figura 22).

## Protocolo

1. Realizar una dilución 1/200 de los homogeneizados hepáticos previos, obteniendo una dilución final 1/1400 de la muestra.
2. Disponer en la microplaca 10  $\mu\text{L}$  tanto de los distintos puntos del estándar como de las muestras. Trabajar con duplicados.
3. Añadir 20  $\mu\text{L}$  de mioglobina (Sigma-Aldrich, Madrid, España, M1882) a todos los pocillos.
4. Justo antes de comenzar las lecturas, añadir 150  $\mu\text{L}$  de una disolución ABTS:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
5. Incubar la placa durante 45 minutos, realizando medidas de absorbancia a 405 nm cada 5 minutos.
6. Para realizar el blanco sustituir todos los compuestos, excepto la mioglobina por PB 5 mM pH=7,4; para el control positivo en cambio, sustituir los 10  $\mu\text{L}$  de muestra o Trolox por este mismo tampón.



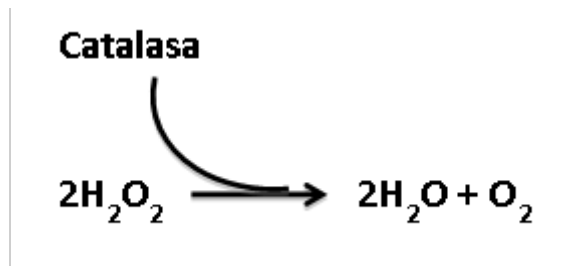
**Figura 22.** Protocolo de medida de la capacidad total antioxidante. ABTS: 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico].

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA

La catalasa (E.C. 1.11.1.6; CAT) es un conjunto de hemoproteínas tetraméricas que catalizan la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (ver Figura 23). Se localiza principalmente en los peroxisomas de las células, donde será la responsable de disminuir los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , originados por las enzimas oxidasas que se encuentran en estos mismos orgánulos. Su acumulación en las células produce la oxidación de componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos, lo cual puede desembocar en mutagénesis y muerte celular. La eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la célula gracias a la CAT proporciona protección contra el daño oxidativo a la célula.

Nos basaremos en el método empleado por Aebi (388) en el cual se analiza la actividad enzimática de la CAT, mediante la medición de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$

durante 30 segundos\_(Figura 24). Esta curva cinética se realizará a 240 nm y, utilizando el coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $43,6\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , calcularemos las unidades de catalasa de la muestra hepática. La actividad enzimática se presenta en unidades internacionales por mg de proteína (U/mg proteína); cada unidad de actividad enzimática representa la descomposición de  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

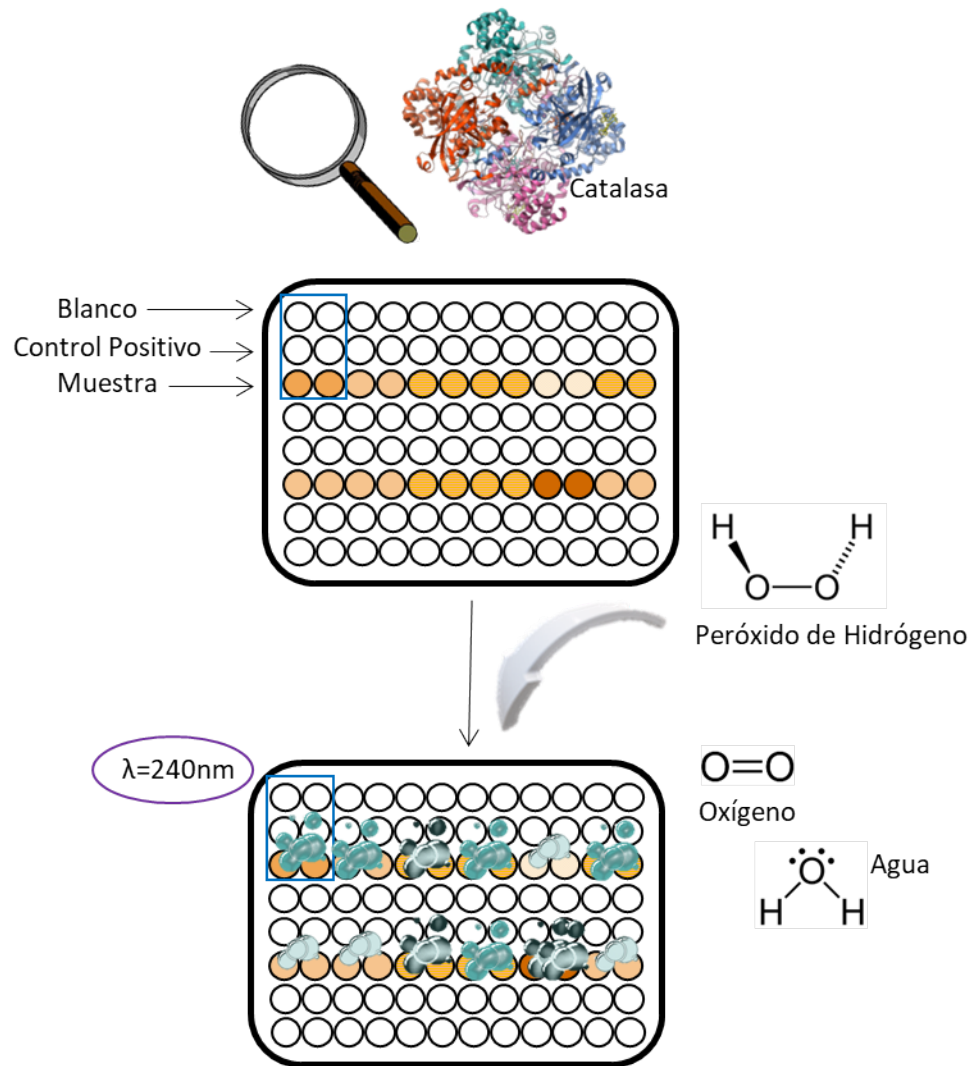


*Figura 23. Reacción catalizada por la enzima catalasa (CAT)*

### Protocolo

Trabajar directamente sobre una microplaca especial para leer en UV.

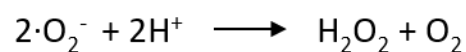
1. Es necesario realizar para cada muestra un blanco y un control positivo, a leer al mismo tiempo que la muestra.
2. Diluir los homogeneizados de hígado 1/6, obteniendo una dilución final del tejido 1/42.
3. Disponer en los pocillos correspondientes (medir por duplicado) tampón fosfato 62,5 mM, EDTA 1 mM pH 7 y agua miliQ, para el blanco; para el control positivo es necesario tampón y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentración 100 mM; para medir la actividad catalasa de la muestra añadir tampón, 2,5  $\mu\text{L}$  de muestra y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentración 100 mM.
4. Agitar la placa durante 3 segundos y leer en el espectrofotómetro a 240 nm, a  $25^\circ\text{C}$ , durante 30 segundos, realizando medidas cada 8 segundos.



**Figura 24.** Protocolo para la determinación de la actividad catalasa presente en las muestras.

## DETERMINACIÓN ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

La SOD (EC. 1.15.1.1; SOD) es una enzima que cataliza la reacción de dismutación de los radicales  $\text{O}_2^{\cdot -}$  mediante su transformación en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , protegiendo a la célula de los daños ocasionados por las EROs:



Se conocen tres isoenzimas con distintos metales en sus centros activos y diferente localización: Cu-Zn-SOD (citosol y espacio extracelular), Mn-SOD (mitocondrias) y Fe-SOD (citosol) (389, 390).

Aunque la mayoría de los métodos de análisis de las actividades enzimáticas se basan en la desaparición de un sustrato o en la aparición de un producto, en el caso de la SOD no se siguen los mismos criterios, dado que el sustrato de esta reacción, el radical  $O_2^-$  es muy inestable. En el presente trabajo hemos usado el protocolo desarrollado por Flohe y cols. en 1984 (391) basado en la inhibición de la reducción del citocromo  $c^{3+}$  producida por el radical  $O_2^-$ , por medio de la intervención de la SOD catalizando la reacción previamente señalada. Como generador constante de radicales  $O_2^-$  se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa. La velocidad de reducción del citocromo c se sigue espectrofotométricamente a 550 nm (Figura 25).

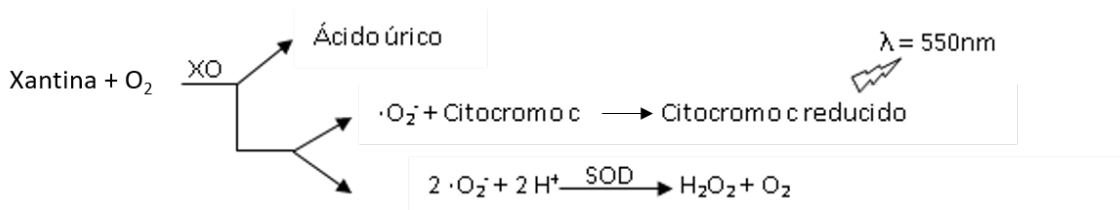


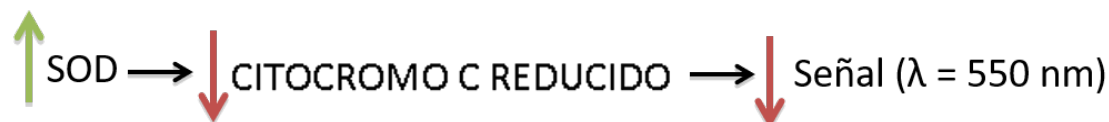
Figura 25. Sistema bioquímico de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Por una parte, la XO puede transformar la xantina, su sustrato, y el  $O_2$  en ácido úrico. Por otra parte, cuando por estrés oxidativo se producen RL de oxígeno ( $\cdot O_2^-$ ), la XO los utiliza junto con sus sustratos para reducir al citocromo c, el cual tiene una absorbancia máxima de 550 nm. Ante un estado de estrés oxidativo la célula pone en marcha mecanismos antioxidantes, como la SOD, que desvía la reacción de reducción del citocromo c cogiendo los RL y transformándolos en  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Figura 25).

Se define la unidad de la actividad SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción de la citocromo  $c^{3+}$ .

El protocolo está dividido en dos partes. Primero se determina la actividad química del sistema para transformar el  $O_2^-$  y obtener citocromo c reducido (midiendo el control + y su referencia (Control -)). Tras esto se determina la transformación del

citado sustrato, pero en presencia de muestra (midiendo la muestra y su referencia) (Figura 27). Así, debido a la existencia de SOD en la muestra parte del  $O_2^-$  pasara a  $H_2O_2$  y se habrá reducido menos citocromo c. La actividad de la SOD vendrá reflejada por la diferencia entre ambas mediciones.



*Figura 26. Estequema de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD)*

La señal obtenida a 550 nm será inversamente proporcional a la cantidad de SOD que tengamos en la muestra (Figura 26).

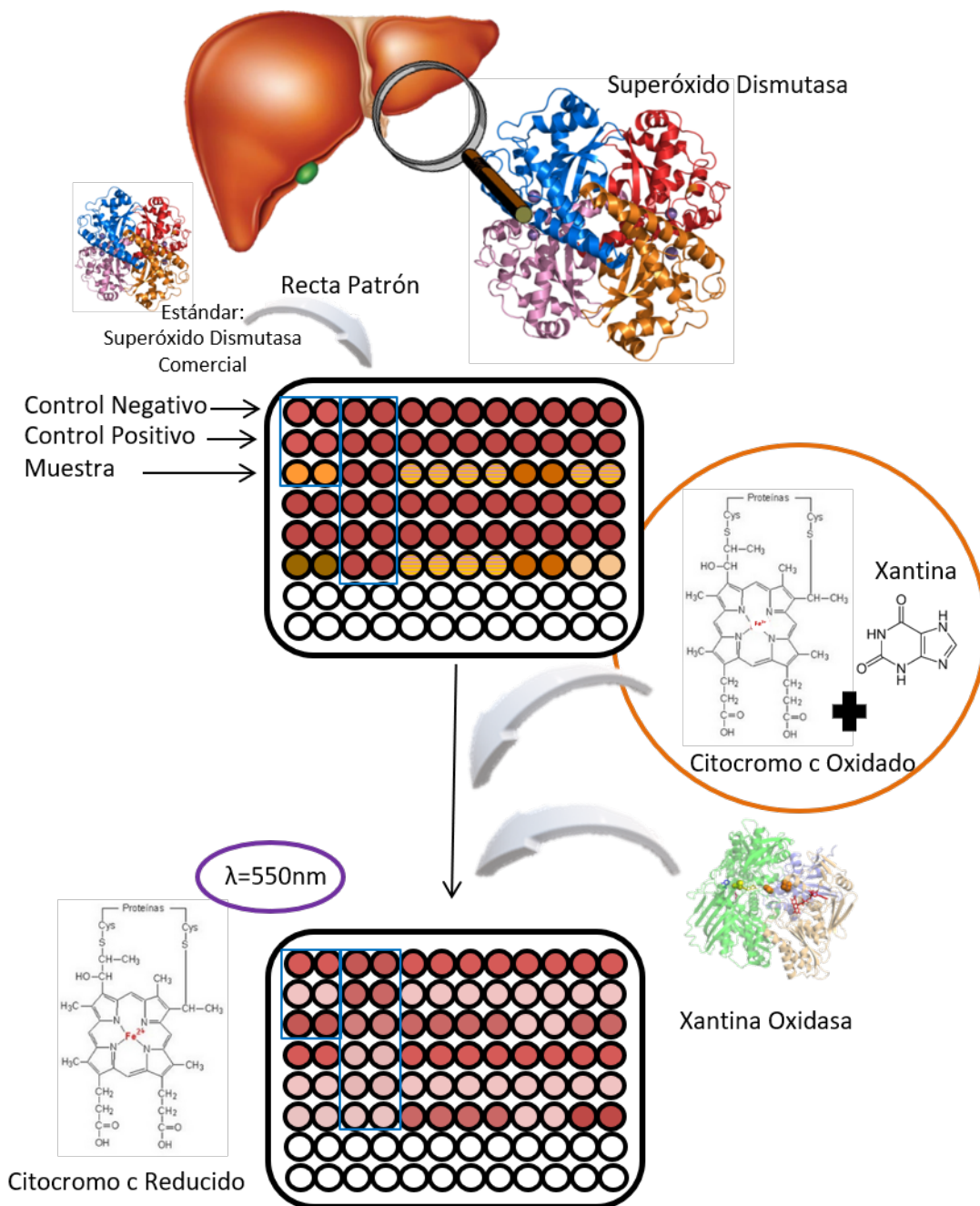
### Protocolo

1. Preparar el control negativo sin muestra ni XO (Sigma-Aldrich, Madrid, España, X4500), añadiendo únicamente agua destilada, PB 57,97 mM con EDTA 1 mM, xantina (Sigma-Aldrich, Madrid, España, X7375) 1,06 mM y citocromo c 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España, C2506).
2. Para realizar la recta patrón utilizar disoluciones de concentraciones conocidas (0,6-1,5 U/ $\mu$ L) de SOD comercial (Sigma-Aldrich, Madrid, España, S9697).
3. Realizar diluciones 1/40 a partir del homogeneizado de hígado a dilución 1/7, obteniendo una muestra final a 1/280.
4. Añadir a las muestras hepáticas o a los distintos puntos de la recta estándar con SOD comercial: agua destilada, PB 57,97 mM EDTA 1 mM, xantina 1,06 mM y citocromo c 10 mg/mL. Por cada muestra se preparará una referencia que tendrá todos los reactivos, excepto la enzima XO.
5. Incubar 5 minutos en hielo.
6. Añadir XO 0,00294 U/10  $\mu$ L si procede (excepto en el control negativo y en las referencias de las muestras/puntos de la curva patrón). La cantidad está

ajustada para obtener una pendiente de  $0,025 \pm 0,001$  unidades de absorbancia por minuto frente al blanco a 550 nm.

7. Mezclar y medir durante 2 minutos la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro termostatzado a 25°C.
8. La actividad de SOD en cada muestra se calcula por la diferencia con su referencia y la interpolación con la curva patrón de disoluciones de SOD comercial de actividad conocida.
9. Se debe tener en cuenta que la linealidad de la determinación se mantiene entre el 40% y 60% de inhibición, lo cual corresponde a pendientes comprendidas entre 0,01 y 0,015 unidades de absorbancia por minuto.





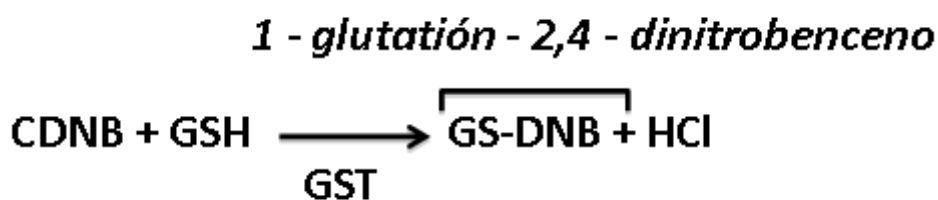
**Figura 27.** Protocolo de cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

## DETERMINACIÓN ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Las GST (EC 2.5.1.18) son un grupo de enzimas importantes en el proceso de detoxificación de numerosos xenobióticos. Estas enzimas protegen a las células de los tóxicos mediante la conjugación del grupo tiol del glutatión a los xenobióticos

electrofílicos, y además las defienden contra los efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos que presentan estos compuestos.

En este protocolo hemos utilizado como sustrato el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España, 237329), el cual es reconocido por un amplio espectro de isoenzimas de GST. La enzima cataliza la conjugación del L-glutatiión con el CDBN, a través del grupo tiol, formando un compuesto GS-DNB que absorbe a 340 nm (Figura 28).



**Figura 28.** Reacción catalizada por la enzima Glutatiión S-transferasa (GST) en nuestro protocolo de medida.

El incremento de absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la GST que encontramos en la muestra (Figura 29).

### Protocolo

- Preparar los dos sustratos de la reacción, el GSH 200 mM, y CDBN 100 mM el día de su utilización.
- Para evitar reacciones entre los dos compuestos previas a la medición de absorbancia, es necesario preparar la mezcla de ambos en un tubo eppendorf, a partir del cual tomaremos la cantidad necesaria para la reacción.
- Preparar las muestras problema a una dilución 1/10 respecto a las que ya teníamos, obteniendo como dilución final 1/70. Esto nos permitirá obtener valores de absorbancia que entrarán en los rangos lineales de la misma.
- Trabajar directamente sobre una placa de 96 pocillos de luz UV, siempre realizando medidas por duplicado. Para cada muestra es necesaria la realización de un blanco, que dispondrá de la mezcla de GSH y CDBN; el pocillo



medida de la dispersión. Por ello, los resultados son expresados siempre como media aritmética  $\pm$  error estándar.

En cada grupo de estudio se comprobó la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de Shapiro-Wilk. El valor de significación estadística se estableció en  $p \leq 0,05$ .

---

## **INFERENCIA ESTADÍSTICA**

Para estudiar las diferencias entre los distintos grupos, se realizó el test, no paramétrico, de Kruskal-Wallis. Cuando la diferencia entre grupos fue significativa, se aplicó el test de la U de Mann-Whitney con un nivel de significación aceptado en  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS



Dividiremos los resultados obtenidos en dos partes:

- En primer lugar, analizaremos toda la información relativa a las pruebas de función visual: los resultados conseguidos en los 8 grupos de investigación referentes tanto a la AV y SC, mediante el test optomotor, y la respuesta ERG a P180 de tratamiento. Igualmente analizaremos los resultados de la telemetría para valorar las funciones no visuales de la retina.
- En segundo lugar se comentarán los datos obtenidos en el estudio de los diferentes parámetros bioquímicos del tejido hepático de los distintos animales, referentes tanto al daño oxidativo producido como a los sistemas de defensa antioxidante.

El proyecto está planteado para analizar tanto la degeneración en la función visual, como en las funciones retinianas no visuales, como el daño oxidativo del modelo animal de RP, la rata P23H heterocigota pigmentada de la línea 1. El estudio se inició tras el destete de los animales a P21, tras lo cual, para valorar el estado funcional y previo al inicio de cualquier tratamiento, se estudiaron los valores de AV y SC de todos los animales, con el fin de obtener grupos homogéneos y asegurarnos de que no existían diferencias al inicio entre animales y que las modificaciones obtenidas a lo largo de los meses se debiesen, única y exclusivamente, a los tratamientos aplicados y no a variaciones interindividuales surgidas al inicio. Como grupo de referencia se trabajó con animales SDxLE. Debido a que los tiempos de administración de los diferentes tratamientos son relativamente largos, se crearon también 3 grupos de ratas sanas a las cuales se les aplicaron las mismas sustancias antioxidantes que a las ratas P23HxLE, con el fin de asegurar su seguridad como complemento en individuos sanos.

Se establecieron, por lo tanto, 8 grupos de tratamiento, 4 correspondientes con el modelo animal de la RP y otros 4 con los animales de referencia, cada uno de ellos compuesto por 5 animales y que se trataron con melatonina, con EGCG, o con una combinación de los dos a la misma concentración y un grupo al cual no se le administró ningún tratamiento, es decir, grupo vehículo, grupo MT, grupo EGCG y grupo MT+EGCG. La primera medida funcional se realizó a P30 en vez de P21, para

asegurarnos el aprendizaje de los animales al sistema optomotor y poder efectuar las demás medidas de la mejor forma posible. Posteriormente, se llevaron a cabo medidas de AV y SC a P60, P90, P120 y P180. Tras esto se realizó un ERG tipo Ganzfeld para todos los grupos de animales a P180.

Tras el sacrificio, se extrajo el hígado para realizar las posteriores determinaciones bioquímicas. También se recogieron como muestras los ojos de los animales para analizarlos por inmunohistoquímica; sin embargo, por problemas en los sistemas de congelación, se malograron las muestras, no pudiendo mostrar esos datos. No repetimos nuevamente los experimentos para evitar aumentar el número de animales sacrificados.

## PARÁMETROS DE FUNCIÓN VISUAL

### AGUDEZA VISUAL

La valoración de las funciones visuales de los animales se realizó con el test optomotor determinando la AV de ambos ojos en sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario y reflejando el promedio de ambas mediciones. La Figura 30 representa los valores de resolución espacial obtenidos con el test optomotor en promedio de ambos sentidos expresada en ciclos/° frente a la edad de los animales expresada en días. Se realizaron dos comparativas: en primer lugar analizamos el efecto que tuvieron los antioxidantes MT y EGCG administrados de forma individual y combinada sobre las ratas sanas SDxLE y en segundo lugar los cambios que se producen en las ratas P23HxLE cuando son tratadas con estos mismos antioxidantes, comparando los valores obtenidos con el grupo sin tratar. Para facilitar la observación de los resultados, cada gráfica se subdivide en dos: en la gráfica (A) se representan los 4 grupos de tratamiento, comparándose con el grupo de referencia SDxLE vehículo, mientras que en la gráfica (B) se encuentran los 4 grupos de ratas SDxLE tratadas igualmente con los tratamientos antioxidantes.



En el caso de los grupos de ratas sanas SDxLE (ver Figura 30.A), aquellas pertenecientes al grupo vehículo mostraron unos valores de AV al iniciar el tratamiento de  $0,5662 \pm 0,002$  ciclos/° (media  $\pm$  error estándar) y de  $0,5684 \pm 0,0007$  ciclos/° a P180. En las ratas sanas se observaron mejorías estadísticamente significativas en los 3 grupos de tratamiento a partir de P90. Los valores del grupo MT fueron de  $0,5654 \pm 0,005$  ciclos/° a P30 y a P180 de  $0,5928 \pm 0,002$  ciclos/°; en el grupo EGCG  $0,569 \pm 0,0072$  ciclos/° a P30 y  $0,6126 \pm 0,0041$  ciclos/° a P180 respectivamente, y finalmente en el grupo MT+EGCG los valores de AV obtenidos fueron de  $0,5698 \pm 0,006$  ciclos/° y de  $0,6102 \pm 0,006$  ciclos/° a P30 y P180.

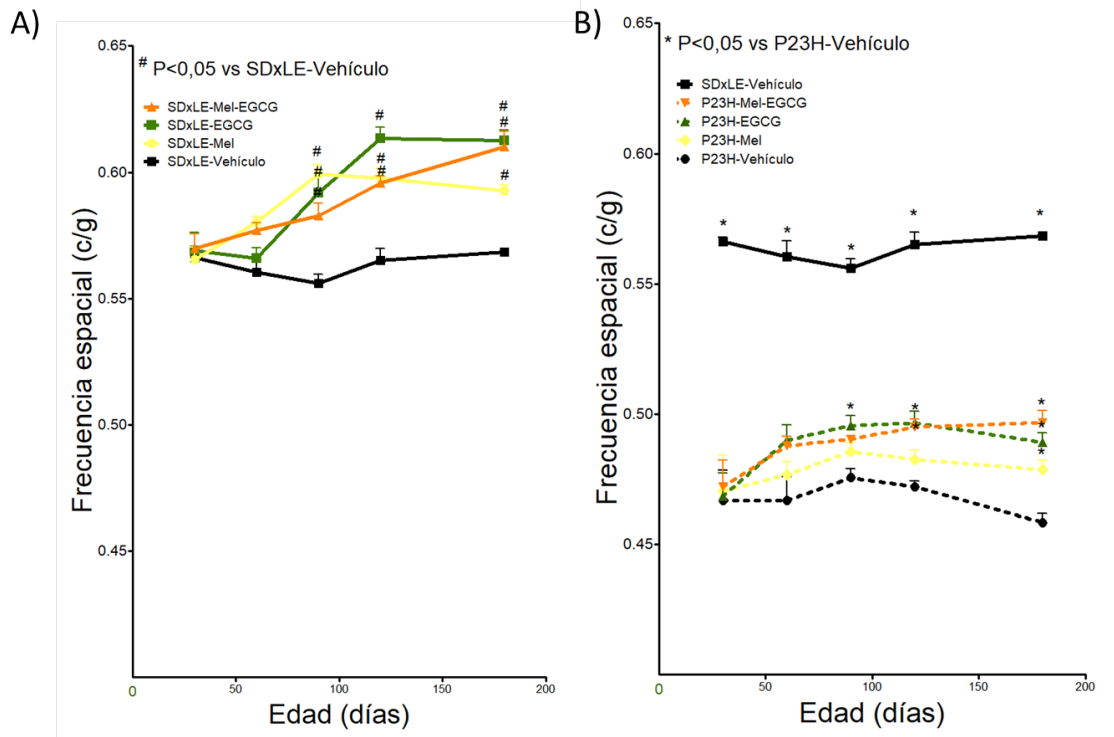
Podemos ver que cualquiera de las moléculas antioxidantes logró mejorías en la visión en los animales sanos, tras un tratamiento prolongado con ellos, alcanzando la mejor AV la rata sana tratada con el EGCG, discretamente superior al tratamiento con la asociación de ambas moléculas (MT+EGCG).

En los grupos de P23HxLE, a P30 existía una clara diferencia comparando el grupo vehículo de referencia con el modelo animal de RP, la rata P23H, obteniendo unos valores de  $0,5662 \pm 0,0018$  ciclos/° y  $0,4668 \pm 0,012$  ciclos/° respectivamente.

Podemos observar que todos los tratamientos administrados obtuvieron una mejoría en la AV comparando con el grupo no tratado o vehículo; los valores de mejoría fueron los siguientes: un 4,4% en el grupo MT, un 6,7% en el grupo EGCG y un 8,4% en el grupo MT+EGCG. Esto además, no sólo ocurre en el grupo de las ratas afectadas por la mutación, sino que, en el grupo SDxLE se ve también una mejoría de la AV con los tratamientos: esta mejoría es de un 4,3% en el grupo MT, un 7,8% en el grupo EGCG y finalmente una 7,4% en el grupo MT+EGCG (Figura 30.B).

El deterioro de la AV se ve claramente con la evolución: el grupo P23HxLE sin tratamiento antioxidante presentaba una AV de  $0,4668 \pm 0,012$  ciclos/° al inicio del estudio (P30) y de  $0,4584 \pm 0,0035$  ciclos/° a P180. Sin embargo, los grupos de P23H con tratamiento experimentaron mejorías: El grupo de P23HxLE tratadas con MT presentaron una AV a P30 de  $0,4704 \pm 0,014$  ciclos/° y  $0,4786 \pm 0,004$  ciclos/° a P180; en el grupo EGCG los valores fueron de  $0,4684 \pm 0,009$  ciclos/° a P30 y  $0,4892 \pm 0,004$  ciclos/° a P180 y el grupo MT+EGCG obtuvo valores de AV a P30 de  $0,4722 \pm 0,01$

ciclos/° y de  $0,4968 \pm 0,005$  ciclos/° a P180. Tanto en el grupo EGCG como en el grupo MT+EGCG se alcanzaron mejorías estadísticamente significativas respecto al grupo P23HxLE no tratado. Estas diferencias significativas comenzaron a observarse en ambos grupos a partir de P90.

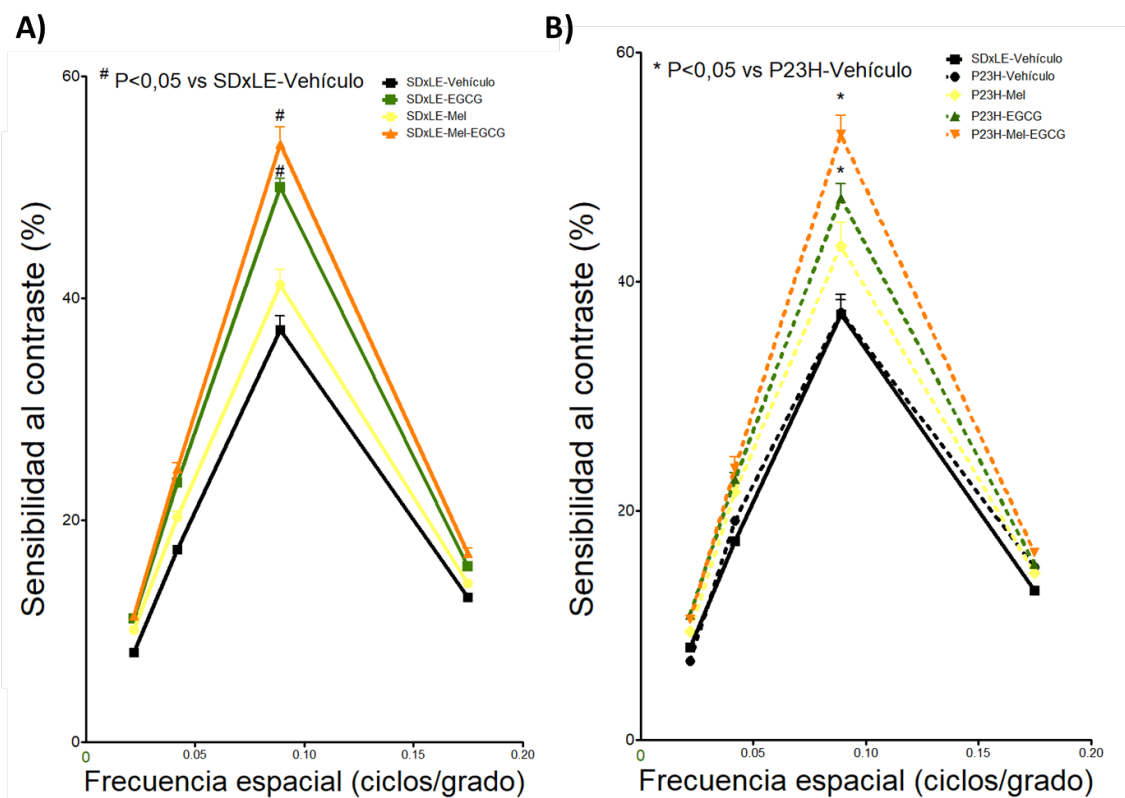


**Figura 30.** Valores de resolución espacial obtenidos mediante optomotor en promedio entre el sentido de las agujas del reloj y en contra de las agujas del reloj en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento y a distintas edades.

Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 en cada grupo).

## SENSIBILIDAD AL CONTRASTE

Utilizando el sistema optomotor obtuvimos de forma complementaria a la AV, la sensibilidad al contraste (SC). En la Figura 31 se muestran los valores a P180 de SC en porcentaje frente a la frecuencia espacial, obteniendo el pico de máxima sensibilidad a una frecuencia de  $0,089$  ciclos/°.

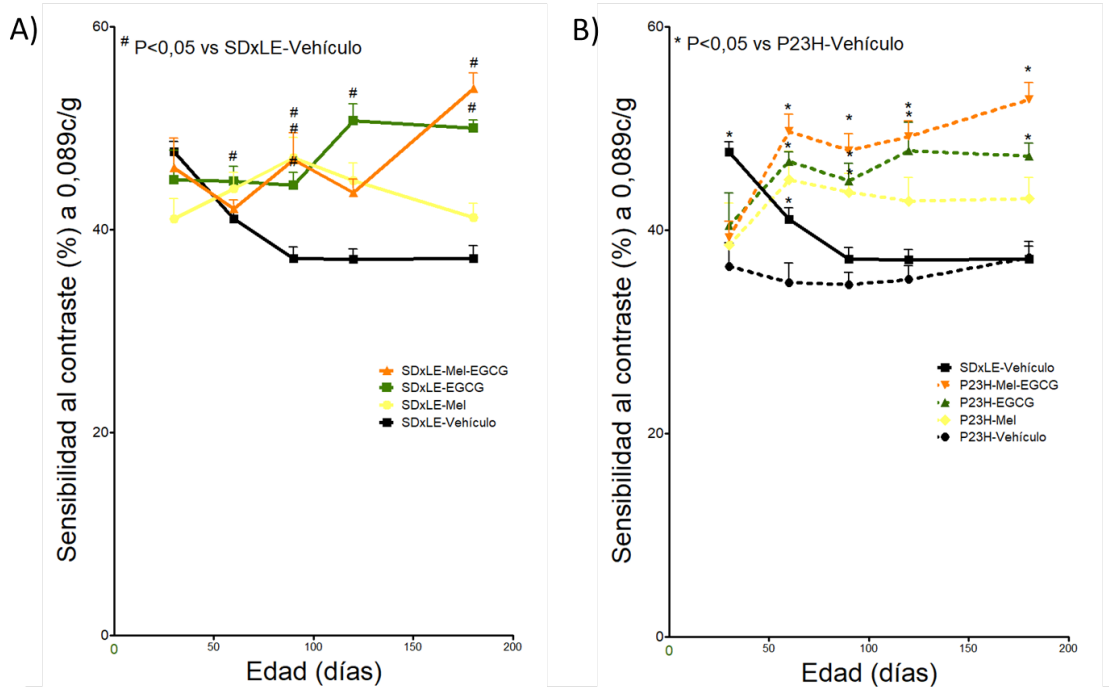


**Figura 31.** Sensibilidad al contraste obtenida por el aparato optomotor a distintas frecuencias espaciales (0,022, 0,042, 0,089 y 0,175 ciclos/°), a P180.

En el grupo de las ratas SDxLE y con la frecuencia espacial de 0,089 ciclos/° (ver Figura 32.A), los valores obtenidos con el tratamiento MT+EGCG y con EGCG a P180 fueron significativamente superiores a los del grupo SDxLE no tratado, con valores de  $53,93 \pm 1,51\%$  y  $50,05 \pm 0,79\%$ ; el grupo MT presentó una mejoría de un 10,8% respecto a las ratas sin tratar, con un valor de  $41,202 \pm 1,43\%$ . Al igual que ocurría en la AV, los tratamientos comenzaron a mostrar mejorías estadísticamente significativas a partir de P90: el valor de SC en el grupo vehículo fue de  $37,174 \pm 1,11\%$ , mientras que en el grupo MT era de  $47,08 \pm 2,02\%$ , en el grupo EGCG era de  $44,4 \pm 1,28\%$  y finalmente el grupo MT+EGCG alcanzaba unos valores de  $46,91 \pm 2,66\%$ . En resumen, la SC mejoró un 26,6% con la MT, un 19,4% con el EGCG y un 26,2% con el tratamiento combinado MT+EGCG. Esta mejoría se mantuvo hasta el final del tratamiento (P180) los grupos EGCG y MT+EGCG, alcanzándose valores un 34,6% y 45,01% superiores al grupo vehículo respectivamente. Sin embargo, en el grupo de MT, a partir de P90, los valores disminuyeron, acercándose a los obtenidos en el grupo vehículo.

A P30 los valores de SC obtenidos en el grupo SDxLE y P23HxLE sin tratamiento fueron de  $47,704 \pm 1,02\%$  y  $36,476 \pm 2,31\%$  respectivamente (Figura 32.B). Sin embargo, aunque los valores del grupo SDxLE vehículo a P180, sí presentaron una clara disminución en ambos grupos, no sucedió lo mismo en las ratas P23HxLE sin tratar, donde prácticamente se mantuvieron los valores de inicio, incrementándose ligeramente, existiendo una diferencia entre ellos de un 0,33%, la cual no era estadísticamente significativas. El grupo SDxLE presentaba un valor de  $37,188 \pm 1,22\%$  y el grupo P23HxLE de  $37,312 \pm 1,58\%$ .

El tratamiento que obtuvo una mayor mejoría en las ratas P23HxLE fue el de MT+EGCG, con un valor de  $52,86 \pm 1,70\%$ , lo que supuso un porcentaje de mejoría del 41,67% sobre el grupo vehículo. En el caso del grupo EGCG, los valores a P180 fueron de  $47,31 \pm 1,27\%$ , siendo esta diferencia respecto al grupo de ratas P23HxLE vehículo, estadísticamente significativa. El grupo MT presentó unos valores de SC de  $43,116 \pm 2,08\%$ , superior al del grupo vehículo en un 15,6%, pero sin que la diferencia entre ellos alcanzara significación estadística.



**Figura 32.** Valores de sensibilidad al contraste a una frecuencia espacial de 0,089 c/g obtenidos mediante Optomotor en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento y a distintas edades. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo)

## ELECTRORRETINOGRAFÍA

Se registraron las ondas del ERG en condiciones escotópicas a diferentes intensidades ascendentes del estímulo comprendidas entre  $-3,7$  y  $2,85 \text{ cd's/m}^2$ , mostrándose las oscilaciones sobre la línea base, la onda a y la onda b.

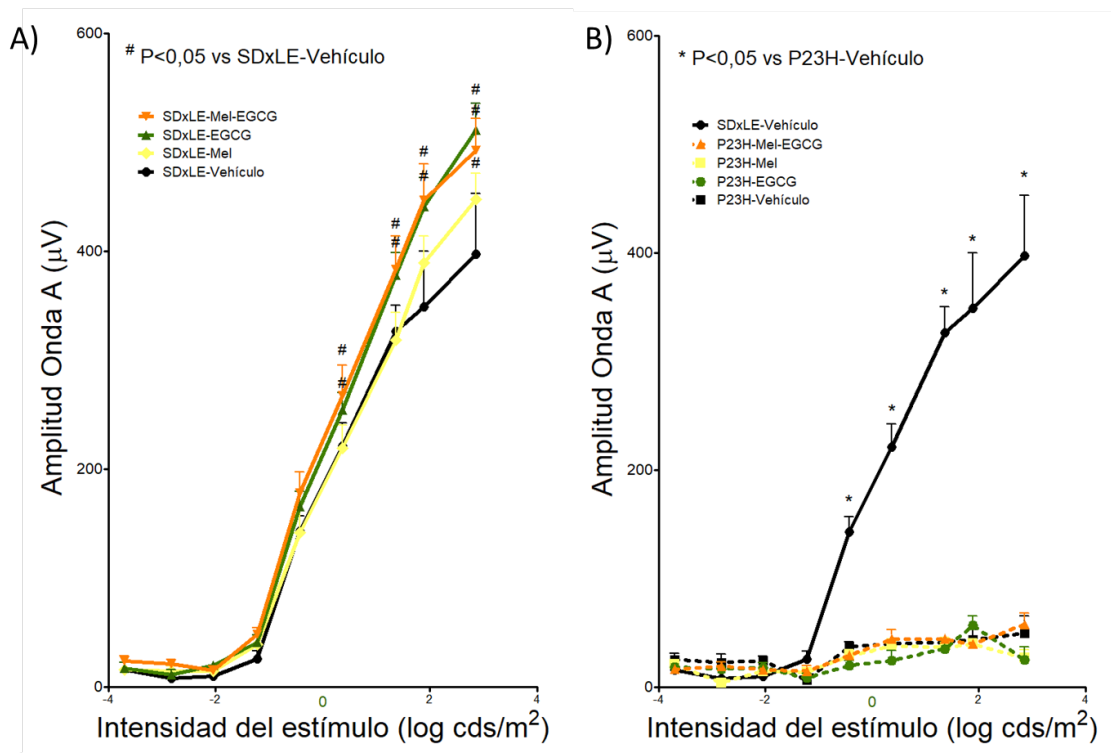
### AMPLITUD DE LA ONDA A

La amplitud de la onda a presenta valores negativos y nos aporta información acerca de los fotorreceptores. Analizando los grupos de ratas sanas con y sin tratamiento (SDxLE) en la Figura 33.A destacamos que los tres tratamientos fueron capaces de incrementar la amplitud de la onda a. La administración de MT, igual que hemos comentado con los resultados de la AV y SC del optomotor, proporcionó una menor mejoría a los animales tratados; la diferencia con el grupo SDxLE vehículo y SDxLE MT sólo alcanzó significación estadística a favor del grupo MT con la intensidad de estímulo más elevada ( $2,85 \text{ cd's/m}^2$ ), siendo los valores de este grupo de  $447,7 \pm 23,87 \mu\text{V}$ , respecto al valor de  $397,311 \pm 55,77 \mu\text{V}$  del grupo vehículo. Tanto el EGCG como la administración de MT+EGCG mejoraron los valores de la onda a partir de la intensidad de estímulo  $0,37 \text{ cd's/m}^2$ . Cuando la intensidad del estímulo presentado fue de  $2,85 \text{ cd's/m}^2$ , la diferencia entre el grupo no tratado y estos dos grupos fue de un 28,7% superior en el grupo EGCG y de un 24% en el grupo MT+EGCG.

Al comparar el grupo de P23HxLE con su grupo de referencia SDxLE (Figura 33.B), observamos registros claramente inferiores desde la intensidad de estímulo  $-0,42 \text{ cd's/m}^2$ . Con esta intensidad, el grupo de animales P23HxLE sin tratamiento presentaba unos valores de amplitud de la onda a un 73,8% inferiores respecto a las ratas SDxLE con valores de  $37,619 \pm 4,26 \mu\text{V}$  y de  $143,306 \pm 14,14 \mu\text{V}$  respectivamente. Con el estímulo de máxima intensidad aplicada,  $2,85 \text{ cd's/m}^2$ , esta diferencia se incrementó hasta un 87,5%.

Las variaciones en los distintos grupos de ratas P23HxLE tratados con antioxidantes fueron mínimamente detectables: con el estímulo de intensidad  $-0,42 \text{ cd's/m}^2$ , el grupo P23H tratado con MT presentaban unos valores de  $29,1732 \pm 5,55$

$\mu\text{V}$ , el grupo EGCG  $20,1233 \pm 4,54 \mu\text{V}$  y el grupo MT+EGCG  $29,454 \pm 3,40 \mu\text{V}$ ; con el estímulo de máxima intensidad los valores de amplitud de la onda a fueron, en el grupo tratado con MT de  $27,4151 \pm 6,97 \mu\text{V}$ , en el grupo EGCG  $25,5464 \pm 12,00 \mu\text{V}$  y en el grupo tratado con MT+EGCG  $57,8818 \pm 10,48 \mu\text{V}$ . Este último fue el único grupo que presentaba unos valores ligeramente superiores a los observados en las ratas P23HxLE no tratadas ( $49,8422 \pm 16,10 \mu\text{V}$ ); el resto de los grupos presentaba un empeoramiento en el ERG comparado con el grupo no tratado.



**Figura 33.** Amplitud de la onda a obtenida mediante electroretinograma a distintas intensidades de estímulo en las ratas Sprague-Dawley cruzadas con Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H cruzadas con Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo)

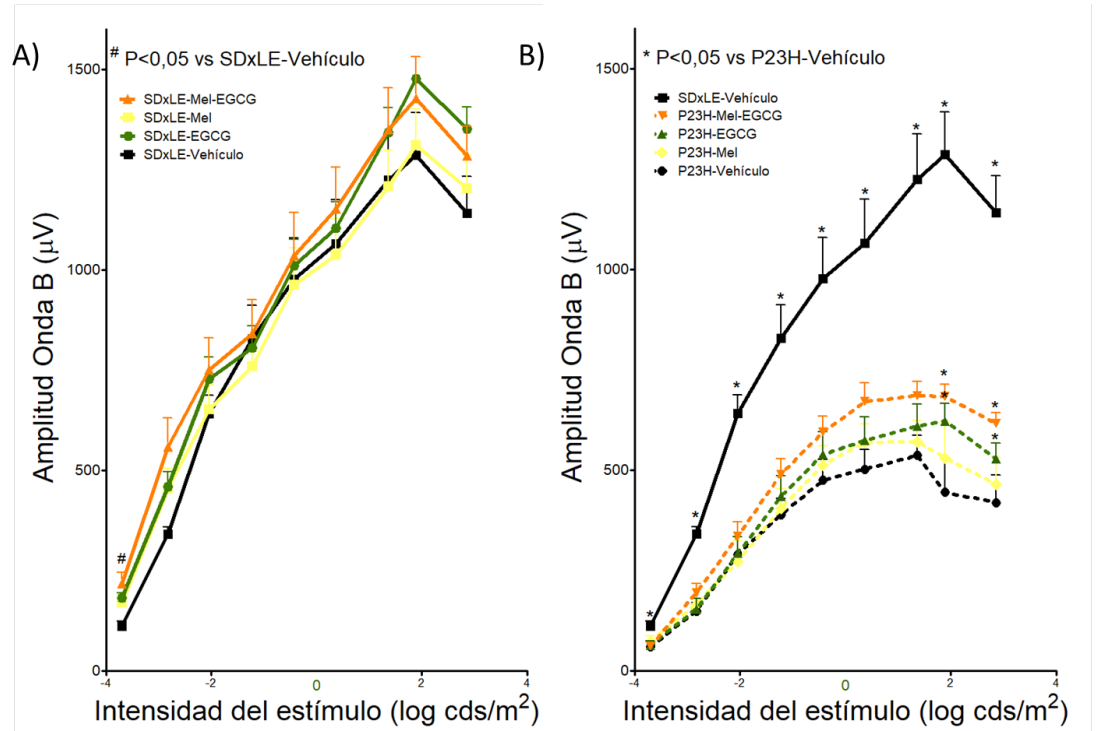
## AMPLITUD DE LA ONDA B

En la Figura 34 se muestra la representación gráfica de la amplitud de onda b en  $\mu\text{V}$  registrada frente al logaritmo de la intensidad lumínica aplicada medida en  $\text{cd's/m}^2$ . A P180 los animales de referencia SDxLE no tratados, con el mínimo estímulo aplicado de  $-3,7 \text{cd's/m}^2$  presentaron una amplitud de la onda b de  $111,4 \pm 13,01 \mu\text{V}$ .

Al aumentar la intensidad del estímulo presentaron valores de amplitud crecientes hasta alcanzar el valor máximo de  $1285,9 \pm 106,30 \mu\text{V}$  con una intensidad de estímulo de  $1,89 \text{ cd's/m}^2$ . El aumento en la intensidad del estímulo presentó amplitudes descendentes, obteniendo con la intensidad máxima utilizada de  $2,85 \text{ cd's/m}^2$  un valor de  $1141,2 \pm 92,44 \mu\text{V}$ . En el grupo de P23HxLE, el valor obtenido con el estímulo  $-3,7 \text{ cd's/m}^2$  fue de  $25,7117 \pm 5,57 \mu\text{V}$ , con  $1,89 \text{ cd's/m}^2$ , de  $44,0717 \pm 9,06 \mu\text{V}$  y con  $2,85 \text{ cd's/m}^2$  una amplitud de la onda b de  $49,8422 \pm 16,10 \mu\text{V}$ , que se corresponden con el 54%, 34,6% y 36,8% de las amplitudes del grupo SDxLE. Con todas las intensidades de estímulo lumínico a P180, todos los valores obtenidos en el grupo P23HxLE fueron significativamente inferiores a los obtenidos en el grupo de referencia SDxLE, indicando la progresión de la enfermedad.

Al igual que ocurrió en la SC, en las ratas P23HxLE, el tratamiento con la catequina del té verde, el grupo EGCG, y el grupo MT+EGCG presentaron, con un estímulo de intensidad alta de  $1,89 \text{ cd's/m}^2$ , valores estadísticamente superiores, de  $623,1 \pm 43,75 \mu\text{V}$  y  $683,86 \pm 29,96 \mu\text{V}$ , respectivamente, es decir, un 40% y un 53,6% más altos respecto al grupo no tratado.

En el caso de ratas SDxLE, todos los tratamientos mostraron tendencia a incrementar los valores de amplitud de la onda b, siendo este efecto más marcado en al aumentar la intensidad del estímulo. Este aumento de la amplitud sólo alcanzó diferencias estadísticamente significativas en la intensidad más baja,  $-3,7 \text{ cd's/m}^2$ , con el tratamiento MT+EGCG, con unos valores de  $218,15 \pm 28,17 \mu\text{V}$  respecto a  $111,399 \pm 13,01 \mu\text{V}$  en el caso del grupo vehículo.



**Figura 34.** Amplitud de la onda b obtenida mediante electroretinograma a distintas intensidades de estímulo en las ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $n=5$  por grupo).

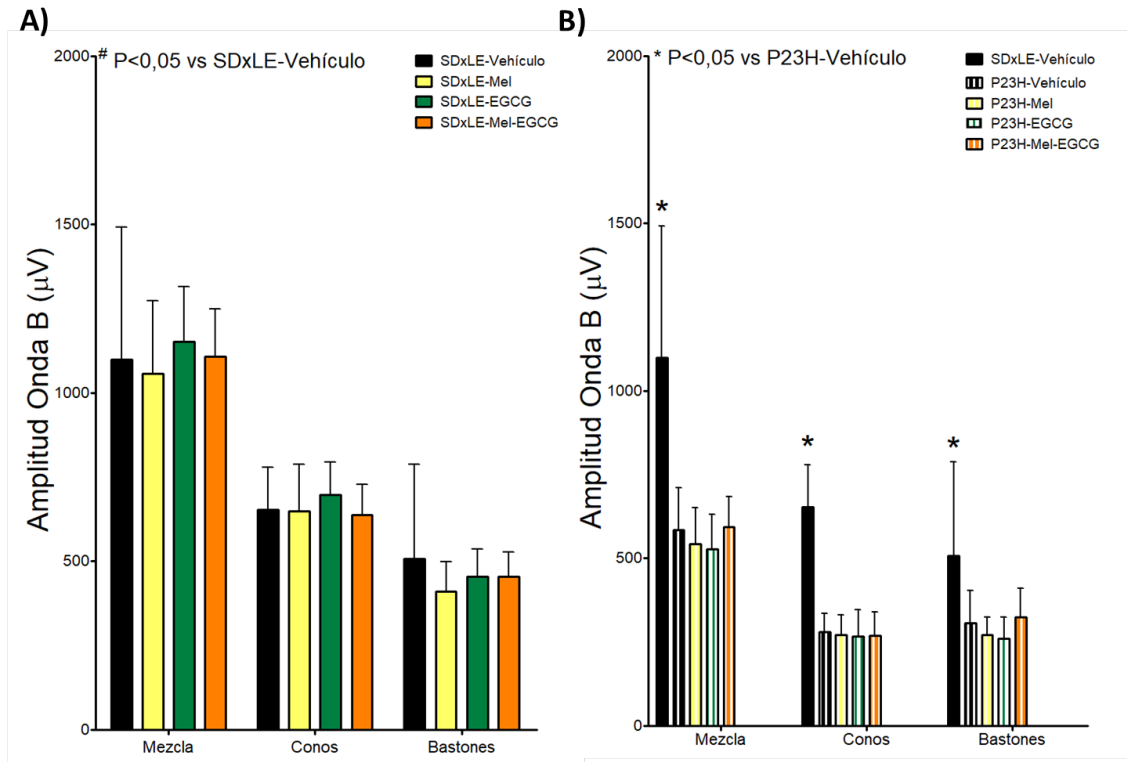
## DOBLE FLASH

La Figura 35 muestra los resultados obtenidos tras el protocolo de doble flash para los distintos grupos de tratamiento en el caso de las ratas SDxLE (A) y P23HxLE (B). El primer flash tiene como objetivo la obtención de una respuesta mixta de conos y bastones. El segundo flash, separado del primero por un segundo de tiempo, provoca únicamente una respuesta de los conos en condiciones escotópicas, ya que los bastones se encuentran saturados por el primer flash. La diferencia entre ambas respuestas nos da la contribución de los bastones al ERG.

En el caso de las ratas SDxLE (ver Figura 35.A), tras la administración de EGCG observamos una discreta mejora en la amplitud tanto de la respuesta mixta, como en la de los conos (4 y 6% respectivamente). En el caso de la respuesta de bastones los valores fueron discretamente inferiores con los 3 tratamientos. Todos los resultados, como hemos comentado, se presentan en porcentajes de sus valores absolutos. En ningún caso las diferencias entre ellos alcanzaron significación estadística.



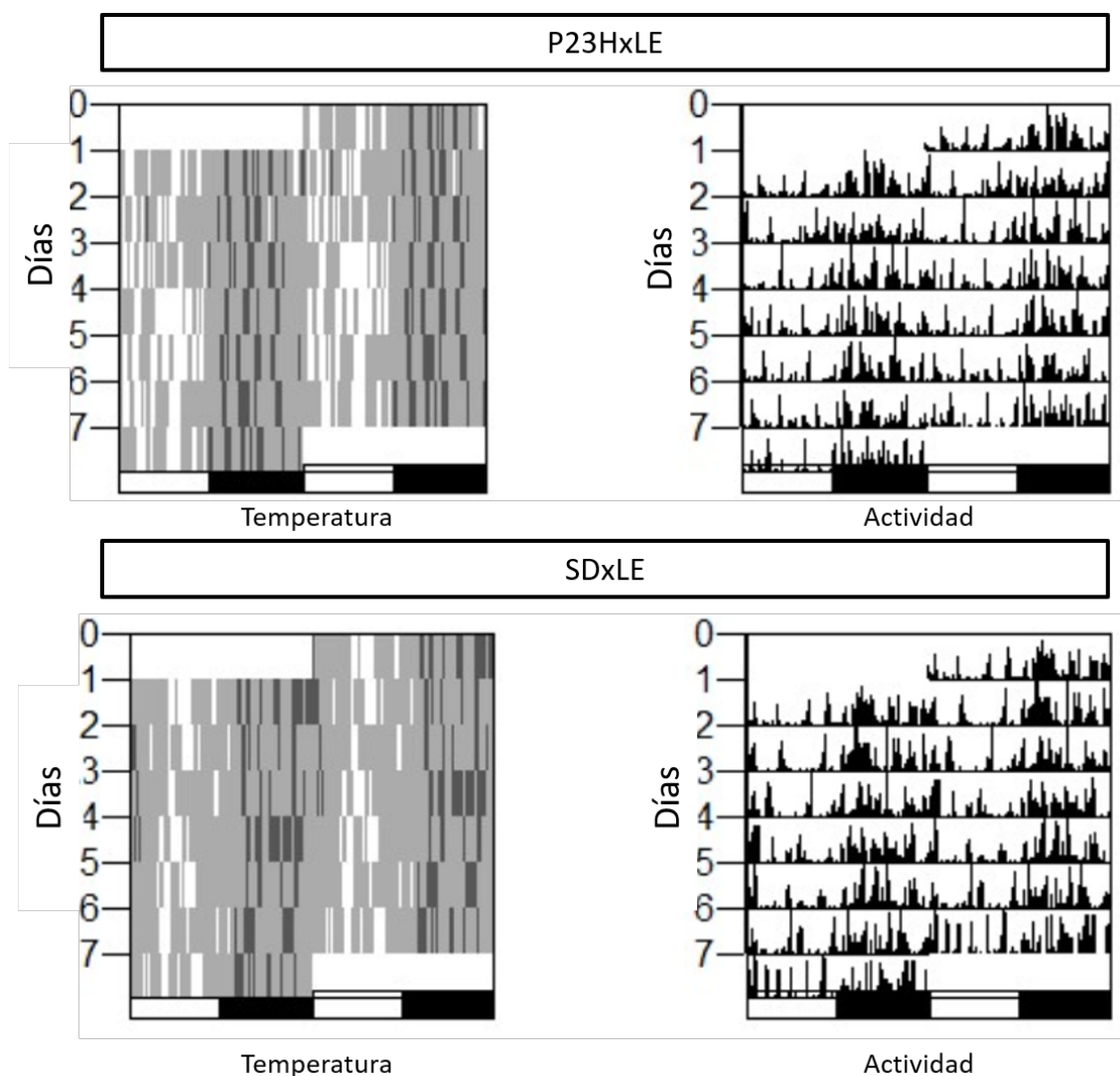
En el ERG a P180 existían diferencias entre el grupo de referencia SDxLE y el grupo P23HxLE sin tratamiento (Figura 35.B). Los valores para ambos casos fueron  $1098,98 \pm 160,45 \mu\text{V}$  en las ratas SDxLE y  $585,32 \pm 39,85 \mu\text{V}$  en las ratas P23HxLE con el 1<sup>er</sup> flash,  $653,6 \pm 39,87 \mu\text{V}$  y  $279,87 \pm 17,72 \mu\text{V}$ , respectivamente, con el segundo, y la diferencia entre ellas, que indicaría la respuesta específica de los bastones fue de  $506,77 \pm 114,64 \mu\text{V}$  en el primer grupo y de  $305,45 \pm 30,75 \mu\text{V}$  en el segundo grupo. Comparando los resultados de ambos grupos vemos que la diferencia fue un 53,3% inferior en las ratas P23HxLE en la respuesta mixta, un 42,8% en la respuesta específica de los conos y un 60% al sustraer la respuesta del segundo flash al primero, la respuesta de los bastones. Es por tanto esta última, la respuesta derivada de la función de los bastones a P180, la más afectada, en las ratas P23H, con un valor de  $305,45 \pm 30,7 \mu\text{V}$ , datos compatibles con la patología que poseen, una mutación específica de la rodopsina afectándose de modo primario los bastones y provocando secundariamente una degeneración de los conos. Ninguno de los tratamientos antioxidantes administrados mejoró la amplitud de la onda b: en valores absolutos vemos unos valores discretamente superiores en el grupo MT+EGCC, con una mejora mínima del 5,9%, en la respuesta de los bastones. Sin embargo, tanto el grupo de MT como EGCG presentan valores absolutos inferiores en la sustracción de la respuesta del segundo flash al primero, con un empeoramiento de un 10,9% y un 14,6% respectivamente respecto al grupo de P23HxLE tratado con vehículo. Analizando la respuesta de los conos, con los 3 casos de tratamiento obtuvimos resultados prácticamente iguales a los obtenidos con las ratas P23HxLE sin tratar. En la respuesta mixta se observa la misma tendencia que en el caso de la respuesta de bastones, con unos valores un 1,4% superiores para el grupo con MT+EGCG en el agua de bebida, y un 7,1% y un 9,8% inferiores para los grupos de MT y EGCG administrados de forma individual.



**Figura 35.** Representación de la respuesta de los conos y los bastones a la onda b obtenida mediante el protocolo de doble flash de intensidad  $1,4 \log \text{ cd.s/m}^2$  en ERG, en las ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento, a P180. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).

## PARÁMETROS DE FUNCIÓN NO VISUAL: TELEMETRÍA

La Figura 36 muestra un ejemplo de la representación de la temperatura y de la actividad los 7 días de registro, a lo largo del período de luz y de oscuridad, de un animal del grupo P23HxLE y otro del grupo SDxLE, ambos sin tratar, a P180.



**Figura 36.** Ritmos circadianos. Representación de los actogramas obtenidos en ratas transgénicas P23HxLE y SDxLE en los parámetros de temperatura corporal y actividad locomotora, durante 7 días de registro a P180.

Hubo problemas en la obtención y descarga de los datos a P60, con lo que únicamente podemos aportar datos de P180. Dado que el grupo que tuvo problemas de registro fue el de las ratas sanas y la degeneración que puede presentar este animal por su base albina sería sólo después de tiempos avanzados de degeneración (392, 393) no consideramos necesario repetir la administración de tratamiento en ratas SDxLE para obtener los valores a P60 y así evitar un uso excesivo e injustificado de animales. Sí que obtuvimos registros de los grupos de P23H con los distintos tratamientos a ambas edades.

A continuación presentamos los resultados comentados a P180:

Las Tablas 3 y 4 muestran todos los parámetros obtenidos a P180 analizados tanto en el grupo de las ratas P23HxLE, como en el de las ratas de referencia, SDxLE, divididas en los distintos grupos según los tratamientos administrados.

**Tabla 3.** Parámetros analizados en el grupo de animales de referencia SDxLE en el estudio de los ritmos circadianos.

	SDxLE			
	Vehículo	MT	EGCG	MT+EGCG
<b>TEMPERATURA</b>				
<b>Parámetros del ritmo</b>				
Mesor 24-h (°C)	36,96 ± 0,04	36,93 ± 0,06	36,99 ± 0,04	36,83 ± 0,03
Amplitud (°C)	0,37 ± 0,01	0,46 ± 0,03#	0,46 ± 0,10	0,67 ± 0,09#
Acrofase (min)	1118,26 ± 23,66	1077,83 ± 15,82	1088,46 ± 11,86	1083,38 ± 27,12
Acrofase (hh:mm)	2:43 ± 0:23	2:02 ± 0:15	2:13 ± 0:11	2:08 ± 0:27
Varianza explicada (%)	26,08 ± 1,076	31,05 ± 4,165	30,49 ± 7,936	46,59 ± 7,057
Periodo (min)	1445,00 ± 20,00	1440,00 ± 5,00	1440,00 ± 5,00	1445,00 ± 0,00
<b>Variables no paramétricas</b>				
Estabilidad interdiaria (EI)	0,63 ± 0,03	0,63 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,69 ± 0,03
Variabilidad intradiaria (VI)	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,03
Amplitud relativa (AR)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
L2 (hh:mm)	5:05 ± 2:30	6:17 ± 0:32	6:35 ± 0:21	7:10 ± 0:30
VL2 (°C)	37,53 ± 0,08	37,55 ± 0,08	37,57 ± 0,07	37,43 ± 0,06
Media (°C)	37,43 ± 0,04	37,44 ± 0,04	37,45 ± 0,04	37,35 ± 0,02
CFI	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,28 ± 0,01#	0,28 ± 0,01
<b>ACTIVIDAD</b>				
<b>Parámetros del ritmo</b>				
Mesor 24-h (Recuentos)	4,47 ± 0,42	4,45 ± 0,24	3,14 ± 0,21#	3,33 ± 0,53
Amplitud (Recuentos)	2,67 ± 0,35	2,44 ± 0,17	2,24 ± 0,24	2,53 ± 0,47
Acrofase (min)	1145,71 ± 35,07	1191,68 ± 27,01	1175,15 ± 30,04	1159,12 ± 30,36
Acrofase (hh:mm)	3:10 ± 0:35	3:56 ± 0:27	3:40 ± 0:30	3:24 ± 0:30
Varianza explicada (%)	11,77 ± 1,59	10,56 ± 1,98	14,04 ± 2,18	14,84 ± 1,70
Periodo (min)	1441,67 ± 3,33	1437,50 ± 2,50	1445,00 ± 4,08	1445,00 ± 4,08
<b>Variables no paramétricas</b>				
Estabilidad interdiaria (EI)	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,37 ± 0,02
Variabilidad intradiaria (VI)	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,03	0,91 ± 0,09	0,81 ± 0,10
Amplitud relativa (AR)	0,50 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,64 ± 0,03#	0,66 ± 0,02#
L2 (hh:mm)	6:31 ± 0:24	5:12 ± 0:30	6:27 ± 0:13	3:57 ± 1:07
VL2 (Recuentos)	4,67 ± 0,89	4,54 ± 0,32	3,06 ± 0,25	3,38 ± 0,56
Media (Recuentos)	4,87 ± 0,43	4,85 ± 0,25	3,51 ± 0,21#	3,70 ± 0,54
CFI	0,60 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,04
Índice de desincronización	0,19 ± 0,14	0,09 ± 0,04#	0,02 ± 0,01	0,27 ± 0,13

L2: Hora de comienzo de 2 horas de valores mínimos; VL2: valor medio de 2 horas de valores mínimos; CFI: índice de funcionalidad circadiana. Los datos se muestran como la media ± error estándar. En rojo se muestran las diferencias que alcanzaron significación estadística. #: P<0,05 vs SDxLE-Vehículo

**Tabla 4.** Parámetros analizados en el grupo de animales transgénicos P23HxLE en el estudio de los ritmos circadianos.

	SDxLE	P23HxLE			
	Vehículo	Vehículo	MT	EGCG	MT+EGCG
<b>TEMPERATURA</b>					
<b>Parámetros del ritmo</b>					
Mesor 24-h (°C)	36,96 ± 0,04	37,16 ± 0,13	37,00 ± 0,06	36,96 ± 0,03	37,01 ± 0,05
Amplitud (°C)	0,37 ± 0,01*	0,51 ± 0,06	0,57 ± 0,13	0,56 ± 0,05	0,49 ± 0,04
Acrofase (min)	1118,26 ± 23,66	1022,90 ± 30,69	1018,58 ± 4,63	1005,43 ± 14,16	1026,74 ± 10,96
Acrofase (hh:mm)	2:43 ± 0:23	1:07 ± 0:30	1:03 ± 0:04	0:50 ± 0:14	1:11 ± 0:10
Varianza explicada (%)	26,08 ± 1,076*	38,03 ± 4,806	40,65 ± 9,102	42,05 ± 4,473	34,43 ± 3,958
Periodo (min)	1445,00 ± 20,00	1442,50 ± 2,50	1442,50 ± 2,50	1445,00 ± 4,08	1450,00 ± 5,00
<b>Variables no paramétricas</b>					
Estabilidad interdiaria (EI)	0,63 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,64 ± 0,02
Variabilidad intradiaria (VI)	0,25 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,05
Amplitud relativa (AR)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
L2 (hh:mm)	5:05 ± 2:30*	13:55 ± 1:24	10:02 ± 0:11	12:42 ± 0:56	12:42 ± 1:13
VL2 (°C)	37,53 ± 0,08	37,43 ± 0,07	37,30 ± 0,11	37,29 ± 0,04*	37,38 ± 0,05
Media (°C)	37,43 ± 0,04	37,48 ± 0,03	37,48 ± 0,05	37,45 ± 0,02	37,48 ± 0,04
CFI	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,30 ± 0,01
<b>ACTIVIDAD</b>					
<b>Parámetros del ritmo</b>					
Mesor 24-h (Recuentos)	4,47 ± 0,42*	2,69 ± 0,28	3,09 ± 0,48	2,67 ± 0,21	3,68 ± 0,60
Amplitud (Recuentos)	2,67 ± 0,35	1,90 ± 0,17	1,70 ± 0,17	1,60 ± 0,10	2,48 ± 0,42
Acrofase (min)	1145,71 ± 35,07	1056,88 ± 21,28	980,50 ± 43,69	982,23 ± 7,71*	1025,56 ± 9,22
Acrofase (hh:mm)	3:10 ± 0:35	1:41 ± 0:21	0:25 ± 0:43	0:27 ± 0:07*	1:10 ± 0:09
Varianza explicada (%)	11,77 ± 1,59	13,24 ± 1,39	9,08 ± 2,75	8,40 ± 0,49*	13,92 ± 0,85
Periodo (min)	1441,67 ± 3,33	1442,50 ± 2,50	1457,50 ± 13,15	1460,00 ± 8,66*	1447,50 ± 2,50
<b>Variables no paramétricas</b>					
Estabilidad interdiaria (EI)	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,01*	0,31 ± 0,01
Variabilidad intradiaria (VI)	0,96 ± 0,01	1,08 ± 0,07	1,07 ± 0,01	1,08 ± 0,04	0,97 ± 0,03
Amplitud relativa (AR)	0,50 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,49 ± 0,07	0,51 ± 0,04	0,56 ± 0,02
L2 (hh:mm)	6:31 ± 0:24*	6:45: ± 0:20	6:55: ± 0:43	6:30: ± 0:33	6:25: ± 0:48
VL2 (Recuentos)	4,67 ± 0,89*	2,82 ± 0,13	2,74 ± 0,30	2,27 ± 0,16	3,38 ± 0,55
Media (Recuentos)	4,87 ± 0,43*	3,07 ± 0,29	3,48 ± 0,49	3,06 ± 0,21	4,06 ± 0,60
CFI	0,60 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,00
Índice de desincronización	0,19 ± 0,14*	0,60 ± 0,11	0,26 ± 0,07*	0,52 ± 0,08	0,52 ± 0,15

L2: Hora de comienzo de 2 horas de valores mínimos; VL2: valor medio de 2 horas de valores mínimos; CFI: índice de funcionalidad circadiana. Los datos se muestran como la media ± error estándar. En rojo se muestran las diferencias que alcanzaron significación estadística. \*: P<0,05 vs P23H-Vehículo

Vemos al comparar ambos grupos, la existencia de alguna diferencia: lo más destacable es el desplazamiento que tiene lugar en las ratas P23HxLE, de las 2 horas de temperatura mínima (L2), respecto a las ratas SDxLE. Éstas últimas presentan esta ventana de tiempo en el horario de las 5:05 ± 2:30h mientras que las ratas P23HxLE la

situarían sobre  $13:55 \pm 1:24h$ , es decir, observamos una separación de aproximadamente 9 horas entre ambos grupos. Si comparamos de la misma forma el parámetro de actividad, vemos que la diferencia entre ambos grupos es significativa, pero franjas horarias entre ambos grupos están mucho menos separadas que en el caso de la temperatura ( $6:31 \pm 0:24 h$  en el caso de las SDxLE vs  $6:45 \pm 0:20h$  para las P23HxLE). Estos datos se pueden observar con mayor claridad estudiando el índice de desincronización L2, que nos informa acerca de la diferencia de tiempo entre L2 de temperatura y L2 de actividad. El valor máximo que puede alcanzar es 1, que equivaldría a 12 horas de diferencia entre L2 de temperatura y L2 de actividad, la máxima desincronización; un valor de 0,5 nos informaría de una diferencia de tiempo entre L2 temperatura y L2 actividad de 6 horas; un valor de 0 significaría que L2 de temperatura y L2 de actividad comienzan al mismo tiempo, la sincronización ideal. Los animales P23HxLE tienen una peor sincronización entre temperatura y actividad que los animales de referencia SDxLE, mostrado por un índice de desincronización de  $0,60 \pm 0,11$  en los animales P23HxLE respecto a  $0,19 \pm 0,14$  en los animales de referencia. Es decir, en los animales P23HxLE hay más de 7h de diferencia entre el comienzo de las dos horas de mínima actividad y el comienzo de las dos horas de mínima temperatura, lo que muestra que el animal no tiene su ritmo endógeno de temperatura sincronizado con su actividad.

Otra diferencia observada al analizar los datos entre los animales P23HxLE y los animales sanos SDxLE, es que éstos últimos presentan una mayor actividad ( $4,47 \pm 0,42$  respecto a  $2,69 \pm 0,28$ ). Podemos observar cierta tendencia a que las ratas P23H pigmentadas presentaran mayores niveles de VI respecto a las sanas SDxLE, indicando una fragmentación del ritmo ligeramente superior en estos animales.

El grupo P23HxLE tratado con MT presentó una mejora significativa del índice de desincronización, objetivando unos valores en este grupo de  $0,26 \pm 0,07$  comparados con  $0,60 \pm 0,11$  del grupo P23HxLE no tratado. Por otro lado, el principal efecto observado con el tratamiento EGCG es un empeoramiento en el periodo de actividad en los animales que lo tomaron. También se observa un descenso en el valor de la variable no paramétrica EI: esto nos indica una relación más débil de la actividad realizada por los animales los distintos días de registro, es decir, no existía

homogeneidad en la actividad realizada por los animales entre distintos días. Esta variable está modulada por reguladores o sincronizadores, entre los que destaca el ciclo de luz-oscuridad (estos sincronizadores también se conocen como *zeitgebers*), de ahí que alteraciones en la percepción del día y la noche, provocaría cambios en ella. El grupo P23HxLE con MT+EGCG no presentó ningún tipo de cambio significativo, ni beneficioso ni perjudicial.

Respecto a las ratas SDxLE, MT incrementó el valor de la amplitud del parámetro temperatura y disminuyó el índice de desincronización previamente comentado. El tratamiento combinado MT+EGCG aumentó de manera estadísticamente significativa el valor de la amplitud de la temperatura y la variable no paramétrica de la amplitud relativa de la actividad; estos hallazgos sugieren una amplitud del ritmo circadiano mayor. Sin embargo, el tratamiento único de EGCG redujo los valores de actividad de los animales que lo tomaron, aunque por otro lado, incrementó el valor de la variable AR de la actividad: se trataba por tanto de animales menos activos respecto a los que no tomaron tratamiento, pero que presentaban un pico con una mayor actividad. Se observó también un descenso en el valor CFI en la variable temperatura.

La Tabla 5 muestra las diferencias entre las variables analizadas entre las edades P60 y P180 en los grupos de las ratas P23HxLE.

**Tabla 5.** Diferencias entre los parámetros analizados en el grupo de animales transgénicos P23HxLE en el estudio de los ritmos circadianos.

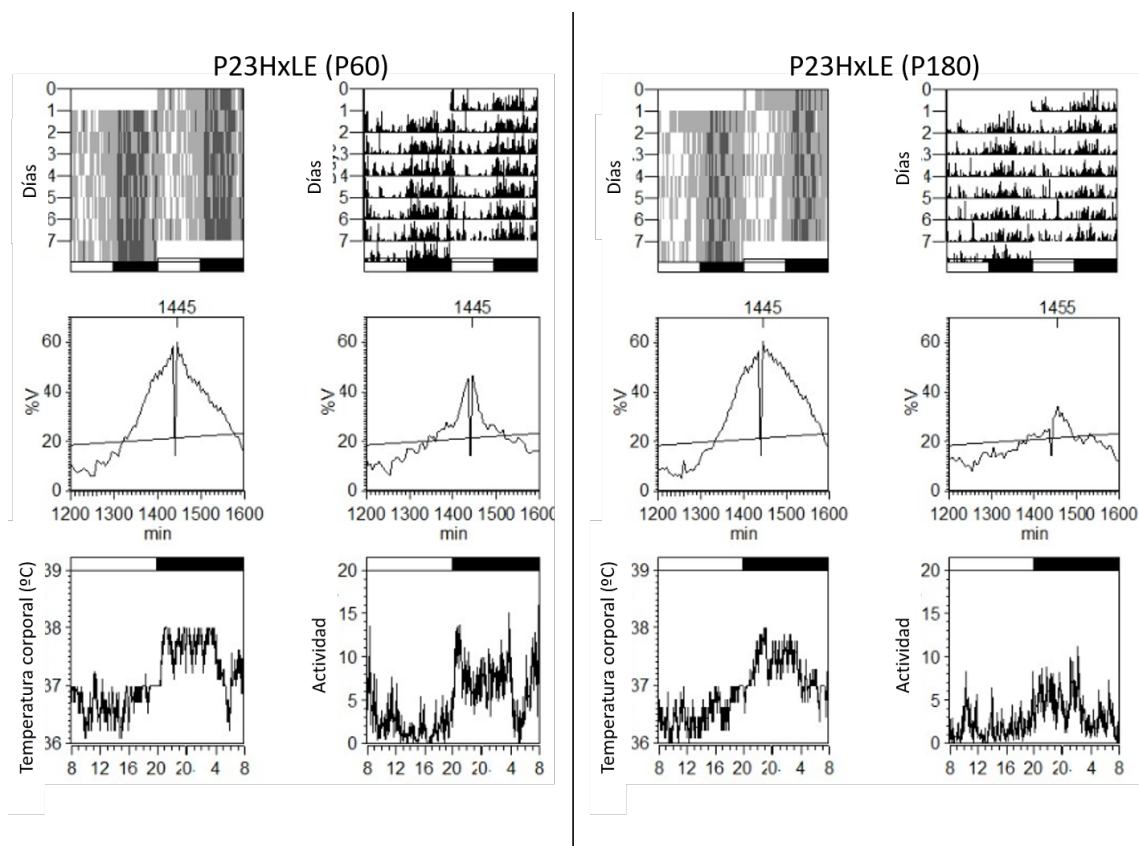
	P23HxLE			
	Vehículo	MT	EGCG	MT+EGCG
<b>TEMPERATURA</b>				
<b>Parámetros del ritmo</b>				
Mesor 24-h (°C)	-0,02 ± 0,15	-0,13 ± 0,04	-0,21 ± 0,01	-0,23 ± 0,04
Amplitud (°C)	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,08	-0,01 ± 0,01	-0,02 ± 0,04
Acrofase (min)	-50,95 ± 39,67	-31,58 ± 6,24	-45,50 ± 19,36	-38,33 ± 16,85
Acrofase (hh:mm)	-0,04 ± 0,03	-0,02 ± 0,00	-0,03 ± 0,01	-0,03 ± 0,01
Varianza explicada (%)	4,06 ± 2,83	1,44 ± 5,62	2,01 ± 1,87	-2,38 ± 2,05
Periodo (min)	-2,50 ± 2,50	0,00 ± 4,08	0,00 ± 4,08	5,00 ± 5,00
<b>Variables no paramétricas</b>				
Estabilidad interdiaria (EI)	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,03	-0,05 ± 0,01	-0,05 ± 0,03
Variabilidad intradiaria (VI)	-0,02 ± 0,02	-0,01 ± 0,02	-0,04 ± 0,04	-0,02 ± 0,04
Amplitud relativa (AR)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
L2 (hh:mm)	0,05 ± 0,10	-0,08 ± 0,04	-0,10 ± 0,05	-0,13 ± 0,03
VL2 (°C)	-0,17 ± 0,10	-0,28 ± 0,09	-0,23 ± 0,08	-0,35 ± 0,04
Media (°C)	36,05 ± 0,02	35,87 ± 0,19	35,86 ± 0,12	35,93 ± 0,10
CFI	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	-0,03 ± 0,01	-0,02 ± 0,01
<b>ACTIVIDAD</b>				
<b>Parámetros del ritmo</b>				
Mesor 24-h (Recuentos)	-1,98 ± 0,04	-1,95 ± 0,61	-1,65 ± 0,17	-1,61 ± 0,58
Amplitud (Recuentos)	-1,45 ± 0,27	-1,26 ± 0,09	-1,20 ± 0,23	-1,00 ± 0,40
Acrofase (min)	-63,62 ± 22,88	-128,22 ± 40,61	<b>-133,99 ± 4,95*</b>	-94,91 ± 21,77
Acrofase (hh:mm)	-0,04 ± 0,02	-0,09 ± 0,03	<b>-0,09 ± 0,00*</b>	-0,07 ± 0,02
Varianza explicada (%)	-3,72 ± 1,96	-3,98 ± 2,45	-8,25 ± 3,17	-2,44 ± 1,52
Periodo (min)	0,00 ± 4,08	12,50 ± 13,15	<b>17,50 ± 7,50*</b>	5,00 ± 2,89
<b>Variables no paramétricas</b>				
Estabilidad interdiaria (EI)	-0,11 ± 0,05	-0,10 ± 0,04	-0,21 ± 0,03	-0,12 ± 0,03
Variabilidad intradiaria (VI)	0,24 ± 0,06	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,20 ± 0,05
Amplitud relativa (AR)	-0,10 ± 0,04	-0,11 ± 0,04	-0,14 ± 0,05	-0,13 ± 0,05
L2 (hh:mm)	-0,35 ± 0,01	-0,30 ± 0,07	-0,35 ± 0,02	-0,43 ± 0,03
VL2 (Recuentos)	-1,27 ± 0,33	-2,15 ± 0,87	-1,30 ± 0,41	-1,35 ± 0,30
Media (Recuentos)	-7,37 ± 0,51	-6,17 ± 0,80	-6,03 ± 0,73	-7,43 ± 1,26
CFI	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	-0,03 ± 0,03	-0,02 ± 0,01
Índice de desincronización	0,39 ± 0,12	0,08 ± 0,14	0,46 ± 0,08	0,36 ± 0,21

L2: Hora de comienzo de 2 horas de valores mínimos; VL2: valor medio de 2 horas de valores mínimos; CFI: índice de funcionalidad circadiana. Los datos se muestran como la media ± error estándar. En rojo se muestran las diferencias que alcanzaron significación estadística. \*: P<0,05 vs P23H-Vehículo

En los grupos de las P23HxLE a P60 y P180 no se observaron grandes diferencias al comparar los 4 grupos de tratamiento. Observamos que el EGCG provocó un incremento en la diferencia del parámetro de la acrofase y el periodo del



parámetro de actividad locomotora. Podemos observar un ejemplo de los resultados obtenidos en la Figura 37.



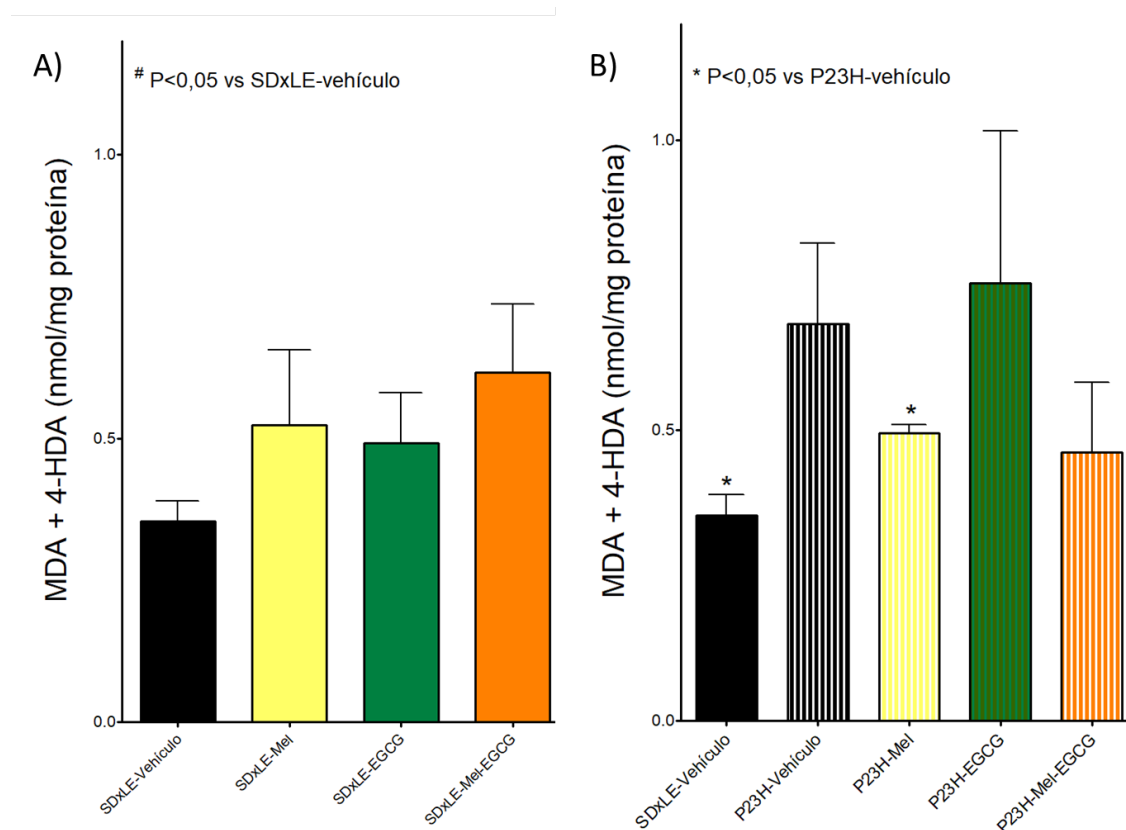
**Figura 37.** Ritmos circadianos de la temperatura corporal y la actividad locomotora de ratas P23HxLE. Actogramas (panel superior), periodogramas (panel central) y ondas medias (panel inferior) representativos del grupo de ratas sin tratar, medido a P60 y P180, expuestas a ritmos de luz de 12:12. Los horarios de luz y oscuridad están representados con barras blancas y negras, respectivamente.

## PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Una vez terminados los 6 meses de tratamiento, y tras la finalización de las pruebas funcionales de valoración visual, se sacrificaron los animales, y se extrajo el hígado. Este tejido se utilizó para evaluar el daño oxidativo/nitrosativo y los distintos sistemas de defensa antioxidante: la actividad de las enzimas CAT, SOD y GST y la capacidad total antioxidante de los animales.

## MDA + 4-HDA

Los niveles de LPO se midieron mediante la determinación de los valores de concentración de MDA y 4-HDA. Los valores quedan recogidos en la Figura 38 comparando tanto las ratas sanas SDxLE como las ratas P23HxLE con los distintos tratamientos. Los niveles de MDA + 4-HDA como muestra del daño oxidativo existente a nivel lipídico en el tejido hepático se representaron en nmoles/mg de proteína.



**Figura 38.** Niveles de MDA y 4-HDA (lípidos peroxidados) en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). MDA: malonaldehído

La Figura 38.A muestra que los valores obtenidos en las ratas SDxLE sin tratamiento son inferiores al resto de valores obtenidos en los demás grupos a los cuales se les administraron antioxidantes: los valores del grupo vehículo fueron 0,3536 ± 0,036 nmoles/mg de proteína, mientras que en el grupo MT fueron 0,5235 ± 0,13 nmoles/mg de proteína, en el grupo EGCG 0,4922 ± 0,088 nmoles/mg de proteína y finalmente en el grupo MT+EGCG se obtuvieron unos valores de 0,616 ± 0,12

nmoles/mg de proteína. En ninguno de los 3 casos las diferencias alcanzaron significación estadística. El hecho de que animales sanos que reciben un suplemento antioxidante presenten tendencia a valores más altos de lípidos oxidados respecto aquellos que no reciben nada debería ser un punto importante de estudio respecto al efecto que tendrían los distintos suplementos alimenticios en personas sanas.

En la Figura 38.B, observamos los niveles de LPO en los animales P23HxLE: en primer lugar observamos que las ratas P23HxLE pertenecientes al grupo vehículo presentaban unos niveles superiores a los de las ratas de referencia SDxLE estadísticamente significativos ( $0,684 \pm 0,14$  nmoles/mg de proteína en el primer caso versus  $0,3536 \pm 0,036$  nmoles/mg de proteína). El único grupo que experimentó un descenso significativo en sus niveles de lípidos peroxidados fue el grupo MT, donde los valores obtenidos fueron de  $0,4954 \pm 0,01$  nmoles/mg de proteína. El grupo MT+EGCG, aunque también presentó una tendencia a menores niveles de MDA y 4-HDA,  $0,4618 \pm 0,12$  nmoles/mg de proteína, no alcanzaron significación estadística. Todo lo contrario al grupo EGCG, que presentó mayores niveles de LPO que el grupo sin tratamiento ( $0,7541 \pm 0,26$  nmoles/mg de proteína).

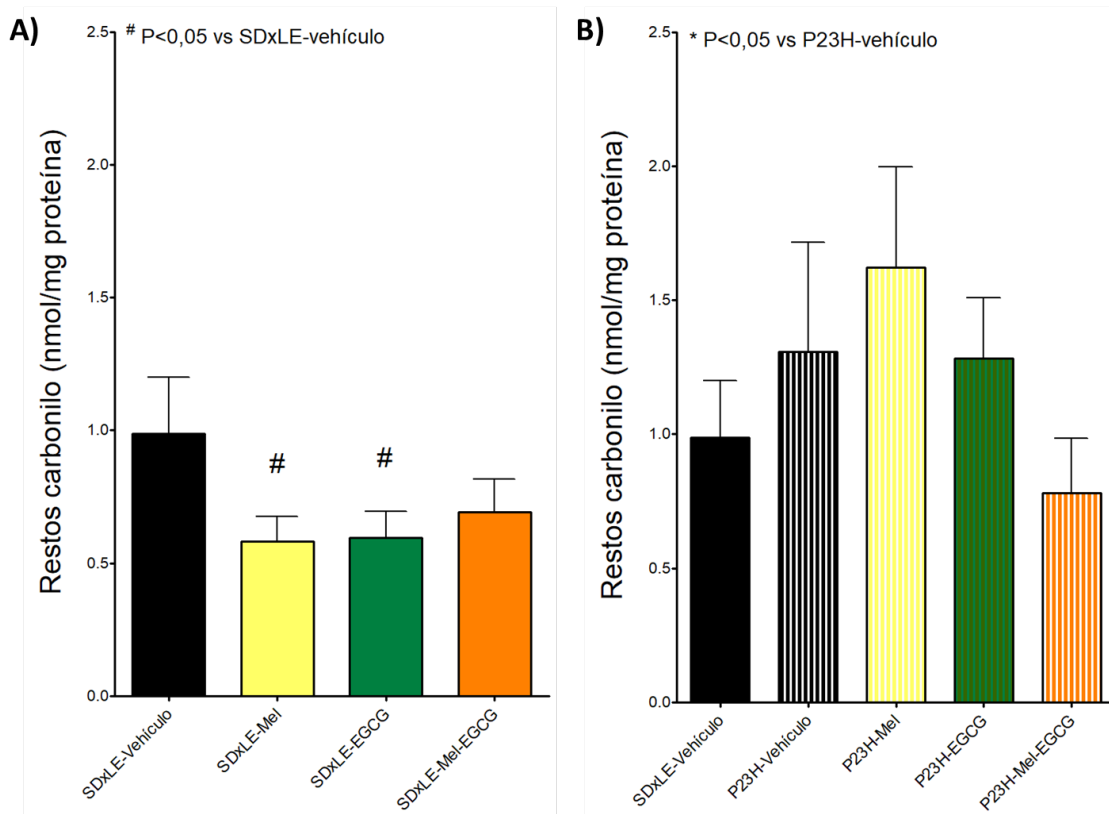
## RESTOS CARBONILOS

La medida de los niveles de restos carbonilos es un parámetro indicativo de los niveles de proteínas oxidadas en las células. Estos niveles se representaron en nmoles/mg de proteínas en función de los distintos grupos de tratamiento administrados.

En las ratas SDxLE de referencia, cuyos valores se muestran en la Figura 39.A, se puede ver como al tratar animales sanos con MT o con EGCG se reducen los niveles de proteínas oxidadas de forma significativa, con unos valores de  $0,583 \pm 0,09$  y  $0,595 \pm 0,1$  nmol/mg de proteína. Si comparamos estos resultados con los valores del grupo SDxLE vehículo ( $0,987 \pm 0,212$  nmol/mg de proteína), obtuvimos un descenso de un 41% y un 39,7%, respectivamente. El tratamiento combinado de los dos antioxidantes MT+EGCG, también disminuyó la concentración de restos carbonilo en un 29,8% sin

que esta disminución alcanzara significación estadística ( $0,693 \pm 0,13$  nmol/mg de proteína).

Analizando los niveles de restos carbonilos de las ratas P23HxLE, en la Figura 39.B, podemos observar que a pesar que existe cierta tendencia a que las ratas P23HxLE presenten niveles superiores respecto al grupo de referencia, SDxLE, las diferencias no alcanzaron significación estadística entre ambos grupos, siendo los valores obtenidos de  $1,306 \pm 0,41$  y  $0,9868 \pm 0,21$  nmol/mg de proteína, respectivamente. El grupo con tratamiento doble con antioxidantes en las ratas P23HxLE (MT+EGCG) fue en el que se detectó un menor nivel de proteínas oxidadas, ( $0,7796 \pm 0,21$  nmol/mg de proteína), respecto al tratamiento individual de MT con valores de  $1,621 \pm 0,38$  nmol/mg de proteína o EGCG con niveles de  $1,282 \pm 0,23$  nmol/mg de proteína. Los niveles de restos carbonilos en estos grupos fueron superiores a los del grupo de ratas P23HxLE sin tratamiento.



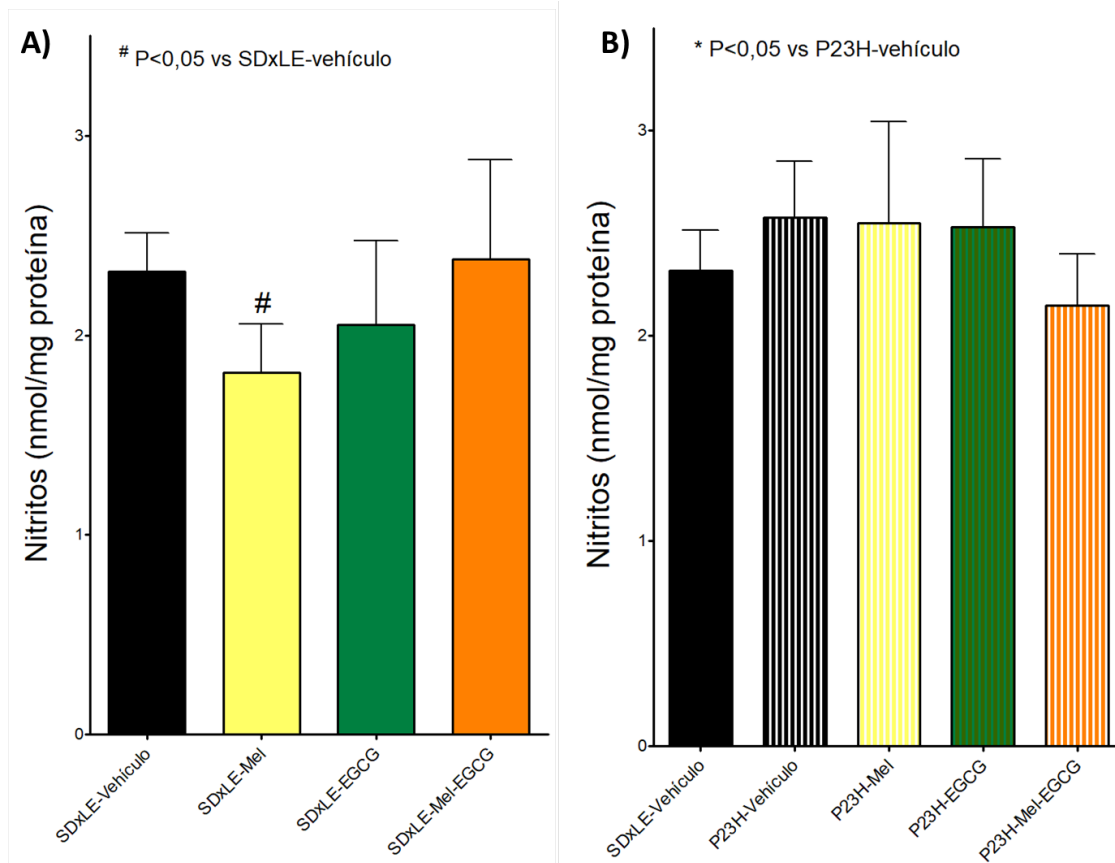
**Figura 39.** Niveles de restos carbonilos (proteínas oxidadas) en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).

## NITRITOS

La medida de los niveles de nitritos nos aporta un valor indicativo del daño nitrosativo que experimentan las células por la acción del radical  $\cdot\text{NO}$ . Los valores se presentan como niveles de nitritos en nmoles/mg de proteína.

En la Figura 40.A se puede observar un claro descenso de los niveles de nitritos cuando tratamos ratas sanas SDxLE con MT en el agua de bebida, alcanzando esta diferencia significación estadística, con unos valores de  $1,81 \pm 0,24$  nmoles/mg de proteína en el caso del grupo MT (un 21,8% inferior al grupo sin tratar). El EGCG también mejoró el estado nitrosativo del hígado de los animales sanos, con un descenso del 11,5%, pero sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Al contrario que lo que ocurría en las ratas P23HxLE, el doble tratamiento antioxidante MT+EGCG no tuvo efectos beneficiosos en el hígado analizando este marcador oxidativo, obteniendo unos valores de  $2,382 \pm 0,50$  nmoles/mg de proteína.

La Figura 40.B muestra la tendencia de los animales P23HxLE a presentar niveles superiores de nitritos respecto a los animales SDxLE ( $2,58 \pm 0,28$  y  $2,32 \pm 0,19$  nmoles/mg de proteína respectivamente). El tratamiento que logró una mayor disminución de los niveles de nitritos fue el del grupo MT+EGCG, con una disminución de un 16,6%, mientras que ambos antioxidantes administrados de forma independiente, prácticamente no alteraron dicha concentración (variaciones de un 1% en el caso del grupo MT y un 1,8% en el grupo EGCG, siendo los valores de  $2,549 \pm 0,49$  y  $2,528 \pm 0,34$  nmoles/mg de proteína, respectivamente).



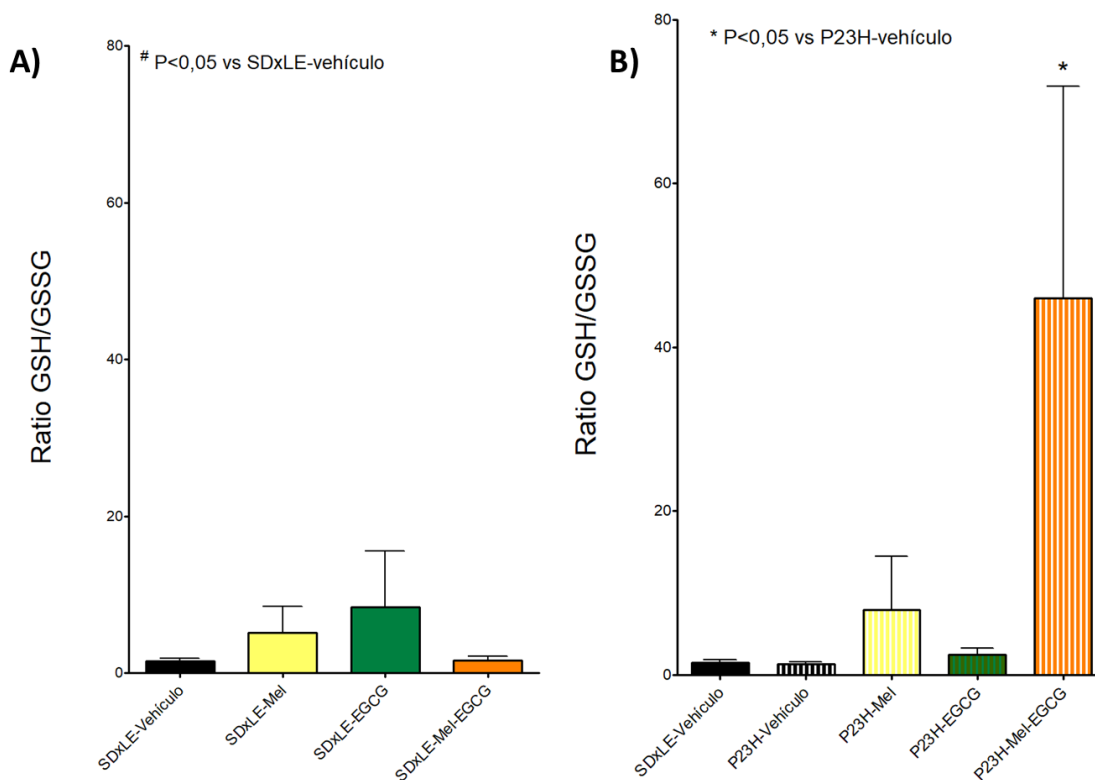
**Figura 40.** Niveles de nitritos en nmoles/mg de proteínas, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).

## RATIO GSH/GSSG

La ratio GSH/GSSG es un parámetro fundamental a la hora de cuantificar los niveles de estrés oxidativo presentes en el organismo. Unos niveles mayores de esta ratio indican, o bien una mayor concentración del glutatión reducido (GSH) o una menor de glutatión oxidado (GSSG), es decir, un menor estrés oxidativo.

La Figura 41.A muestra que las ratas SDxLE pertenecientes al grupo MT+EGCG, sorprendentemente mostraron unos valores muy similares a los obtenidos en el grupo vehículo ( $1,65 \pm 0,49$  y  $1,49 \pm 0,38$  respectivamente). En cambio, los grupos MT y EGCG mostraron una tendencia a aumentar los valores de la ratio entre GSH y GSSG, con valores de  $5,19 \pm 3,29$  y  $8,40 \pm 7,18$  respectivamente. Es decir los animales pertenecientes a estos dos grupos mostraron una tendencia a menores niveles de estrés oxidativo respecto a aquellas ratas SDxLE sin tratar, aunque en ningún caso se alcanzó la significación estadística.

En la Figura 41.B se observa la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las ratas P23HxLE y las ratas de referencia SDxLE, con unos valores de  $1,29 \pm 0,32$  en el primer caso y de  $1,49 \pm 0,38$  en el segundo. Al contrario que lo que ocurría con las ratas sanas SDxLE, en las ratas P23HxLE el tratamiento doble MT+EGCG incrementó este parámetros hasta valores muy superiores a los obtenidos en el grupo vehículo ( $46,00 \pm 25,83$ ), indicando, como ya se ha mencionado previamente, una mejora estadísticamente significativa en los niveles de estrés oxidativo celular. El grupo tratado con MT también mostró tendencia a mejorar en los valores de este parámetro ( $7,89 \pm 6,56$ ), superior a la del grupo EGCG con una discreta mejoría, aunque ésta fue mucho menor que la del caso anterior. En ninguno de los dos casos se alcanzó significación estadística.



**Figura 41.** Ratio entre el GSH y el glutatión oxidado GSSG, medido en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado

## DEFENSAS ANTIOXIDANTES

### CAPACIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE

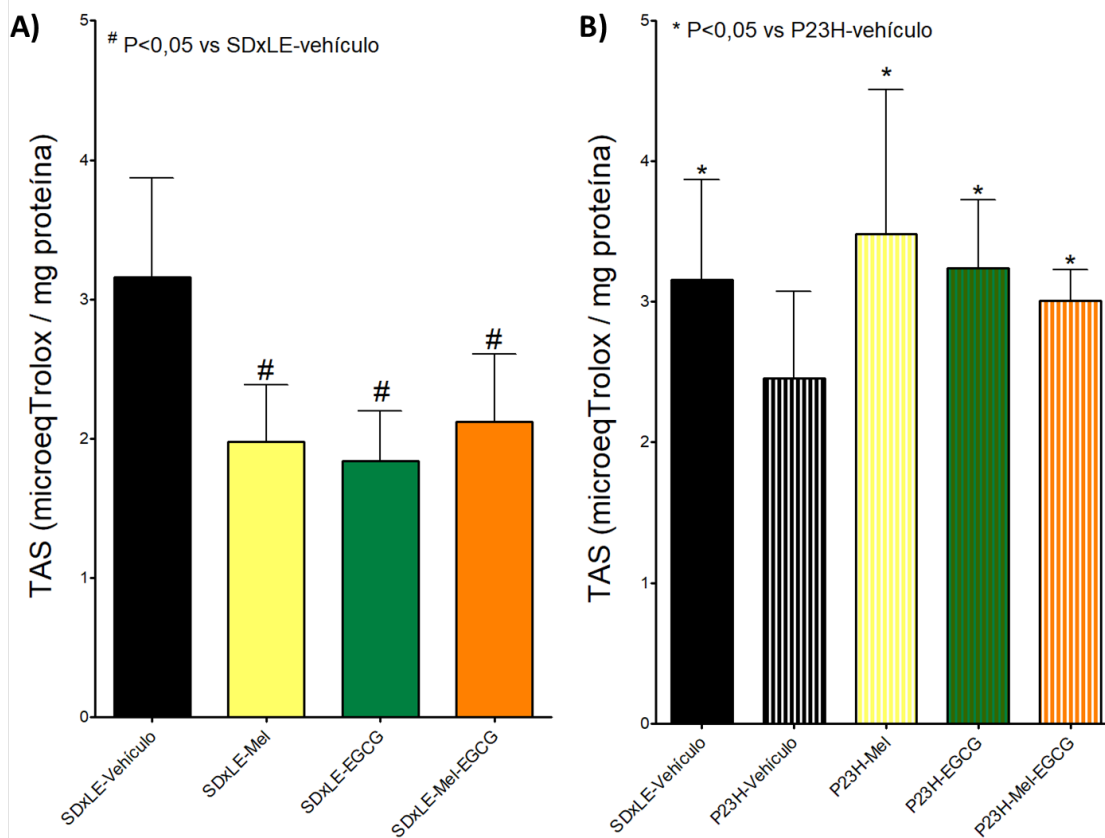
El estudio de los niveles de capacidad total antioxidante nos aporta información relativa a la capacidad o habilidad de un organismo a la hora de hacer frente a daños producidos por fuentes endógenas y exógenas sobre el mismo. Se representa en  $\mu$ moles de equivalentes Trolox/mg de proteína, siendo el Trolox la sustancia antioxidante de referencia a la hora de analizar una muestra compleja de moléculas antioxidantes.

Lo primero a destacar en la Figura 42.A es el claro descenso que se da en todos los grupos de tratamientos antioxidantes en los casos de ratas SDxLE: los valores obtenidos en el grupo vehículo fueron  $3,158 \pm 0,71$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg de proteína, mientras que el grupo MT presentó un descenso de un 37,5%, con un valor de  $1,975 \pm 0,41$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg de proteína, el grupo EGCG mostró unos valores de capacidad total antioxidante de  $1,838 \pm 0,36$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg de proteína, que se corresponde con un descenso de un 41,8% y, finalmente, el grupo MT+EGCG experimentó un descenso de un 32,9%, con unos valores de  $2,12 \pm 0,49$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg de proteína. Estos valores nos indican que individuos sanos a los cuales se les ha suplementado de forma exógena con moléculas antioxidantes, disminuyen su almacenamiento hepático de sistemas antioxidantes y por lo tanto, pierden parte de la capacidad antioxidante propia ante el suministro externo de moléculas que ejercerían su misma función. Los valores obtenidos en estos 3 grupos alcanzaron la significación estadística respecto al grupo de SDxLE no tratado.

Al comparar las ratas P23HxLE respecto al grupo de referencia SDxLE, se observa un descenso en los niveles de la capacidad total antioxidante de un 22,3% con valores de  $3,158 \pm 0,17$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg proteína en el caso de las ratas SDxLE y de  $2,45 \pm 0,62$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg proteína en el de las ratas P23HxLE. De forma contraria a lo que observábamos en las ratas sanas SDxLE tratadas con antioxidantes en la Figura 42.B se aprecia que la administración de todos los



antioxidantes utilizados para el tratamiento va a incrementar la capacidad total antioxidante de estos animales: MT fue la molécula que consiguió una mayor mejoría, con un incremento de los valores de un 42% ( $3,483 \pm 1,02$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg proteína), seguido por el grupo tratado con EGCG, que incrementó sus niveles en un 32% respecto a las ratas P23HxLE tratadas con vehículo, con unos valores de  $3,24 \pm 0,49$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg proteína. En contra de lo esperado, el último grupo de ratas P23HxLE con la administración de la doble terapia antioxidante, MT+EGCG es el que presentó una menor mejoría, con unos niveles un 22,6% más altos ( $3,008 \pm 0,22$   $\mu$ equivalentes Trolox/mg proteína). Todos estos valores fueron estadísticamente significativos. Los resultados son un indicativo de que el suplemento con los antioxidantes en modelos degenerativos sometidos a estrés oxidativo, aporta al organismo mecanismos para hacer frente al aumento de este estrés que se experimenta en enfermedades neurodegenerativas.



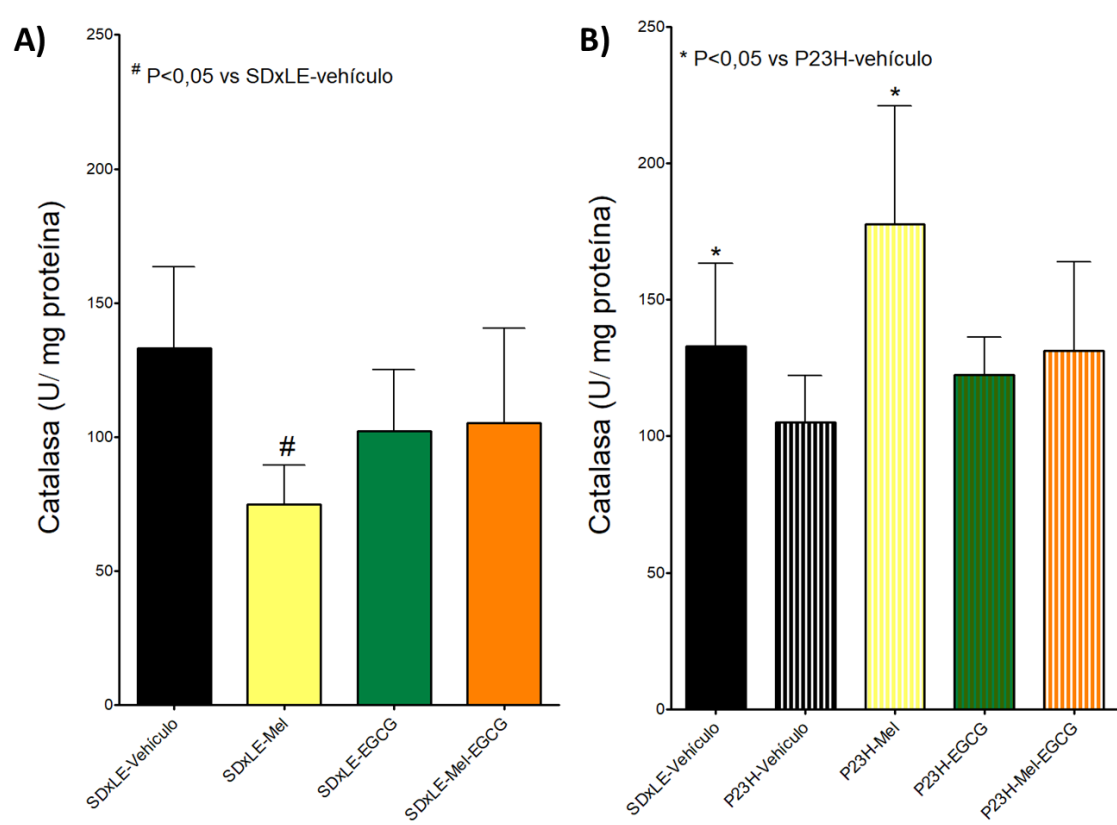
**Figura 42.** Niveles de capacidad total antioxidante en microequivalentes Trolox/mg de proteína, medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo). TAS: capacidad total antioxidante

## CATALASA

La CAT es una enzima responsable de catalizar la reacción de descomposición del radical libre  $H_2O_2$ , en dos componentes más inocuos, el  $O_2$  y el  $H_2O$ . Se representan los niveles de CAT en la figura como U/mg de proteína, siendo 1 U la actividad catalítica responsable de la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. En la Figura 43.A se muestra como el grupo de ratas SDxLE tratado con MT, al igual que en el caso de la capacidad total antioxidante, produce la mayor reducción en los niveles de esta enzima, un 43,9%, siendo los valores de  $133,1 \pm 30,35$  U/mg de proteína en el grupo de los animales SDxLE sin tratar y de  $74,7 \pm 14,8$ U/mg de proteína en el grupo MT. El tratamiento combinado MT+EGCG también mostró una tendencia a disminuir los niveles de actividad de la catalasa en un 36,6% respecto a los animales sin

tratamiento ( $105,3 \pm 35,3$  U/mg de proteína), y el grupo EGCG, que presentó valores de actividad de  $102,2 \pm 22,9$  U/mg proteína, aunque las diferencias con estos dos últimos tratamientos no alcanzaron significación estadística.

La Figura 43.B muestra el descenso en los niveles de actividad de la enzima CAT en las ratas P23HxLE respecto al grupo de ratas de referencia SDxLE, indicando una menor capacidad de las P23HxLE para hacer frente al daño oxidativo producido por el  $H_2O_2$  (un porcentaje de un 21,1%, con valores de  $133,1 \pm 30,35$  U/mg de proteína para las ratas SDxLE y de  $105 \pm 17,2$  U/mg proteína para las P23HxLE). Al igual que en la medida de capacidad total antioxidante MT era el tratamiento con un mayor poder de mejora para el estado antioxidante de los animales P23HxLE, en lo que respecta a los niveles de actividad de CAT, su administración supuso un incremento en la concentración de actividad enzimática de un 40,9%, alcanzando valores de  $177,7 \pm 43,13$  U/mg de proteína. El resto de tratamientos, tanto el grupo EGCG como el tratamiento doble con MT+EGCG, mostraron tendencia a mejorar en los niveles hepáticos de CAT, con unos niveles de  $122,4 \pm 13,95$  U/mg de proteína en el primer grupo y de  $131,3 \pm 32,55$  U/mg de proteína en el grupo MT+EGCG (éstos se corresponden con un incremento de un 14,2% y 20% respectivamente), pero estas diferencias no fueron significativas.



**Figura 43.** Niveles de la actividad de la enzima catalasa en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).

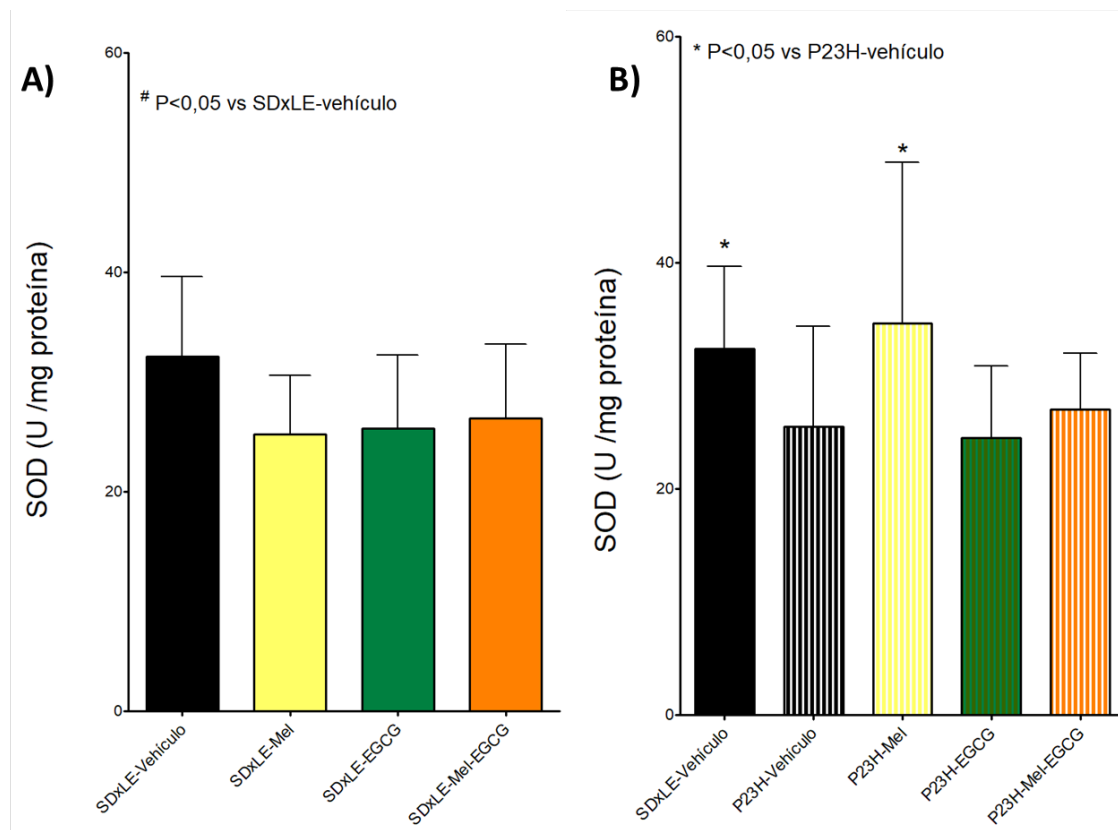
## SUPERÓXIDO DISMUTASA

La enzima SOD es responsable de la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Como los niveles de la enzima CAT, en la Figura 44 se representa la actividad enzimática específica de la SOD en U/mg de proteína en los distintos grupos de tratamiento.

En la Figura 44.A que muestra las diferencias obtenidas entre los tratamientos en las ratas SDxLE, podemos observar que no existió ninguna variación estadísticamente significativa en los niveles de actividad específica de esta enzima entre los distintos grupos. Mientras que en el grupo sin tratamiento, los niveles de actividad de la SOD fueron de  $32,35 \pm 7,29$  U/mg de proteína, en el grupo MT fueron de  $25,25 \pm 5,38$  U/mg de proteína, en el grupo EGCG,  $25,81 \pm 6,65$  U/mg de proteína y

el grupo con el tratamiento combinado MT+EGCG, alcanzó unos valores de  $26,71 \pm 6,78$  U/mg de proteína. Estos valores corresponden con descenso de la actividad de un 21,9%, 22,9% y 17,4% respectivamente, aunque sin llegar a tener diferencias significativas.

En los grupos de animales P23HxLE, al igual que ocurría con la CAT y con la capacidad total antioxidante previamente comentadas, el grupo MT incrementó los niveles de la enzima SOD de forma estadísticamente significativa con los siguientes valores: en el caso del grupo P23HxLE vehículo, de  $25,49 \pm 8,9$  U/mg proteína y P23HxLE con MT de  $34,6 \pm 14,3$  U/mg proteína. La MT incrementó un 26,3% la actividad específica de la SOD en el tejido hepático de estos animales. Esto además se complementa con el hecho de que, en estos mismo animales, también se haya visto incrementada la actividad de la CAT: la reacción catalizada por la SOD produce  $H_2O_2$ , el cual a su vez va a ser metabolizado por la CAT en  $O_2$  y  $H_2O$ ; el grupo de ratas P23HxLE MT presentan una mayor capacidad de hacer frente al daño por RL debido a que dos de las principales enzimas antioxidantes del organismo, CAT y SOD presentaban niveles más altos que aquellos animales no tratados. Los otros dos tratamientos (EGCG y MT+EGCG) no lograron mejoría respecto a los animales no tratados, con valores de  $24,51 \pm 6,4$  U/mg proteína en el EGCG y  $27 \pm 5$  U/mg proteína en MT+EGCG.



**Figura 44.** Niveles de actividad de la enzima SOD en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento.

Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).

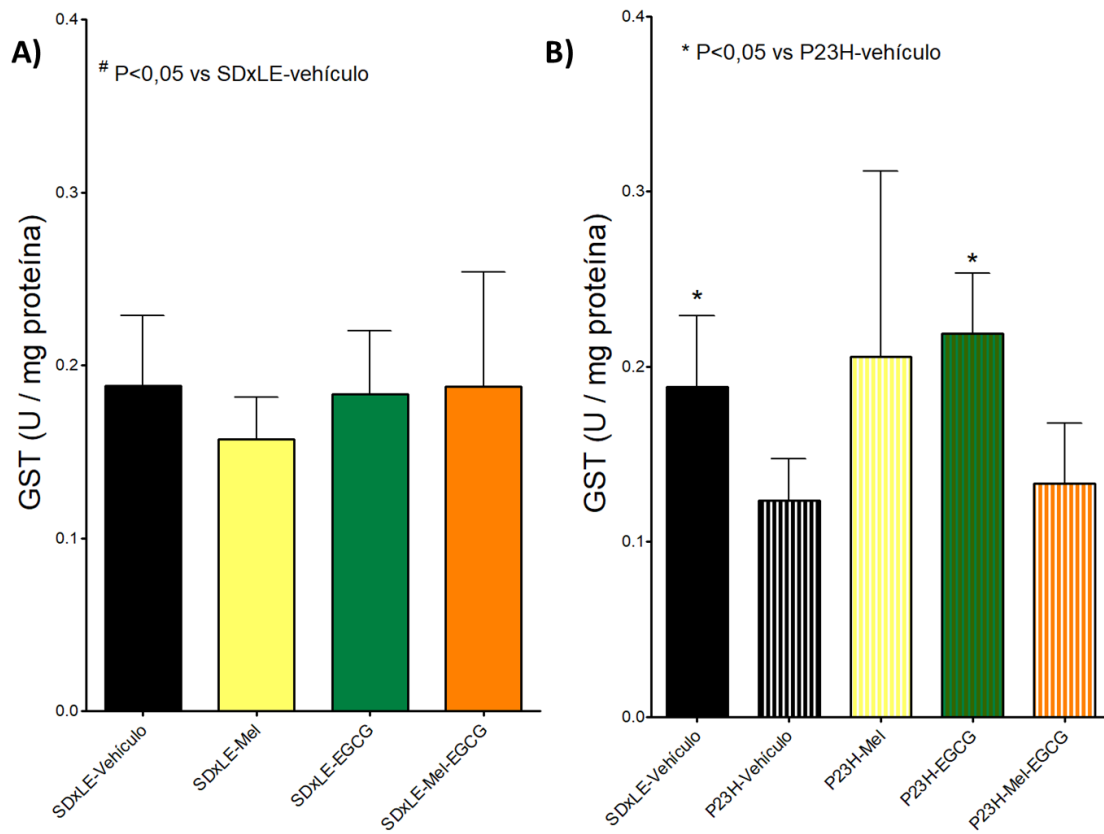
## GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Esta es una de las principales enzimas de detoxificación de sustancias xenobióticas que encontramos en el organismo. Al igual que con las otras enzimas, en la Figura 45 se ha representado su actividad específica como U/mg de proteína, y se ha enfrentado a todos los grupos de tratamiento.

En el caso de las ratas SDxLE, a pesar de que MT presentaba cierta tendencia a disminuir los niveles enzimáticos ( $0,1574 \pm 0,02$  U/mg de proteína, que se corresponde con un 16,41% de disminución), no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, ni con su administración ni con el resto de moléculas antioxidantes: en el grupo EGCG los valores alcanzados fueron de  $0,1834 \pm 0,04$  U/mg de proteína y el grupo MT+EGCG presentó valores de actividad de la GST de  $0,1878 \pm 0,07$  U/mg de

proteína. Niveles elevados de GST ayudarían al organismo a hacer frente a los efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos que presentan los xenobióticos, y otras moléculas de carácter electrofílico sobre las que esta enzima puede actuar como son los lípidos peroxidados. Al encontrarse en un estado de salud correcto, estos animales no deberían tener problemas en detoxificarlas y eliminarlas del organismo.

Otro caso distinto es el de las ratas P23HxLE: si comparamos los niveles de actividad enzimática de la GST de estos animales con los de las ratas de referencia SDxLE vehículo, que fueron  $0,1883 \pm 0,041$  U/mg de proteína, observamos valores de  $0,1235 \pm 0,02$  U/mg de proteína, es decir, presentaban unos niveles un 34,4% inferiores, lo cual indica su menor capacidad para defenderse de agentes dañinos para el propio organismo. Bajo esta premisa inicial, es importante destacar que el grupo de ratas P23xLE tratadas con EGCG, vio incrementados sus niveles de GST a  $0,2188 \pm 0,03$  U/mg de proteína, siendo valores un 43,56% superiores a las del grupo vehículo. MT también presentó una tendencia a mejorar los niveles con unos valores de  $0,21 \pm 0,11$  U/mg proteína respecto al grupo sin tratamiento, que presentaba una actividad específica de  $0,12 \pm 0,024$  U/mg proteína, pero sin ser una mejora estadísticamente significativa. A pesar de que MT y EGCG administrados de forma individual supusieron una mejoría de los niveles de la actividad de GST para las ratas P23HxLE, cuando son administradas de forma conjunta en el grupo MT+EGCG, prácticamente no existieron modificaciones en los valores obtenidos.



**Figura 45.** Niveles de actividad de la enzima Glutatión S-transferasa en U/mg de proteínas medidos en el tejido hepático de ratas Sprague-Dawley x Long Evans (SDxLE) (A) y transgénicas P23H x Long Evans (P23HxLE) (B) en los distintos grupos de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=5 por grupo).



**DISCUSIÓN**



Existen multitud de patologías de la visión que se diferencian entre ellas en el lugar del globo ocular o el tejido que se ve afectado, mostrando sintomatologías muy diversas y en muchas de las cuales no existe un tratamiento efectivo. La retina es el tejido neural que recubre la parte interna del polo posterior del ojo y sobre el que se proyecta la imagen del objeto que estamos enfocando que, tras sufrir una serie de modificaciones que conviertan la información en una señal eléctrica, alcanzará el cerebro para formar una imagen que podamos interpretar y ver. La retina es una estructura altamente especializada, formada por una compleja red de neuronas, células gliales y vasos sanguíneos. Todos estos componentes pueden sufrir mutaciones o verse afectados por diversas lesiones que producirán distintos problemas visuales y parte de los cuales finalizarán con ceguera para el paciente que las sufre. Los fotorreceptores a nivel retiniano tienen una distribución específica, encontrando una zona rica en conos, más especializadas en la visión del detalle y en condiciones de luminosidad (retina central) y conforme nos alejamos de la mácula aumenta el número de bastones, que nos permiten la visión en condiciones de oscuridad y la visión periférica. La retina es un órgano de alta complejidad, con multitud de tipos celulares y redes sinápticas, de modo que su estudio *in vitro* se limita a la utilización de tipos celulares, líneas inmortalizadas o células madre embrionarias o pluripotenciales inducidas diferenciadas a distintos tipos celulares oculares. Por estas dificultades y la necesidad de tener un modelo similar a determinadas patologías oftalmológicas se han creado numerosos modelos animales, bien espontáneos, inducidos por tóxicos o luz, genéticamente modificados, etc. que se han estado utilizando durante años en investigación, con el fin de obtener avances en el tratamiento de las patologías oculares (394-396).

En las degeneraciones retinianas se produce una afectación inicial de un tipo celular, fotorreceptores, EPR, células de Müller... que se ha demostrado ya en numerosas investigaciones que desemboca en una remodelación neuronal progresiva, proceso que consiste en una reprogramación gradual a nivel molecular, funcional y morfológica de todos los componentes retinianos. Este proceso no debe ser entendido como un intento para producir nuevas células que sustituyan las afectadas o muertas, ni un crecimiento de sus procesos axonales, sino como unas modificaciones causadas

por la nueva situación que va surgiendo en el tejido: inflamación local, pérdida de la conexión sináptica con los fotorreceptores... (397). La RP es una enfermedad genéticamente heredada y que se caracteriza por este mismo proceso: una afectación inicial de los fotorreceptores habitualmente (aunque puede originarse en otro tipo celular) que desembocan en una remodelación y desorganización de todas las capas de la retina. Esta enfermedad presenta numerosas formas de herencia (adRP, arRP y XIRP) y multitud de genes que pueden verse afectados (se han detectado más de 100 genes relacionado con esta enfermedad, y más de 3.100 mutaciones que pueden causarla, sin incluir al menos otras 1.200 mutaciones responsables de las formas sindrómicas, como el síndrome de Usher y el síndrome de Bardet-Bield) (99).

Una de las mutaciones más frecuentes cuando hablamos de adRP, sobre todo en EEUU, donde alcanza aproximadamente un tercio de los casos diagnosticados, es aquella causada por la sustitución de una prolina por una histidina en posición 23, debido a lo cual se han creado modelos animales para estudiar esta forma de la enfermedad, entre ellos, la rata P23H. Como se ha comentado previamente, es posible obtener líneas heterocigotas de este modelo animales, cruzando las ratas P23H homocigota con ratas albinas SD, base genética del modelo animal. La principal diferencia entre trabajar con una línea en homocigosis y una en heterocigosis estriba en que las primeras sufren una degeneración mucho más rápida que las segundas, siendo la pérdida de fotorreceptores a P30 del 60% y del 40% respectivamente (367). Se ha postulado que esta diferencia en la expresión, no exactamente la mitad en heterocigosis con respecto a homocigosis, puede deberse a un silenciamiento en la expresión del transgen debido a las repeticiones en tándem de copias múltiples del mismo transgen. Además hay que tener en cuenta que el lugar de inserción tiene gran importancia debido a que la estructura de la cromatina también influiría en la expresión del transgen (398). Al decidir cruzar la rata P23H homocigota con una rata WT como la rata LE obtuvimos otra diferencia añadida, ya que el resultado es una rata P23H heterocigota pigmentada, la cual nos permite realizar pruebas funcionales que, utilizando el modelo albino, no sería posible, como por ejemplo el análisis de la SC. Además, estos animales presentan una mayor sensibilidad al daño inducido por luz que las líneas pigmentadas y es el modelo más similar a los enfermos de RP (399).

A la hora de plantear este experimento se escogió la línea 1 de la rata P23H ya que experimenta una degeneración más rápida: se detectan los primeros signos de degeneración a P10, con un mayor número de núcleos picnóticos en la CNE; a P15 el grosor de esta capa se corresponde con el 76% del espesor en una rata SD y los SE y SI de los fotorreceptores son de menor longitud. Conforme avanza la enfermedad, se observa una mayor cantidad de núcleos picnóticos, un acortamiento cada vez más marcado de los SE y SI, hasta que finalmente permanece algún cono y al final se pierde la CNE; también es característica la presencia de microglía activada a nivel de la CPE, CNE, CNI y CPI (400, 401). En los estadios más avanzados de la enfermedad, la retina se caracteriza por presentar un proceso de remodelación general junto a la creación de nuevos circuitos neuronales: las células del EPR migran hacia la retina, en ocasiones junto a vasos coroideos desplazando las células de la CNI. El proceso de remodelación retiniana se produce de forma complementaria a la degeneración de la misma, dando lugar a multitud de cambios a nivel molecular que desembocan en modificaciones morfológicas y funcionales de todas las células de la retina y que tienen como resultado una retina estructuralmente diferente y disfuncional (36).

La valoración de la AV es una de las pruebas de análisis funcional de la visión más utilizadas en la clínica humana: se basa en la capacidad del sistema visual para discriminar entre dos estímulos separados en el espacio, con un alto contraste en relación con el fondo. El mínimo ángulo de resolución que va a permitir a nuestro sistema óptico identificar dos puntos e interpretarlos como estímulos separados e independientes se define como el umbral de resolución,; matemáticamente la AV se define como el inverso del ángulo con el que se resuelve el objeto más pequeño que podemos identificar:  $AV=1/\text{ángulo de resolución}$  (402). El estudio de la AV en pacientes con problemas de visión nos va a aportar información sobre la función visual, fundamental para conocer características de la enfermedad. El sistema optomotor está basado en el nistagmus optocinético, utilizado para valorar la AV en niños preverbales: hace mucho años se comprobó que los niños recién nacidos presentaban una respuesta optocinética innata ante patrones de rayas en movimiento y ante patrones de columnas iluminadas de forma estroboscópica, las cuales simulaban un movimiento de rotación. Los niños se colocaban en el interior de un cilindro, dispuestos sobre una

especie de cama, con sus ojos aproximadamente en el centro del cilindro, para que la distancia fuese equidistante a todos los puntos; el observador tenía que ser capaz de determinar la dirección de "rotación" de las barras en función del movimiento ocular de los niños (403). El nistagmus optocinético sigue utilizándose en el tambor de Barani, utilizando un tambor con bandas verticales alternas blancas y negras y que se hace girar hacia derecha e izquierda: si la AV del niño le permite ver las bandas, se detectará el movimiento de sus ojos. Existen variantes de este tambor en los cuales se sustituyen las bandas por dibujos, en el caso de que los niños sean más pequeños.

Otra de las características a tener en cuenta al estudiar la función visual de una persona es la SC, es decir, el mínimo contraste que se necesita para detectar estímulos distintos a diferentes frecuencias espaciales. Es frecuente la afectación de la SC en múltiples patologías tanto retinianas como neurooftalmológicas, a pesar de lo cual, no siempre la SC entra dentro de la batería de pruebas que se realiza a los enfermos de modo rutinario. Este test es una herramienta complementaria a la anterior en la función visual junto a otras, imprescindible en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades oculares (404).

El test optomotor en roedores nos va a permitir obtener información de ambos parámetros en un tiempo relativamente corto de estudio (368). Como hemos comentado la valoración de la AV y SC en roedores es más sencillo en los modelos pigmentados, que tienen una mayor AV que los animales albinos, además de que las alteraciones de conexiones a nivel interhemisférico en animales albinos dificultaría el reconocimiento de la respuesta ya que no muestran una respuesta clara ante los diferentes estímulos. Ya se ha probado la eficacia de este método de análisis previamente tanto en modelos animales de la enfermedad RP (49, 405), como en otras (406, 407) mostrándose como un modelo de alta utilidad par la valoración funcional.

Se determinó la AV de ambos ojos en sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario. Tal como está descrito en trabajos previos, en el grupo de ratas P23H pigmentadas, los valores de AV disminuyeron paralelos a la degeneración, en los animales sin tratamiento complementario, siendo su valor obtenido tras 6 meses de seguimiento 0,458 ciclos/°. Si lo comparamos con el valor obtenido tras el mismo

tiempo en el grupo de las ratas sanas también pigmentadas, SDxLE, 0,568 ciclos/°, podemos observar cómo la degeneración de los fotorreceptores, propia de esta enfermedad, hace que la AV disminuya con la progresión de la enfermedad, produciendo una afectación de uno de los parámetros de la función visual que hemos analizado. Estos valores implican que este modelo animal con RP, presenta una pérdida aproximada del 20% de su AV en el tiempo de 6 meses. Como cabía esperar, la AV fue significativamente inferior en el caso de los animales P23HxLE en comparación con las SDxLE a todas las edades, aunque dentro del grupo de animales de referencia se observa una ligera mejoría con la edad debido probablemente al aprendizaje de los animales que no se ve en el grupo P23HxLE sin tratamiento donde la AV empeora con la edad (49, 408). Aun así debemos tener en cuenta que la AV es un parámetro fundamental en las retinas de animales diurnos, con una zona de predominio de conos, que en el caso de los humanos y otros primates es la mácula. Los conos son los encargados de la discriminación visual, careciendo la retina de los roedores de esta zona rica en conos, y este predominio de bastones hace que sean animales nocturnos y con una AV baja.

La administración de los 3 tratamientos, MT, EGCG y la combinación de ambos, consiguieron, tanto en el grupo de animales afectados por la mutación como en los animales de referencia, mantener la AV con incluso discretas mejorías con la edad, probablemente potenciando el efecto aprendizaje. Melatonina es una molécula con conocidas propiedades neuroprotectoras y cuya capacidad se ha demostrado en numerosos sistemas y modelos. Además de ser sintetizada a nivel de la glándula pineal, también es biosintetizada por la retina, donde actúa como neuromodulador. Aunque no se conocen todos sus mecanismos de acción, se ha visto que su administración aporta beneficios en modelos animales de enfermedades oculares como la coriorretinopatía serosa central (409), DMAE (410) o el glaucoma (411). En alguno de estos estudios se ha observado que pacientes a los cuales se les ha complementado en la dieta con melatonina han obtenido mejoras en sus valores de AV tras un tiempo de tratamiento o al menos han impedido la progresión de la enfermedad (412). Hasta nuestro conocimiento, el estudio que aquí presentamos es el primero en demostrar una mejoría con la administración de melatonina en el

parámetro de AV en un modelo animal de esta enfermedad. Melatonina es capaz de ejercer su acción antioxidante actuando sobre moléculas sensibles a la afectación por RL como los lípidos peroxidados, disminuyendo sus niveles e incrementando los sistemas antioxidantes, permitiendo al organismo hacer frente al progreso de la enfermedad.

El EGCG es un polifenol presente en grandes cantidades en el té verde y con conocidas propiedades beneficiosas para la salud, entre las cuales hay que destacar su poderosa actividad antioxidante. Debido a su bajo peso molecular y su carácter hidrofílico, es capaz de atravesar la barrera hematorretiniana y alcanzar los distintos compartimentos del globo ocular, alcanzando los tejidos intraoculares como la retina, para ejercer su acción (339).

Se ha observado una elevada producción de RL, no sólo en pacientes y modelos animales afectados por diferentes enfermedades, sino que también es un rasgo característico del envejecimiento. La administración de las moléculas de estudio a las ratas sanas SDxLE, demuestra el efecto positivo de estos antioxidantes sobre el daño que producen las EROs y ERNs en la retina con el paso del tiempo, mejorando los valores de VA sobre aquellos animales que no recibían ningún tratamiento. Debemos tener en cuenta el papel que puede tener además el cruce de ratas albinas con pigmentadas, ya que el albinismo es una causa añadida de disminución de AV, además de aumentar el estrés oxidativo de la retina por la disminución de la melanina a nivel de EPR que le puede hacer más susceptible al daño de las radiaciones UV: la melanina regula la homeostasis de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los melanocitos, y se ha observado una ausencia de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del EPR en ratones albinos, al contrario que lo que ocurre en líneas pigmentadas, lo cual alteraría las uniones estrechas existentes entre las células y por lo tanto, alterando sus funciones e integridad (413-415).

Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas al comparar los valores de SC obtenidos en las ratas P23HxLE y las SDxLE no tratadas a P180, debido a un empeoramiento en la SC de las ratas SDxLE a partir de P90. Sin embargo, si las hubo en edades tempranas, lo cual puede ser debido a una afectación de las células ganglionares que se produce con la edad, y equipararía a P180 los valores de SC



obtenidos en las ratas SDxLE con las ratas P23HxLE (416, 417). A lo largo del tiempo se han realizado estudios en los cuales se ha tratado de analizar el efecto de la edad sobre el parámetro de SC; Elliot y cols. (418) ya demostraron en 1987 el importante papel que tienen la afectación neural y retiniana que se produce con la edad con los cambios producidos en la SC (419). Tanto en las ratas P23HxLE como en las SDxLE se observa un claro incremento de los valores de SC tras la administración de EGCG y del tratamiento combinado, pero aunque se ve una tendencia a la mejora, el tratamiento con MT solo no alcanza diferencia significativa respecto al vehículo. Ha sido demostrado ampliamente el descenso en los niveles de MT que se desencadena con la edad y en enfermedades neurodegenerativas (285, 410, 420, 421). Ésto, junto a unos niveles superiores de RL, favorecería la pérdida de células a nivel retiniano: cabría pensar que el suplemento con MT reduciría los niveles de EROs gracias a su actividad antioxidante (422, 423), retrasando la afectación retiniana y por lo tanto, mejorando el parámetro de función visual, la SC. El EGCG también ha demostrado ser capaz de actuar sobre distintos tipos celulares, reduciendo los niveles de RL presentes en la retina (363, 424). No ha sido posible encontrar estudios en los cuales se determine la acción de sustancias antioxidantes sobre la SC, aunque sí se han analizado sobre otros parámetros visuales como la amplitud de la onda b obtenida en el ERG, o por estudios inmunocitoquímicos, sustancias como el ácido taurodeoxicólico (425), por lo tanto en este estudio mostramos por primera vez que el tratamiento con EGCG o EGCG+MT mejora la SC tanto en animales modelo de RP como en animales de referencia con la edad.

El ERG es otra técnica de valoración funcional que nos permite apreciar cambios electrofisiológicos previos a su manifestación en el sistema OptoMotry. El ERG Ganzfeld nos ofrece resultados sobre la función de la retina en su totalidad, a diferencia de otros ERG como el multifocal. La onda a, reflejo de la función de los fotorreceptores, y obtenida tras una adaptación a la luz, es decir, bajo condiciones escotópicas, fue el parámetro más afectado en los animales enfermos, ya que es representativo de la función de los fotorreceptores, principales células afectadas en la RP. A P180 se puede observar que, mientras que el grupo de animales control presentaban valores de amplitud de 397,3 $\mu$ V con una intensidad de estímulo de 2,85

cd's/m<sup>2</sup>, el grupo de ratas P23H sin tratamiento presentaba unos valores de 49,84  $\mu$ V, aproximadamente el 12% de la obtenida en las ratas sanas, mostrando claramente del estado en el que se encuentran los fotorreceptores y sobre todo la pérdida extensa de bastones en esta edad (367, 426). Ninguno de los tratamientos antioxidantes consiguió mejorar la función del ERG, quedando el doble tratamiento antioxidante como el que presentó la media más alta que consiguió un valor de apenas 57,9  $\mu$ V al estímulo de 2,85 cd's/m<sup>2</sup>, respecto al del grupo sin tratar, que presentaba un valor de 49,8  $\mu$ V. De forma totalmente opuesta, en el caso de los animales SDxLE, los 3 grupos a los cuales se les administró algún tratamiento, finalizaron el estudio con valores superiores al grupo de referencia.

Cuando hay pérdida funcional a nivel del ERG, independientemente de los tratamientos utilizados, tanto médicos como celulares etc, se consiguen mejorías en el ERG (425, 427, 428) habitualmente de corta duración, siendo pocos los tratamientos que consiguen mantener valores después de 6 meses de seguimiento (429, 430). Lavoie y cols. (431) demostraron en un estudio realizado sobre perros Beagle sanos que, la administración durante el día de melatonina reducía la amplitud de las ondas a y b obtenidas en el ERG, demostrando por un lado, que la suplementación oral permitía que esta molécula alcanzase la retina y, por otro lado, sugiriendo que la ingesta de ésta durante el día inhibiría la liberación de dopamina, disminuyendo la aportación de los conos sobre la onda obtenida. Sin embargo, en nuestro estudio es necesario destacar dos diferencias significativas respecto a este experimento: en primer lugar, nuestro grupo administró de forma continua melatonina, tanto de día como de noche, durante 6 meses, y en segundo lugar, las ratas son animales nocturnos, a diferencia de los perros, con una mayor ingesta de comida y bebida durante la noche, por lo que la explicación aportada relativa a la dopamina, en nuestro caso no aplicaría, ya que se han demostrado múltiples diferencias en cuanto a la liberación de neurotransmisores y hormonas como el GABA, melatonina, la dopamina, la leptina... cuando comparamos animales diurnos y nocturnos (432). Combinar melatonina con el EGCG, o administrar este último de forma independiente obtuvo mejoras en cuanto a la amplitud de la onda a estadísticamente significativas a prácticamente todas las intensidades de estímulos aplicadas. No se han encontrado

estudios en los que se haya estudiado el efecto de esta catequina sobre el ERG de ratas sanas, sin embargo si existen estudios de ratas con afectación ocular como por ejemplo la isquemia, causada por un incremento de la presión ocular a nivel de la cámara anterior debido a la inserción de una aguja en este lugar; a estos animales se les administraba el EGCG a una concentración de 0,5% en el agua de bebida, y tras 3 días se analizó el estado del ojo, y se comparó con el contralateral: los animales tratados con EGCG presentaban una mejoría en las amplitudes tanto de la onda a como la b, además de demostrar que era capaz de alcanzar de forma efectiva la retina, disminuyendo la tasa de apoptosis de las células retinianas ganglionares, causada por la isquemia (433).

La amplitud de la onda b fue significativamente menor en el modelo animal de la RP, indicativo la existencia de una alteración a nivel de las células bipolares de la retina a la edad de estudio, por la degeneración producida por la enfermedad. El tratamiento con melatonina y EGCG o únicamente con éste último produjo mejorías significativas al analizar este parámetro. Qi y cols. (434) demostraron el poder de esta catequina administrándola en un modelo animal con degeneración retiniana por luz: en estos animales se observó una preservación de la función visual, analizando la amplitud de las ondas obtenidas mediante ERG, gracias a su poderosa capacidad antioxidante y eliminadora de RL, que incrementó los niveles de ARNm de la enzima SOD, disminuyendo de esta forma la muerte celular derivada de los RL. También hay estudios que han demostrado que el receptor de la laminina de 67kDa (67LR) posee en su superficie receptores a los cuales puede unirse el EGCG para ejercer su acción disminuyendo la expresión de factores de transcripción que disminuyan el estado inflamatorio (435), proceso que se ha visto en numerosas enfermedades oculares y que favorece el progreso de las mismas (436, 437), entre otras cosas, por la activación de la microglia.

Gracias al protocolo de doble flash, pudimos estudiar la aportación de los conos a la onda b en condiciones escotópicas, saturando los bastones gracias a un primer flash de intensidad  $1,4 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , al cual le sigue un segundo flash (con una diferencia de 1 segundo entre ellos), al cual sólo los conos son capaces de responder. La

información obtenida gracias a esta prueba es un reflejo de lo visto tras el análisis de la amplitud de la onda b: las ratas P23HxLE presentan una menor respuesta a los distintos estímulos por parte de los fotorreceptores debido a la progresión de 6 meses, edad a la que se realizó el ERG. Además, en todos los grupos se puede observar la misma aportación a la onda b por parte de los conos y los bastones, de lo cual podemos extraer que la enfermedad ha progresado hasta tal punto que la apoptosis experimentada por los bastones ya ha alcanzado a los conos, los cuales también han sufrido un proceso de degeneración y apoptosis. Existen varias hipótesis que tratan de explicar este hecho, ninguna de ellas excluyente a las otras: por un lado existen evidencias de que los bastones secretan un factor de crecimiento imprescindible para la supervivencia de los conos, RdCGF (438) por lo que, al morir, los conos acusan su falta y empiezan a degenerar. Por otro lado se ha detectado un incremento de los niveles de  $O_2$  en la capa de los fotorreceptores, tras la muerte de los bastones y que a esos niveles sería tóxico para la retina externa (439). Este  $O_2$  además, incrementaría los niveles de producción de RL, con lo cual, los niveles de estrés oxidativo serían tan elevados que afectarían a los conos y el resto de células retinianas, causando su muerte (440). En este protocolo de doble flash, la intensidad del estímulo fue de  $1,4 \log \text{cd.s/m}^2$  y a esta intensidad los tratamientos administrados no fueron capaces de detener el efecto deletéreo secundario a la pérdida de los bastones, con una pérdida progresiva e irremediable de los conos y por tanto, pérdida de la visión central en los humanos. Sin embargo, en el análisis de la onda b, con intensidades de estímulo superiores sí se ve una mejora con el tratamiento de EGCG solo o combinado con MT, por lo que no se puede descartar que a intensidades superiores de estímulo pudieran estar diferenciándose la aportación de los conos y bastones entre los tratamientos y el vehículo.

Resumiendo nuestros hallazgos funcionales podemos determinar que, como estaba previsto y descrito en numerosos trabajos en la literatura (367, 398, 400, 441, 442) existe una clara relación entre la pérdida de la función visual y la degeneración de la retina debida a la progresión de la enfermedad. Se observaron diferencias entre las ratas P23H y animales sanos desde el primer registro, a P30, en el parámetro de la AV, indicativo de que la afectación de los fotorreceptores por la mutación comienza a

edades tempranas. A pesar de esto, a la última medida realizada, a P180 todavía se obtuvieron valores que permitían a las ratas mantener el movimiento optoquinético ante el estímulo presentado. Si además combinamos esto con el hecho de que en edades tempranas se vio mayor afectación de la SC en las ratas P23H, aunque niveles similares a P180, podemos concluir que la línea P23H (línea 1) pigmentada heterocigota, aunque experimenta una progresión degenerativa en los fotorreceptores debido a la mutación en el gen de la rodopsina, ésta es capaz de mantener una AV y SC durante un periodo relativamente largo de su vida, siendo menos agresiva y más lenta que como cuando se da en estudios realizados en ratas en homocigosis o albinas, de forma semejante a lo que ocurre en los humanos (443). Volvemos a tener en cuenta que las ratas son animales nocturnos, con una retina rica en bastones y pobre en conos, y que la AV es una medida preferentemente de la función de los conos pero estos animales son capaces de seguir durante tiempo las líneas del sistema optomotor (444).

La administración de MT y EGCG reporta mejorías, de forma general, para la función visual de los animales transgénicos. En el caso de las ratas SDxLE, este mismo tratamiento antioxidante, retrasa la pérdida de visión relativa a la edad que se produce o que puede estar relacionada con el cruce de una rata pigmentada con una albina, pudiendo considerarse un buen complemento para el mantenimiento visual durante el proceso del envejecimiento.

Dentro de las funciones no visuales de la retina se incluye la sincronización de ritmos circadianos. El sistema circadiano se encuentra en todos los organismos vivos y permite percibir y predecir cambios en el medio ambiente para poder anticiparnos a ellos, de forma fisiológica (respuesta adaptativa al ambiente). Este sistema biológico, regulado por un reloj interno, puede experimentar cambios en función de las señales que reciba de sincronizadores exógenos o *zeitgebers*. Al igual que ocurre con el resto de órganos, este sistema experimenta un proceso de maduración, que finaliza en la edad adulta, y posteriormente un envejecimiento del mismo. La luz alcanza la retina y envía la señal a través del tracto retino-hipotalámico hasta el NSQ, donde se regula la síntesis de melatonina, la cual es la responsable de la sincronización del ritmo

circadiano central y el resto de ritmos periféricos que encontramos en órganos como los riñones, el intestino, hígado...(445)

En ausencia de luz, el sistema circadiano pierde esta regulación con el exterior y adquiere un ritmo propio, que no tiene por qué coincidir con el período de 24 horas medioambiental de día/noche. Esto es lo que ocurre en muchos casos de ceguera: se han detectado numerosos problemas de sueño en personas con afectación de la vista, aunque éstos dependerán de la severidad de la enfermedad, ya que si todavía son capaces de percibir la luz, esta desincronización de los ritmos no será tan grave. Se estima que más de la mitad de las personas ciegas presentan unos ritmos circadianos independientes del ritmo ambiental, lo cual conlleva numerosos problemas de insomnio nocturno, somnolencia durante las horas del día, entre otros (446, 447).

En la RP, se produce una afectación de los fotorreceptores, que progresa hasta afectar a todos los tipos celulares retinianos. Existe un tipo de ipCGR, y que forman parte de esta regulación de los ritmos circadianos, por lo que su afectación en estadios tardíos de la enfermedad desembocará en ciertos problemas: se ha observado que ratones con afectación a nivel de conos y bastones son capaces de mantener el ritmo circadiano según el ciclo de luz y oscuridad ambiental, mientras que ratones que también presentan las ipCGR afectadas carecen tanto de esta regulación del sistema circadiano como de ciertas funciones no visuales (448). Conforme la RP progresa se produce una pérdida progresiva de la densidad, integridad y arborización dendrítica de las ipCGR (449). Una de las funciones no visuales en las que participan las ipCGR es el reflejo pupilar, el cual controla la cantidad de luz que alcanza la retina: la pérdida del control de esta función llevaría aparejada un descenso en la producción de melatonina retiniana (450), lo cual a su vez, llevará a alteraciones fisiológicas de la retina, ya que participa en procesos como la activación del proceso de renovación de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores, la actividad fagocítica de las células del EPR sobre dichos discos, protege el EPR del estrés oxidativo, lo cual es de gran relevancia en enfermedades como la DMAE, mantenimiento de la presión ocular por variaciones circadianas...(451). La afectación de todos estos procesos también promoverá la apoptosis celular y por lo tanto, el avance de la RP(53).

En nuestro estudio, las ratas P23HxLE presentaron unos niveles de actividad menores que las ratas de referencia, además de un desplazamiento de más de 7 horas entre su periodo de 2 horas de mínima temperatura y actividad. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a variables no paramétricas estudiadas como la estabilidad interdiaria, la fragmentación y la amplitud relativa, ni en el estudio de la temperatura ni en el de la actividad motora. Un estudio previo sobre los ritmos circadianos en este modelo animal de RP (393) ha demostrado que la degeneración retiniana producida en las ratas P23H-1 producía una afectación del sistema melanopsínico que alteraba los ritmos circadianos tras 24 meses de avance de la enfermedad. Una diferencia con nuestro trabajo es el tipo de rata utilizada, que, aun siendo la línea 1 de este modelo animal, ésta estaba en homocigosis y era albina, es decir, la progresión de la enfermedad fue mucho más rápida y el albinismo agrava la degeneración de la retina producida por la mutación P23H. También el tiempo de estudio fue mayor en su caso, de ahí que se encontrasen diferencias que en nuestro modelo todavía no se han podido alcanzar. El trabajo de Lax y cols. contempló que es necesario que las ratas lleguen a estadios avanzados de envejecimiento para presentar mínimas alteraciones como son cambios en los ritmos circadianos de la temperatura corporal y la actividad locomotora: los ritmos de temperatura se han observado similares en ratones en edad juvenil, adulta y en edades más avanzadas, al igual que se demostró previamente en otro estudio del mismo grupo (357), mientras que el parámetro de la actividad locomotora presenta un ritmo menos robusto, disminuyendo con la edad (393).

La administración de MT sobre los animales sanos mejoró significativamente el índice de desincronización, al igual que lo hizo sobre el grupo de ratas P23H heterocigotas que la tomaron, indicando que esta molécula favorece una correcta sincronización del ritmo de 24 horas establecido por las señales externas con el propio ritmo endógeno de los animales, papel que presenta de forma natural en los organismos. El trabajo de Lax y cols. del 2011 también utilizó MT para estudiar su efecto en estas ratas: en su trabajo utilizaron ratas P23H homocigotas de la línea 3 a las cuales se les administró MT en el agua de bebida a una concentración de 2mg/Kg/día, durante 16 meses y se observó que estos animales sufrieron una menor

progresión de la enfermedad y una menor afectación del ritmo circadiano, lo cual coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

El EGCG, por el contrario, incrementó el valor de la AR del ritmo de actividad y disminuyó el valor de CFI del ritmo de temperatura, indicando una mayor fragmentación y una peor ritmicidad circadiana, en las ratas SDxLE. Estos animales también presentaron unos menores niveles de actividad respecto a aquellos que no fueron tratados. Mi y cols. (452) realizaron un estudio en el cual demostraron la capacidad de esta catequina para atenuar la desincronización circadiana que se produce en el hígado en un modelo animal del síndrome metabólico, disminuyendo además parámetro de estrés oxidativo como lípidos peroxidados. No se han podido encontrar estudios en los que se observe el efecto del EGCG sobre el ritmo circadiano de individuos sanos, como en nuestro caso, sin embargo, un estudio realizado en el año 2011 demostró la capacidad del EGCG para actuar sobre receptores GABAérgicos del SNC e incrementar el tiempo del sueño y disminuir la latencia del mismo, en ratones sanos a los cuales se les administraba pentobarbital (453). Estudios anteriores también han demostrado su actividad anti-dopaminérgica, y su efecto hipnótico, además de sus efectos sedantes y de ser capaz de contrarrestar el efecto de la cafeína (453, 454). Las ratas P23HxLE tratadas presentaron un descenso en la acrofase de la actividad, junto a una disminución de la variable EI, es decir, empeoró la consistencia de los patrones circadianos. A diferencia de la MT, la acción de la EGCG sobre los ritmos circadianos en estos animales nocturnos, en los cuales ya hemos comentado que tienen menos influencia su efecto sobre otros neurotransmisores como la dopamina por ejemplo, es escasa y aunque pueda tener una acción preventiva sobre la degeneración retiniana por su efecto antioxidante, éste es claramente insuficiente a la hora de reflejarse en los ritmos circadianos, entre otras cosas porque son ritmos mantenidos hasta muy avanzada la enfermedad, e incluso cuando las ratas son ciegas.

La administración conjunta de MT y EGCG, no aportó beneficios, pero tampoco empeoró los parámetros analizados. En el caso de las ratas SDxLE, este grupo presentó unos valores significativamente mayores en la amplitud de la temperatura y la amplitud relativa de la actividad. Esto último también ocurría cuando se les administraba a ratas sanas únicamente el EGCG, y no sucedía en el caso de la



administración de la MT. Es difícil justificar porque la administración conjunta de ambas sustancias puede en algunos de los parámetros que hemos estudiado atenuar el efecto beneficioso de una de ellas, sin embargo, en otras, esa capaz de potenciar esta mejoría. Es necesario realizar más estudios con distintas posologías para valorar el efecto de las dosis en esta asociación y, sobre todo, obtener tejido retiniano para estudiar el estado de las células, incluyendo las células ganglionares, y estudiar en retina el estado oxidativo celular, algo que no hemos realizado dado la gran cantidad de tejido retiniano que precisábamos para tener una muestra valorable de tejido.

Cada vez más estudios avalan la importancia del estrés oxidativo en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (455-461). Este estrés oxidativo es fruto del desequilibrio que se produce en los tejidos entre los niveles de especies pro-oxidantes, es decir, RL y/o EROs, y los sistemas antioxidantes del organismo, a favor de los primeros. La retina es un tejido muy sensible a este estrés oxidativo debido a varios factores: es uno de los tejidos del organismo con una mayor tasa de consumo de O<sub>2</sub>, lo que hace que sea un lugar donde la producción de EROs sea mayor. Además, al igual que ocurre en el cerebro, presenta unos niveles de la enzima CAT relativamente bajos y una gran cantidad del metal de transición Fe, lo que hace que sea un lugar idóneo para la formación de radicales como el ·OH,, uno de los radicales libres más reactivos y dañinos (462). Otro de los factores a tener en cuenta es su alta cantidad de PUFAs: las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores poseen una alta proporción de estos lípidos (463), los cuales son extremadamente susceptibles a los daños por EROs y ERNs. Es un tejido con una altísima actividad metabólica ya que diariamente se fagocitan y regeneran la totalidad de los discos de los fotorreceptores, como hemos comentado en distintos momentos diarios en dependencia de que se trate de los conos o de los bastones. Finalmente, sobre la retina recae la mayoría de la radiación UV necesaria para el proceso de la vista, lo cual es una importante fuente exógena de RL. Todo esto se ve exacerbado en enfermedades como la RP, en la cual se ha demostrado que existe un incremento de los niveles de estrés oxidativo, debido a la apoptosis que sufren los bastones por causa de la mutación. Aunque en un principio existe especificidad en cuanto a las moléculas y células objeto, ésta finalmente dejará de tener relevancia y todas las células de la

retina se verán afectadas. También en el albinismo la falta de melanina hace que las células de EPR disminuyan su capacidad de defenderse ante la radiación UV (414, 415). Se ha observado que tanto pacientes como modelos animales de RP poseen niveles elevados de estrés oxidativo en la retina, en humor acuoso y en plasma, además de menor capacidad antioxidante (114). Todo lo anteriormente descrito, junto al hecho de que los RL no presenten una especificidad clara en cuanto a sus moléculas objetivo y la alteración del sistema circadiano por parte de la afectación del sistema melanopsínico hace pensar que el estado oxidativo hepático de nuestro modelo animal se vería afectado en mayor medida respecto un animal sano. Un estudio previo de nuestro grupo (408) demostró que la rata P23H heterocigota pigmentada presentaba unos mayores niveles de estrés oxidativo y nitrosativo, además de unos niveles inferiores de enzimas antioxidantes a nivel hepático, al compararlas con un grupo de ratas sanas, y que estos niveles de estrés aumentaban conforme avanzaba la enfermedad.

Nuestros resultados apoyan lo dicho anteriormente, ya que la rata P23H presentó unos niveles de LPO, medidos por los niveles de MDA y 4-HDA, significativamente superiores a los obtenidos en las ratas sanas tras los 6 meses que duró el estudio. Los niveles de nitritos, reflejo del daño nitrosativo que experimentan estos animales también se vieron incrementados. MT, gracias a su gran capacidad antioxidante, destaca por su capacidad de ser quelante de metales, e inhibir la producción de  $\cdot\text{OH}$ , ha sido utilizada en numerosos estudios para reducir los niveles de lípidos peroxidados en distintas situaciones y enfermedades (464-466). De la misma forma, en las ratas P23HxLE demostró ser el único tratamiento efectivo en la reducción de la LPO, y redujo significativamente los valores obtenidos de MDA y 4-HDA en el hígado. De forma contraria, el EGCG no mostró diferencias significativas en los niveles de LPO, respecto a los animales sin tratar. Multitud de estudios han demostrado que la administración de esta catequina en enfermedades que muestran niveles incrementados de este parámetro, ayudaba a reducirlos (467-471). Sin embargo, esta molécula también es conocida por ser capaz de auto-oxidarse y dar lugar a RL. El principal efecto secundario que presenta la ingesta de una alta concentración de EGCG es la hepatotoxicidad, disminuyendo los niveles de enzimas antioxidantes, e

incrementando los niveles de marcadores de peroxidación de lípidos (472, 473). En el primero de estos estudios sobre la hepatotoxicidad del EGCG se trabajó con una dosis de 1500 mg/kg en ratones (472), muy alejada de los 10mg/kg en ratas de nuestro trabajo. En el segundo se comprobó que un pretratamiento con una dosis diaria de EGCG de 500 mg/kg durante dos semanas prevenía de la propia hepatotoxicidad del bolo de EGCG 750 mg/kg (473) por lo tanto nuestro estudio trabaja a dosis mantenidas y muy alejadas de las que en algún momento se han reportado como hepatotóxicas.

Los tres tratamientos administrados a ratas sanas (SDxLE) tuvieron tendencia a incrementar en mayor o menor medida la LPO, aunque en ningún caso de forma significativa.

Las proteínas son otro tipo de biomoléculas que pueden verse afectadas por un incremento de la concentración de estrés oxidativo. Existe un descenso en los niveles de enzimas reparadoras de estas proteínas oxidadas tanto en el proceso de envejecimiento como en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (474). Como marcador de estos niveles de proteínas oxidadas tenemos los restos carbonilos, Nuestro estudio no muestra diferencias en la concentración de proteínas oxidadas entre las ratas P23H sin tratamiento y las SDxLE a nivel hepático. Tampoco se observaron mejoras significativas con MT y/o EGCG después de su administración. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos con las ratas sanas, la administración tanto de melatonina como de EGCG de forma independiente el uno del otro, redujo significativamente los niveles, indicando su capacidad para disminuir los niveles de radicales libres, y por lo tanto, mejorando el estado de salud de los animales, que podría haberse visto ligeramente empeorado con la edad, proceso en el cual se ha observado una acumulación de proteínas oxidadas por el fallo de sistemas reparadores de las mismas y de RL (475-477).

El  $\cdot\text{NO}$  es una molécula que forma parte del grupo de los RL. Una manera de medir sus niveles es a través de la concentración de sus metabolitos: los nitratos y los nitritos. Los animales P23HxLE no presentan mayores niveles de estos metabolitos en el tejido hepático respecto a los animales sanos, tampoco el tratamiento sobre animales enfermos mostró diferencias, aunque la administración de MT en animales

de referencia redujo sus niveles. Aunque la mayoría de los estudios previos mostraron mejora en cuanto a los niveles de nitritos tanto con melatonina como con el EGCG. El derivado de MT, AMK, es capaz de inhibir la enzima pro-oxidante iNOS, reduciendo de esta forma los niveles de NO e impidiendo de forma indirecta la creación del radical ONOO<sup>-</sup> y por lo tanto, el radical ·OH (478, 479). Se ha podido encontrar un estudio (480) en el cual la administración de esta indolamina no afecta de forma significativa a los niveles de nitratos y nitritos en modelos animales con daño oxidativo, sin embargo, cada vez existen más evidencias del papel que jugaría MT en el control de la producción del NO, ya sea por la regulación de la familia de enzimas NOS, como eliminador directo del NO o el ONOO<sup>-</sup>, a través de la activación de sus receptores específicos, impidiendo la captación del aminoácido arginina por la célula e inhibiendo la actividad de NOS, inhibiendo la activación del factor de transcripción NF-κB, el cual es necesario para la expresión de iNOS y alterando el mecanismo mediado por Ca<sup>2+</sup> y calmodulina entre otros (481-485). Fatima y colaboradores (486) demostraron que la administración de la catequina EGCG en combinación con otra molécula antioxidante, el coenzima Q10, era capaz de reducir los niveles de estrés oxidativo, inflamación y de daño nitrosativo en un modelo de toxicidad a nivel renal, inducido por la cisplatina, que se caracteriza por elevados niveles de EROs, ERNs y células y moléculas inflamatorias. Por otro lado, a concentraciones adecuadas, también es capaz de activar eNOS por la activación del receptor TRPV1, y estimular la producción de NO, donde va a presentar un papel beneficioso en las enfermedades cardíacas (487).

GSH es una de las principales moléculas antioxidantes presentes en las células de los microorganismos (224, 488), la cual se sintetiza en el citosol y desde allí se distribuye al resto de compartimentos celulares manteniendo el estado redox del ambiente, convirtiéndose en GSSG a través de la formación directa de aductos o por la inactivación de EROs (489). En condiciones fisiológicas normales, GSSG se encuentra a una concentración muy inferior a la de GSH (se corresponde con menos del 5% del total del glutatión presente en la célula), sin embargo, cuando el organismo se encuentra bajo altos niveles de estrés oxidativo, la concentración de GSSG se incrementa ya que la mitocondria es incapaz de transportarlo al citosol donde sería utilizado por el NADPH y la enzima glutatión reductasa para generar de nuevo GSH

(490). Este desequilibrio redox inicia el proceso de apoptosis celular. Debido a esto, el ratio GSH/GSSG es un buen indicador del estado oxidativo de los organismos (387, 491). Carpi-Santos y cols. (492) demostraron un descenso en los niveles de GSH en retinas de ratas diabéticas, en las cuales, el estrés oxidativo presenta un papel importante a la hora de desarrollar retinopatía diabética, al igual que ocurre en la RP (455, 493). También se ha podido demostrar un descenso en la ratio GSH/GSSG en el humor acuoso de pacientes afectados de RP que, junto a un descenso en su capacidad total antioxidante implica un incremento en el estrés oxidativo (494), aunque en nuestro estudio no hemos podido observar diferencias entre la ratio GSH/GSSG obtenida en las ratas P23HxLE y las ratas SDxLE. Sí se han encontrado diferencias en los modelos animales de RP como son los ratones rd1 y rd10: en el ratón rd1 se dio un descenso en los niveles de GSH, aunque no existieron cambios en los niveles de GSSG, mientras que en el ratón rd10 ocurrió justo lo contrario, incrementándose los niveles de GSSG y permaneciendo estables los de GSH (495). MT es capaz de actuar incrementando los niveles del GSH y, por lo tanto, incrementando la ratio GSH/GSSG actuando sobre la enzima GPx, estimulando su actividad, tanto en ratones sanos como en ratones a los que se les han inducido estrés oxidativo por una baja dosis de lipopolisacárido (496). Se observó el mismo patrón en ratas hipertensas: un incremento en los niveles de la enzima GPx, que desembocó en una mayor concentración de GSH (497).

El EGCG también ha demostrado su capacidad para actuar sobre los niveles de este parámetro, aumentando la ratio en la retina de ratas SD suplementadas con esta catequina a una concentración de entre 192,5 y 385mg/kg, a través de una sonda gástrica, siendo por tanto una molécula capaz de alcanzar la retina tras su administración oral y ejercer su acción antioxidante de forma sistémica (339). En nuestro estudio, sólo se observaron cambios en la ratio GSH/GSSG en las ratas SDxLE tratadas con EGCG, las cuales mostraron un menor niveles de estrés oxidativo que aquellas sin tratamiento, demostrando la capacidad de esta catequina de hacer frente al daño oxidativo que surge con la edad. Maruya y cols. (498) realizaron un estudio en eritrocitos de personas de entre 18 y 85 años a los cuales se les indujo estrés oxidativo mediante la administración de *tert*-butil-hidroperóxido: el grupo de personas de mayor

edad mostraron un descenso de más del 50% en la concentración de GSH respecto a los individuos más jóvenes, el cual además fue el más afectado tras la adición del *tert*-butil-hidroperóxido; el tratamiento con EGCG demostró ser la catequina de todas las que se probaron y que se encuentran en el té verde, con una mayor capacidad para incrementar los valores de GSH, protegiendo a los eritrocitos del estrés oxidativo.

Las ratas P23HxLE tratadas con MT o EGCG solos no mostraron diferencia significativa en cuanto a los niveles de GSH y GSSG comparándolas con las pertenecientes al grupo vehículo; sin embargo, las ratas tratadas con la combinación de ambos antioxidantes MT+EGCG mostraron un incremento estadísticamente significativo de esta ratio, al contrario que lo que ocurre en las ratas SDxLE, donde no se vieron cambios significativos. No ha sido posible encontrar estudios en la literatura en los cuales se haya estudiado el papel combinado de estas dos sustancias como tratamientos antioxidantes frente a la edad ni frente a enfermedades neurodegenerativas.

Frente al daño oxidativo, el organismo posee unos sistemas que le permiten hacer frente a los RL, evitando de esta forma la muerte celular, enfermedades, patógenos... Cuando el equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes se desplaza hacia las primeras, se crea un estado de estrés oxidativo, el cual es característico de la edad y numerosas patologías, incluyendo múltiples enfermedades oculares (128, 441, 499-503).

En nuestro estudio hemos analizado 3 de las principales enzimas antioxidantes del organismo: CAT, SOD y GST, las cuales actúan convirtiendo moléculas altamente perjudiciales para el organismo como son el  $H_2O_2$ , el anión  $O_2^-$  y numerosas moléculas xenobióticas en otras menos reactivas y dañinas. Se ha demostrado que la suplementación con moléculas con capacidad antioxidante, como serían melatonina y el EGCG, entre otras muchas previamente estudiadas, son capaces de regular de forma positiva la expresión de estas enzimas, favoreciendo la eliminación de RL y disminuyendo los procesos de inflamación, autofagia, apoptosis... (361, 504-506) Además, también determinamos la capacidad total antioxidante de los distintos grupos de animales, para conocer la capacidad global de su organismo a la hora de hacer

frente al daño oxidativo, ya que es una determinación que engloba todas las moléculas con capacidad antioxidante dispuestas en el material estudiado, en nuestro caso, el hígado.

La CAT es una enzima presente en los peroxisomas de las células en los mamíferos. Su función principal es la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , en situaciones en las que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encuentra a concentraciones muy elevadas, es decir, cuando se dan niveles altos de estrés oxidativo o se incrementa la producción de esta molécula por alguna enfermedad o patógeno. Además, su toxicidad puede verse incrementada cuando se convierte en radicales OH, por la reacción de Fenton, tras su interacción con iones de hierro y cobre. La CAT presente en los eritrocitos es una de las principales reguladoras de las concentraciones de este RL en los tejidos, protegiéndolos del daño oxidativo. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma como producto de reacciones de distintas enzimas oxidasa presentes en el organismo, aunque también es el resultado de la reacción catalizada por la enzima SOD, que tiene como función la dismutación del anión  $\text{O}_2^-$ , dando lugar al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  (507). De ahí, que la regulación de la expresión de estas dos enzimas esté relacionada.

Por otro lado, la familia de enzimas GST participan en la reacción de conjugación del GSH con moléculas electrofílicas y oxidantes para favorecer su detoxificación. Se ha encontrado que sustancias naturales como las antocianinas o el resveratrol son capaces de activar estas enzimas antioxidantes y de fase II activando mecanismos de acción de elementos de respuesta antioxidante, imprescindibles en el control del estrés oxidativo y la inflamación (508). Las enzimas de detoxificación de compuestos químicos y xenobióticos se encuentran clasificadas en 3 grupos en función de la fase del proceso en la que participan: GST pertenece al grupo de enzimas de detoxificación de fase II se encuentran reguladas por el factor de transcripción Nrf2, el cual se une a la región promotora de numerosos genes que codifican enzimas antioxidantes como la GST. Nrf2 se activa en condiciones de estrés y daño oxidativo, translocándose al núcleo celular y produciendo una regulación positiva de enzimas detoxificantes y antioxidantes: GST y GSH, entre otros. Esta molécula regula el estado redox de la célula bajo condiciones de estrés dañinas para la misma.

En primer lugar, podemos observar que al comparar los valores de todos los parámetros antioxidantes analizados, se observa un descenso significativo en ellos, entre las ratas transgénicas P23HxLE y las ratas sanas SDxLE, indicando la menor capacidad de los animales que sufren la enfermedad RP de hacer frente a los RL: existe un descenso de un 22% de la capacidad total, y estudiándolo en la actividad de los distintos enzimas vemos que la actividad de la catalasa estaba reducida un 20%, al igual que lo hizo la SOD, y un 34% la GST. Encontramos por tanto que estos animales presentan una capacidad antioxidante total y unos niveles de enzimas antioxidantes específicas disminuidas de forma estadísticamente significativa. El hecho de que los niveles observados de las enzimas antioxidantes en las ratas P23HxLE sean inferiores a los obtenidos en las ratas SDxLE es algo ampliamente demostrado en distintas enfermedades y en el proceso de la edad, donde se experimenta un descenso de los niveles de enzimas antioxidantes, haciendo a los organismos más vulnerables a la acción de los RL (509-514). Se ha observado que numerosas enfermedades neurodegenerativas presentan unos niveles elevados de estrés oxidativo, con una alta producción de EROs y ERNs, combinado con unos niveles menores respecto a individuos sanos, lo cual facilita la progresión de la enfermedad. Sin embargo, lo que no está tan claro es si este incremento de RL y descenso de sistemas antioxidantes es causa directa de la enfermedad o consecuencia de otros mecanismos celulares que están afectados (460, 510, 515).

La administración de MT a las ratas P23H pigmentadas heterocigotas supuso un incremento significativo de los niveles de CAT y SOD, y aunque en el caso de la enzima GST, su aumento no fue significativo como el de las dos anteriores, también se observa tendencia a incrementar su actividad. De igual forma los niveles de capacidad total antioxidante se incrementaron en un 40% en el grupo con MT, coincidiendo con los datos obtenidos de las 3 enzimas previamente señaladas. El análisis de los parámetros antioxidantes de este grupo de tratamiento, coincide con los valores de estrés oxidativo que se analizaron y discutieron en la sección anterior, en la cual se veía un claro descenso de los mismos. Previamente ya se han valorado las múltiples bondades de melatonina, siendo una de las principales moléculas antioxidantes que existen, con gran capacidad para eliminar RL, y con capacidad para incrementar los niveles de



expresión de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, GPx y GR (516). En el estudio realizado por Moniruzzaman y sus cols. (517) sobre hepatocitos a los cuales se les indujo estrés oxidativo por  $H_2O_2$ , demostró que aquellas células tratadas con MT incrementaban sus niveles de CAT y SOD respecto a aquellas sin suplementación. MT también se ha demostrado capaz de incrementar los niveles de SOD y CAT en pacientes que sufren de estenosis arterial y a los cuales se les realizó un procedimiento que puede producir daño cerebral (isquemia y reperfusión), que produce un incremento en los niveles de estrés oxidativo. A estos pacientes se les suministró 6 mg/día de MT los 3 días previos a la intervención y los 3 días posteriores, demostrando la capacidad de esta molécula para hacer frente al daño oxidativo incrementando los niveles de defensa antioxidante (518). Nuestros resultados no hacen sino apoyar esta idea y aportar evidencias sobre el efecto beneficioso que presenta este compuesto como tratamiento complementario a enfermedades caracterizadas por un incremento en los niveles de estrés oxidativo, como sería el caso de la RP.

El EGCG también consiguió mejorar el estado antioxidante de los animales a los cuales se les administró en el agua de bebida, ya que nuestros datos demuestran un incremento de la capacidad total antioxidante de un 32% respecto al grupo de ratas P23HxLE sin tratamiento, junto a un incremento significativo de la expresión de la GST. La enzima CAT mostró cierta tendencia a incrementar sus valores, sin embargo la SOD permaneció prácticamente sin cambios. De forma global, este grupo presentó menores mejorías en su estado antioxidante que el grupo tratado con melatonina. El EGCG es conocido por ser un potente activador del Nrf2, incrementando por lo tanto, la expresión de enzimas como la GST (519-521), al igual que ha ocurrido en nuestro estudio, donde las ratas P23HxLE pertenecientes al grupo EGCG presentaban unos niveles estadísticamente superiores de actividad de la enzima GST, respecto al grupo vehículo. Esto favorecería la eliminación de moléculas generadoras de RL y, por lo tanto, disminuiría los niveles de estrés oxidativo. Xiao-Dong y cols. demostraron la capacidad de esta catequina para actuar sobre los niveles de expresión del factor Nrf2, disminuyendo la hepatotoxicidad hepática generada en el hígado de ratas a las cuales se les administró arsénico en el agua de bebida (522). Además, el Nrf2 también participa en la síntesis *de novo* de distintas enzimas antioxidantes, un incremento en

su expresión mediado por el EGCG incrementaría los niveles antioxidantes de los animales y favorecería la reducción de los niveles de estrés oxidativo (523). Otro estudio (524) realizado con ratas a las cuales se les inyectó EGCG a distintas concentraciones a través de la vena porta, demostró la habilidad de esta catequina para incrementar la actividad de la enzima GST a nivel hepático.

También se ha demostrado la capacidad de la catequina para regular positivamente las enzimas antioxidantes CAT y SOD (525). EGCG pudo revertir el descenso en los niveles de SOD en un cultivo de fibroblastos humanos a los cuales se les había inducido daño oxidativo por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (526). En otro estudio llevado a cabo en un modelo in vitro de hepatotoxicidad inducida por lipopolisacárido, EGCG ejerció un efecto protector, regulando los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD; en ese estudio también demostraron que altas dosis de esta catequina también pueden presentar propiedades tóxicas para las células (527). Sandip Pal y cols. (528) realizaron un estudio en una línea celular de leucemia mieloide, en el demostraron que el EGCG es la catequina presente en el té verde con mayor actividad inhibitoria de la enzima CAT, además de ser capaz de modificar su estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, incrementando los niveles de EROs y suprimiendo la muerte celular. Este estudio in vitro mostró una concentración necesaria de 54,5  $\mu$ M de EGCG a nivel celular para inhibir el 50% de la actividad catalasa, concentración muy alejada de la que podría llegar a nivel celular de nuestras ratas con una administración diaria de 10mg/kg.

Al combinar la administración de las dos moléculas antioxidantes anteriores en un único grupo, aunque también se observó una mejoría significativa en los niveles de la capacidad total antioxidante, no encontramos niveles más elevados de ninguna de las 3 enzimas antioxidantes estudiadas; analizando los niveles de CAT se observó cierta tendencia a presentar valores superiores respecto al grupo sin tratar, pero ni la SOD ni la GST modificaron sus niveles de actividad.

En el caso de las ratas sanas, sin embargo no se han observado este aumento en la capacidad antioxidante del organismo con la administración de las sustancias antioxidantes de la misma forma y a la misma concentración los antioxidantes.

En el caso de MT, estos animales experimentaron un descenso significativo en los parámetros antioxidantes, con una pérdida de un 37% de su capacidad total antioxidante, y un 44% de la expresión de la enzima CAT. MT es una de las moléculas biológicas más seguras conocidas hasta la fecha: se ha llegado a administrar en animales durante investigaciones biomédicas alcanzando concentraciones de hasta 800mg/kg sin detectarse efectos adversos (529), probablemente debido a su alta solubilidad, no pudiéndose establecer su dosis letal. Se ha podido encontrar un ensayo clínico en el que sus participantes reportaron como efectos secundarios de la ingesta de MT por vía oral, insomnio, dolor de cabeza y/o fatiga; sin embargo, el estudio no aporta evidencias claras de que los efectos secundarios se deben a la toma de melatonina, no pudiéndose además encontrar alteraciones en los patrones del sueño de los individuos, ni efectos tóxicos en los parámetros bioquímicos analizados (530). Se han realizado numerosos estudios clínicos con MT, tanto en individuos sanos como afectados por alguna enfermedad, en los cuales se detectan mínimos efectos adversos, comentados previamente o la ausencia total de los mismos (531-534). También es cierto que muy pocos de ellos se han realizado con una suplementación de MT durante un periodo largo de tiempo (535, 536), de ahí que sean necesarios más estudios para dilucidar si MT presenta o no efectos adversos en condiciones de salud, con una ingesta prolongada.

La catequina del té verde también mostró su capacidad para reducir a niveles estadísticamente significativos la capacidad total antioxidante de los animales suplementados con ella, en un 42%, mientras que el resto de enzimas antioxidantes únicamente mostraron cierta tendencia a bajar su actividad enzimática específica. La utilización de EGCG en ensayos clínicos es más complicada debido a su demostrada capacidad oxidante en función de la concentración, el tiempo de exposición, su baja biodisponibilidad... (339). Además se han reportado casos de hepatotoxicidad en casos de dietas con suplementos que presentaban en su formulación altas dosis de EGCG (537, 538). En individuos sanos que tomaron 2 mg/kg de EGCG se alcanzó la mayor concentración en plasma tras 1-2 horas después de su ingesta, con un tiempo de vida media de 3-4 horas (539). Hay muy pocos estudios realizados con EGCG en humanos, por lo que su mecanismo de acción permanece poco claro: un estudio llevado a cabo

en mujeres sanas a las cuales se les administró 752 mg de EGCG por vía oral (equivalente a 9 tazas de té), previa a la ingesta de comida reportó como efectos secundarios náuseas y vómitos en algunos de los participantes (540). Un estudio llevado a cabo por Chow y cols. (541) en el cual se administró EGCG a una concentración de 800 mg/día durante 4 semanas reportó efectos secundarios como gases, molestias estomacales, náuseas, dolor abdominal, mareos y dolor muscular. El equivalente en tazas de té en este estudio fue de aproximadamente 16 tazas de té de 120 mL, ingeridas en 1 o 2 tiempos, al día. Se observó que este suplemento era bien tolerado durante al menos 1 mes por parte de los participantes, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en los perfiles bioquímicos obtenidos. En cualquier caso, las dosis de estos trabajos están muy alejadas de la dosis de 10mg/kg que hemos utilizado en este estudio.

Finalmente, con el tratamiento combinado EGCG+MT se observó una reducción significativa en la capacidad total antioxidante. No ha sido posible encontrar estudios en los que se haya combinado el tratamiento con MT y EGCG como en nuestro caso, sin embargo un estudio realizado con EGCG y resveratrol a concentraciones de 282 mg/d y 80 mg/d respectivamente, durante 12 semanas, produjo un incremento en la expresión de genes relacionados con el ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones, incrementando la capacidad oxidativa del músculo esquelético, y un menor estrés oxidativo, mejorando además el metabolismo lipídico (542).

Está ampliamente demostrado que sustancias antioxidantes como la vitamina C, vitamina E, flavonoides...presentan numerosas propiedades beneficiosas para el organismo, eliminando RL en condiciones de estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de inflamación, favoreciendo los procesos inmunitarios, deteniendo la proliferación celular en líneas celulares cancerosas... Sin embargo, su uso cada vez se ha extendido más sin poner límites en cuanto a qué grupos poblacionales pueden verse beneficiados, a qué concentraciones... Más de la mitad de la población de los Estados Unidos toma a diario suplementos dietéticos, siendo más del 37% complejos multivitamínicos; más de la mitad de estas personas toman más de un tipo de suplemento distinto al día (543). Cada vez más estudios ponen de manifiesto los

efectos adversos que presentan ciertas moléculas en principio, con efectos beneficiosos para el organismo, o como poco, la total ausencia de efectos positivos de estos suplementos antioxidantes: un ejemplo es la genisteína, isoflavona que encontramos en la soja, y que durante años se ha recomendado como complemento en el cáncer de mama; sin embargo en un estudio realizado a mujeres con tumores mamarios tanto benignos como malignos, se observó que aquellas a las que se les había suministrado soja como complemento a su dieta, presentaban una mayor proliferación celular y un incremento significativo de los receptores de progesterona. En otro estudio se determinó que la genisteína podía inhibir o impedir la correcta actuación de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama como el tamoxifeno (544). Otros estudios en los cuales se analizaron diferentes suplementos contra el catarro común, como la vitamina C o el cinc también han comunicado resultados contradictorios: en muchos casos no existía ninguna mejora por su toma y, en función de la dosis administrada, también presentaban efectos adversos (545).

Aunque existen multitud de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, en diferentes líneas celulares, modelos animales e incluso, en algunos casos, pacientes humanos, que reportan la gran actividad antioxidante de melatonina (546-552), también existen ciertos estudios que demuestran lo contrario (552-554). Existen diferencias en cuanto a la concentración a utilizar en líneas tanto cancerígenas como no cancerígenas, para que melatonina actúe como antioxidante y no estimule la producción de EROs (555); también hay que tener en cuenta el tiempo de duración de la suplementación, ya que un mayor tiempo de administración puede suponer que esta molécula actúe como antioxidante o como pro-oxidante en un cultivo celular (556). Hay que destacar que no ha sido posible encontrar estudios *in vivo* que demuestren esta actividad pro-oxidante, la cual sólo se ha podido observar en investigaciones realizadas sobre cultivos celulares, la mayoría de los cuales eran tratamientos sobre líneas celulares tumorales (557, 558).

Wang y colaboradores, en el año 2015, publicaron un estudio (559) en el que se observaba que la administración de EGCG, a dosis elevadas, es capaz de activar la respuesta adaptativa dependiente del factor de transcripción Nrf2, regulando de

forma positiva ciertas enzimas y moléculas antioxidantes. Sin embargo a dosis tóxicas (sin llegar a ser letales) además de la activación de Nrf2, disminuía la expresión de enzimas antioxidante como SOD y catalasa. Cuando se superan estas concentraciones, desaparece la respuesta de Nrf2 causando hepatotoxicidad, uno de los principales efectos adversos de esta catequina.

También está demostrada la capacidad de EGCG para inhibir la catalasa, mejor que cualquiera de las otras catequinas que podemos encontrar en el té verde (528). Esta inhibición supone un incremento de EROs, que puede conllevar la apoptosis celular. Esta propiedad puede considerarse positiva en el caso de tratamiento contra el cáncer, sin embargo en enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, supondría una progresión de la enfermedad, y por lo tanto un efecto negativo para el paciente. Las actividades antioxidantes y pro-oxidantes de este compuesto todavía no están bien establecidas, de ahí que su utilización deba realizarse siempre con cautela.

**CONCLUSIONES**





Tras el análisis de los resultados obtenidos y su discusión, podemos concluir que:

- Primera:** La rata P23H línea 1 heterocigota pigmentada tiene menor función visual que el animal de referencia, lo que concuerda con la pérdida de fotorreceptores, propia de la enfermedad Retinosis Pigmentaria. Las diferencias en la agudeza visual, sensibilidad al contraste y actividad eléctrica retiniana son apreciables desde P30: esto es muestra de una aparición temprana de la sintomatología en el modelo animal, lo que coincide con la mutación humana. Por otro lado, los valores de sensibilidad al contraste descienden en el animal de referencia a partir de P90, sugiriendo una afectación de la retina de las ratas de referencia con la edad y la base albina.
- Segunda:** La administración de melatonina y/o galato de epigallocatequina como tratamientos antioxidantes en la rata P23HxLE mejora los parámetros de función visual: agudeza visual, sensibilidad al contraste y actividad eléctrica retiniana, indicando una mejor preservación de las células y retrasando la progresión de la enfermedad.
- Tercera:** La suplementación de las ratas de referencia SDxLE con melatonina y/o galato de epigallocatequina también aporta mejorías en todos los parámetros de función visual analizados: agudeza visual, sensibilidad al contraste y actividad eléctrica retiniana, sugiriendo que estos tratamientos antioxidantes podrían ser útiles en enfermedades oculares relacionadas con la edad como la DMAE.
- Cuarta:** En las ratas P23HxLE hay cambios mínimos en los parámetros de ritmos circadianos estudiados entre P60 y P180. Además, las ratas P23HxLE muestran una desincronización entre el ritmo de temperatura corporal y el de actividad locomotora con respecto a las ratas de referencia.
- Quinta:** Melatonina mejora el índice de desincronización del ritmo circadiano, tanto en las ratas P23HxLE como en las de referencia SDxLE, lo cual se corresponde con su conocida función sincronizadora de ritmos biológicos. El galato de epigallocatequina disminuye los niveles de actividad de todos los animales tratados, en concordancia con sus propiedades sedantes y actividad anti-dopaminérgica, al actuar sobre el

sistema nervioso central. Además, la administración conjunta de melatonina y galato de epigallocatequina incrementa la amplitud del ritmo circadiano.

**Sexta:** Las ratas P23HxLE muestran mayores niveles de estrés oxidativo, y menores niveles de defensas antioxidantes lo cual, en conjunto, indica que estos animales presentan un mayor estado de estrés oxidativo a nivel hepático, respecto a las ratas de referencia.

**Séptima:** El tratamiento con melatonina en animales P23HxLE reduce los niveles de ciertos marcadores oxidativos e incrementa la capacidad antioxidante total y las actividades de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, elementos indispensables en la lucha contra los radicales libres.

**Octava:** El galato de epigallocatequina apenas produce ningún efecto en los niveles de estrés oxidativo de las ratas P23HxLE, aunque sí es capaz de incrementar sus niveles antioxidantes globales, y los de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa, probablemente a través del mecanismo de acción mediado por el factor de transcripción Nrf2.

**Novena:** La administración conjunta de melatonina y galato de epigallocatequina disminuye los niveles de todos los marcadores de estrés oxidativo e incrementa de forma significativa el ratio GSH/GSSG en las ratas P23HxLE. Sin embargo, en la capacidad total antioxidante de las ratas el incremento se produce en menor medida que con los tratamientos independientes, y la administración conjunta no influye en los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas.

**Décima:** Las suplementaciones con melatonina y/o galato de epigallocatequina no modifican ninguno de los marcadores de estrés oxidativo analizado en ratas de referencia. Además, reducen los niveles de defensas antioxidantes totales de los animales, siendo melatonina la que produce descensos en un mayor número de parámetros antioxidantes analizados. Sin embargo el tratamiento combinado reporta menores cambios que los tratamientos individuales, siendo necesarios más estudios para clarificar por qué la administración conjunta de sustancias con propiedades antioxidantes en individuos sanos disminuye sus niveles de defensas antioxidantes.

*CONCLUSIONS*



After analyzing the results obtained and their discussion, we can conclude that:

- First:** Pigmented heterozygous P23H line 1 rats have less visual function than the wild type animal, which is consistent with the loss of photoreceptors, a typical feature of the Retinitis Pigmentosa. Differences in visual acuity, contrast sensitivity and retinal electrical activity are visible from P30: this is a sign of an early appearance of the signs in the animal model, which coincides with the human mutation. On the other hand, contrast sensitivity values decrease in the SDxLE animal from P90, suggesting retinal affection in wild type rats due to aging and the albino background.
- Second:** The administration of melatonin and/or epigallocatechin gallate as antioxidant treatments in the P23HxLE rat improves the parameters of visual function: visual acuity, contrast sensitivity and retinal electrical activity, indicating a better cell preservation and delaying the progression of the disease.
- Third:** The supplementation with melatonin and/or epigallocatechin gallate to SDxLE reference rats also provides improvements in every visual function parameter analyzed: visual acuity, contrast sensitivity and retinal electrical activity, suggesting that these antioxidant treatments could be useful in age-related ocular diseases such as AMD.
- Fourth:** There are minimal changes in the parameters of circadian rhythms studied between P60 and P180 in P23HxLE rats. In addition, P23HxLE rats show a desynchronization between the rhythm of body temperature and the rhythm of locomotor activity compared to wild type rats.
- Fifth:** Melatonin improves the rate of desynchronization of the circadian rhythm, both in P23HxLE and in SDxLE reference rats, which is compatible with its known synchronizing function of biological rhythms. Epigallocatechin gallate decreases the activity levels of all treated animals, in accordance with its sedative properties and anti-dopaminergic activity, by acting on the central nervous system. In addition, the combined administration of melatonin and epigallocatechin gallate increases the amplitude of the circadian rhythm.

- Sixth:** P23HxLE rats show higher levels of oxidative stress, and lower levels of antioxidant defenses, which, overall, indicates that these animals have a greater state of hepatic oxidative stress, compared to wild type rats.
- Seventh:** The treatment with melatonin in P23HxLE animals reduces the level of certain oxidative markers and increases the total antioxidant capacity and the activities of the catalase and superoxide dismutase enzymes, which are essential elements in the fight against free radicals.
- Eighth:** Epigallocatechin gallate hardly produces any effect on the oxidative stress levels of the P23HxLE rats, although it increases the total antioxidant capacity, and the activity of the glutathione S-transferase enzyme, probably through the mechanism of action mediated by the Nrf2-transcription factor.
- Ninth:** The joint administration of melatonin and epigallocatechin gallate decreases the levels of all oxidative stress markers and significantly increases the GSH / GSSG ratio in P23HxLE rats. However, in the rats' total antioxidant capacity, the increase occurs to a lesser extent than with the independent treatments, and the joint administration does not influence the activity levels of the antioxidant enzymes studied.
- Tenth:** Melatonin and / or epigallocatechin gallate supplements do not modify any of the oxidative stress markers analyzed in reference rats. In addition, they reduce the levels of total antioxidant defenses of the animals, being melatonin the treatment which produces decreases in a greater number of antioxidant parameters analyzed. However, the combined treatment reports smaller changes than the individual treatments, so more studies are needed to clarify why the joint administration of substances with antioxidant properties in healthy individuals decreases their levels of antioxidant defenses.

## BIBLIOGRAFÍA





1. Atlas IV. <http://atlas.iapb.org/discover> 2016 [The IAPB Vision Atlas brings together the **latest data and evidence** related to avoidable blindness and sight loss].
2. Kolb H. Gross Anatomy of the Eye by Helga Kolb.
3. Remington LA, Remington L. Clinical anatomy and physiology of the visual system. –St. Louis, MO. USA: Elsevier Butterworth-Heinemann; 2012.
4. Omri S, Omri B, Savoldelli M, Jonet L, Thillaye-Goldenberg B, Thuret G, et al. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. Clin Ophthalmol. 2010;4:183-95.
5. Strauss O. The retinal pigment epithelium by Olaf Strauss.
6. reference Tr. [www.retinareference.com/anatomy](http://www.retinareference.com/anatomy) 2018 [
7. Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. Progress in retinal and eye research. 1995;14(1):267-91.
8. Kolb H. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. Phil Trans R Soc Lond B. 1970;258(823):261-83.
9. Lasansky A. Synaptic organization of cone cells in the turtle retina. Phil Trans R Soc Lond B. 1971;262(844):365-81.
10. Dowling JE. The retina: an approachable part of the brain: Harvard University Press; 1987.
11. Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. Structure of cone photoreceptors. Progress in retinal and eye research. 2009;28(4):289-302.
12. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. J Comp Neurol. 1990;292(4):497-523.
13. Kolb H. Photoreceptors by Helga Kolb. 2013.
14. Esquiva G, Lax P, Pérez-Santonja JJ, García-Fernández JM, Cuenca N. Loss of Melanopsin-Expressing Ganglion Cell Subtypes and Dendritic Degeneration in the Aging Human Retina. Front Aging Neurosci. 2017;9:79.
15. Provencio I, Jiang G, Willem J, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(1):340-5.
16. Graham DM. Melanopsin-expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) by Dustin M. Graham and Kwoon Y. Wong.
17. Walch OJ, Zhang LS, Reifler AN, Dolikian ME, Forger DB, Wong KY. Characterizing and modeling the intrinsic light response of rat ganglion-cell photoreceptors. Journal of neurophysiology. 2015;114(5):2955-66.
18. Detwiler PB. Focus: Sensory Biology and Pain: Phototransduction in Retinal Ganglion Cells. The Yale journal of biology and medicine. 2018;91(1):49.
19. Bonmati-Carrion MA, Hild K, Isherwood C, Sweeney SJ, Revell VL, Skene DJ, et al. Relationship between human pupillary light reflex and circadian system status. PLoS One. 2016;11(9):e0162476.

20. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J, Montagna P, Sadun AA, Carelli V. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: implications for human diseases. *Vision research*. 2011;51(2):296-302.
21. Reifler AN, Chervenak AP, Dolikian ME, Benenati BA, Meyers BS, Demertzis ZD, et al. The rat retina has five types of ganglion-cell photoreceptors. *Experimental eye research*. 2015;130:17-28.
22. Stabio ME, Sabbah S, Quattrochi LE, Ilardi MC, Fogerson PM, Leyrer ML, et al. The M5 Cell: A Color-Opponent Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell. *Neuron*. 2018;97(1):150-63. e4.
23. Zhao X, Stafford BK, Godin AL, King WM, Wong KY. Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *The Journal of physiology*. 2014;592(7):1619-36.
24. Reifler AN, Chervenak AP, Dolikian ME, Benenati BA, Meyers BS, Demertzis ZD, et al. The rat retina has five types of ganglion-cell photoreceptors. *Exp Eye Res*. 2015;130:17-28.
25. de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, et al. Retinal macroglial responses in health and disease. *BioMed research international*. 2016;2016.
26. Coughlin BA, Feenstra DJ, Mohr S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision research*. 2017;139:93-100.
27. Chohan A, Singh U, Kumar A, Kaur J. Müller stem cell dependent retinal regeneration. *Clinica Chimica Acta*. 2017;464:160-4.
28. Kolb H. *Glial cells of the Retina* by Helga Kolb. 2016.
29. Chao TI, Pannicke T, Reichelt W, Reichenbach A. Na<sup>+</sup> channels are expressed by mammalian retinal glial (Müller) cells. *Neuroreport*. 1993;4(5):575-8.
30. Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):307-12.
31. Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial transmission. *Physiological reviews*. 2015;95(3):695-726.
32. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1):a020412.
33. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*. 2014;158(1):15-24.
34. Williams PA, Marsh-Armstrong N, Howell GR, Bosco A, Danias J, Simon J, et al. Neuroinflammation in glaucoma: A new opportunity. *Experimental eye research*. 2017;157:20-7.
35. Arroba AI, Valverde ÁM. Modulation of microglia in the retina: new insights into diabetic retinopathy. *Acta diabetologica*. 2017;54(6):527-33.
36. Cuenca N, Fernández-Sánchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2014;43:17-75.

37. Noailles A, Fernández-Sánchez L, Lax P, Cuenca N. Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11(1):186.
38. Noailles A, Maneu V, Campello L, Gómez-Vicente V, Lax P, Cuenca N. Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration. *Scientific reports*. 2016;6:33356.
39. Mitra RN, Zheng M, Weiss ER, Han Z. Genomic form of rhodopsin DNA nanoparticles rescued autosomal dominant Retinitis pigmentosa in the P23H knock-in mouse model. *Biomaterials*. 2018;157:26-39.
40. Froebel BR, Trujillo AJ, Sullivan JM. Effects of Pathogenic Variations in the Human Rhodopsin Gene (hRHO) on the Predicted Accessibility for a Lead Candidate Ribozyme. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(9):3576-91.
41. Xiong S, Yu Y, Zhou X, Xia X, Jiang H. Rhodopsin T17M mutant inhibits complement C3 secretion in retinal pigment epithelium via ROS induced downregulation of TWIST1. *Journal of cellular biochemistry*. 2017.
42. Tian N. Development of retinal ganglion cell dendritic structure and synaptic connections. 2012.
43. Völgyi B, Chheda S, Bloomfield SA. Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*. 2009;512(5):664-87.
44. Liu J. The anatomy and physiology of direction-selective retinal ganglion cells. 2015.
45. Enroth-Cugell C, Robson JG. The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. *The Journal of physiology*. 1966;187(3):517-52.
46. Nelson R. *Ganglion Cell Physiology* by Ralph Nelson.
47. Kalloniatis M, Luu C. *Visual Acuity* by Michael Kalloniatis and Charles Luu. *Webvision The Organization of the Retina and Visual System*. 2007;5.
48. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4611-6.
49. Segura F, Sanchez-Cano A, Jarabo S, Lopez de la Fuente C, Cuenca N, Villegas-Perez MP, et al. Assessment of Visual and Chromatic Functions in a Rodent Model of Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6275-83.
50. Pérez-León JA, Brown RL. Las células con melanopsina: nuevos fotorreceptores en la retina de los vertebrados. *Revista de Educación Bioquímica*. 2009;28(1):9-18.
51. Van Gelder RN, Buhr ED. Ocular Photoreception for Circadian Rhythm Entrainment in Mammals. *Annu Rev Vis Sci*. 2016;2:153-69.
52. Rosenwasser AM, Turek FW. Neurobiology of circadian rhythm regulation. *Sleep Medicine Clinics*. 2015;10(4):403-12.
53. Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, et al. Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Progress in neurobiology*. 2010;92(4):484-504.

54. Yao J, Jia L, Shelby SJ, Ganos AM, Feathers K, Thompson DA, et al. Circadian and noncircadian modulation of autophagy in photoreceptors and retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(5):3237-46.
55. Gronfier C. Horloge circadienne et fonctions non visuelles: rôle de la lumière chez l'Homme. *Biologie Aujourd'hui*. 2014;208(4):261-7.
56. Debru C. *Neurofilosofía del sueño*: Editorial CSIC-CSIC Press; 2009.
57. Angelousi A, Kassi E, Nasiri-Ansari N, Weickert MO, Randeva H, Kaltsas G. Clock genes alterations and endocrine disorders. *European journal of clinical investigation*. 2018:e12927.
58. Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2018:1.
59. Ruan G-X, Zhang D-Q, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(25):9703-8.
60. Besharse JC, McMahon DG. The retina and other light-sensitive ocular clocks. *Journal of biological rhythms*. 2016;31(3):223-43.
61. McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2014;39:58-76.
62. Patiño MAL, Rodríguez-Illamola A, Conde-Sieira M, Soengas JL, Míguez JM. Daily rhythmic expression patterns of clock1a, bmal1, and per1 genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiology international*. 2011;28(5):381-9.
63. Schneider K, Tippmann S, Spiwox-Becker I, Holthues H, Wolloscheck T, Spatkowski G, et al. Unique clockwork in photoreceptor of rat. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(3):585-94.
64. Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, Yan L, Johnson M, Zhang D-Q, et al. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(20):7670-6.
65. Cugini P, Cruciani F, De Rosa R, Pellegrino A, Fontana S, Coda S, et al. Alterations of blood pressure and heart rate circadian rhythmic structure in non-blind patients affected by retinitis pigmentosa. *Journal of human hypertension*. 2001;15(8):577.
66. Pillai JA, Leverenz JB. Sleep and neurodegeneration: a critical appraisal. *Chest*. 2017;151(6):1375-86.
67. Videnovic A, Lazar AS, Barker RA, Overeem S. 'The clocks that time us'—circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(12):683.
68. Ionescu D, Driver HS, Heon E, Flanagan J, Shapiro CM. Sleep and daytime sleepiness in retinitis pigmentosa patients. *J Sleep Res*. 2001;10(4):329-35.
69. Boivin D, Boudreau P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. *Pathologie Biologie*. 2014;62(5):292-301.

70. Herren H, Guillemet S. Estudios sobre la educación de los niños y adolescentes ciegos, ambliopes y sordo-ciegos 1982.
71. Sanidad Md. [www.guiasalud.es](http://www.guiasalud.es)
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias de Retina. Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias de Retina. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud; 2017. Guías de Práctica Clínica en el SNS. 2017 [
72. Berson EL, Sandberg MA, Rosner B, Birch DG, Hanson AH. Natural course of retinitis pigmentosa over a three-year interval. *American journal of ophthalmology*. 1985;99(3):240-51.
73. Chaumet-Riffaud AE, Chaumet-Riffaud P, Cariou A, Devisme C, Audo I, Sahel J-A, et al. Impact of Retinitis Pigmentosa on Quality of Life, Mental Health, and Employment Among Young Adults. *American journal of ophthalmology*. 2017;177:169-74.
74. Ammann F, Klein D, Franceschetti A. Genetic and epidemiological investigations on pigmentary degeneration of the retina and allied disorders in Switzerland. *Journal of the neurological sciences*. 1965;2(2):183-96.
75. Puech B, Kostrubiec B, Hache J, Francois P. Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in the Northern France. *Journal francais d'ophtalmologie*. 1991;14(3):153-64.
76. Bunday S, Crews SJ. A study of retinitis pigmentosa in the City of Birmingham. I Prevalence. *Journal of medical genetics*. 1984;21(6):417-20.
77. Bunker CH, Berson EL, Bromley WC, Hayes RP, Roderick TH. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *American journal of ophthalmology*. 1984;97(3):357-65.
78. Xu L, Hu L, Ma K, Li J, Jonas J. Prevalence of retinitis pigmentosa in urban and rural adult Chinese: The Beijing Eye Study. *European journal of ophthalmology*. 2006;16(6):865-6.
79. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*. 2018.
80. Tamayo Fernández M, Bernal Villegas J. Alteraciones visuales y auditivas de origen genético. Editorial CEJA Bogotá Colombia. 2005.
81. van Huet R. Inherited retinal dystrophies. *Studies on the clinical and genetic characteristics*: [Sl: sn]; 2015.
82. Webster D. The aetiology of retinitis pigmentosa, with cases. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1878;2:495.
83. Kiss S, Damico FM, Young LH, editors. Ocular manifestations and treatment of syphilis. *Seminars in ophthalmology*; 2005: Taylor & Francis.
84. HYVÄRINEN L, ROVAMO J, LAURINEN P, PELTOMAA A. Contrast sensitivity function in evaluation of visual impairment due to retinitis pigmentosa. *Acta ophthalmologica*. 1981;59(5):763-73.

85. Lindberg CR, Fishman GA, Anderson RJ, Vasquez V. Contrast sensitivity in retinitis pigmentosa. *British Journal of Ophthalmology*. 1981;65(12):855-8.
86. Mirza RG, Jampol LM. White spot syndromes and related diseases. *Retina Fifth Edition*: Elsevier Inc.; 2012.
87. Villegas-Perez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 1998;392(1):58-77.
88. Li Z-Y, Possin DE, Milam AH. Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 1995;102(5):805-16.
89. Villegas-Pérez M, Lawrence J, Vidal-Sanz M, Lavail M, Lund R. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *Journal of Comparative Neurology*. 1998;392(1):58-77.
90. Valverde Pérez D. Análisis molecular de dos genes candidatos para la Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva: Universidade da Coruña; 1997.
91. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006;368(9549):1795-809.
92. Boughman J, Fishman G. A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *British Journal of Ophthalmology*. 1983;67(7):449-54.
93. Parmeggiani F. Editorial [Hot Topic: Clinics, Epidemiology and Genetics of Retinitis Pigmentosa (Guest Editor: Francesco Parmeggiani)]. *Current genomics*. 2011;12(4):236-7.
94. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB. Genetics of hearing loss: syndromic. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2015;48(6):1041-61.
95. Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. The Usher Syndrome, a Human Ciliopathy. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2018;235(3):273-80.
96. Weibrecht K, Goar WA, Pak T, Garrison JE, DeLuca AP, Stone EM, et al. Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye. *Medical Research Archives*. 2017;5(9).
97. Forsythe E, Beales PL. Bardet–Biedl syndrome. *European journal of human genetics*. 2013;21(1):8.
98. Forsythe E, Kenny J, Bacchelli C, Beales PL. Managing Bardet–Biedl Syndrome—Now and in the Future. *Frontiers in pediatrics*. 2018;6:23.
99. Daiger S, Sullivan L, Bowne S. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*. 2013;84(2):132-41.
100. 2013 RTRIN. <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/> [
101. D.N. Cooper EVB, P.D. Stenson, A.D. Phillips, K. Evans, S., Heywood MJH, M.M. Chapman, M.E. Mort, L. Azevedo and M. Mort. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

The Human Gene Mutation Database (**HGMD**®) [

102. Kaushal S, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biochemistry*. 1994;33(20):6121-8.
103. Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends in molecular medicine*. 2005;11(4):177-85.
104. Martinez-Navarrete G, Seiler MJ, Aramant RB, Fernandez-Sanchez L, Pinilla I, Cuenca N. Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats. *Exp Eye Res*. 2011;92(3):227-37.
105. Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ, Samali A. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(10):2025-39.
106. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013;1833(12):3460-70.
107. Shinde V. The unfolded protein response and calcium dysregulation in autosomal dominant retinitis pigmentosa animal models: The University of Alabama at Birmingham; 2015.
108. Sizova OS, Shinde VM, Lenox AR, Gorbatyuk MS. Modulation of cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors. *Cellular signalling*. 2014;26(4):665-72.
109. Choudhury S, Nashine S, Bhootada Y, Kunte MM, Gorbatyuk O, Lewin AS, et al. Modulation of the rate of retinal degeneration in T17M RHO mice by reprogramming the unfolded protein response. *Retinal Degenerative Diseases: Springer*; 2014. p. 455-62.
110. Chuang J-Z, Vega C, Jun W, Sung C-H. Structural and functional impairment of endocytic pathways by retinitis pigmentosa mutant rhodopsin-arrestin complexes. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(1):131-40.
111. Marsili S, Genini S, Sudharsan R, Gingrich J, Aguirre GD, Beltran WA. Exclusion of the unfolded protein response in light-induced retinal degeneration in the canine T4R RHO model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2015;10(2):e0115723.
112. Zhu L, Jang G-F, Jastrzebska B, Filipek S, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD, et al. A naturally occurring mutation of the opsin gene (T4R) in dogs affects glycosylation and stability of the G protein-coupled receptor. *Journal of biological Chemistry*. 2004;279(51):53828-39.
113. Andrés A, Garriga P, Manyosa J. Altered functionality in rhodopsin point mutants associated with retinitis pigmentosa. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;303(1):294-301.
114. Martinez-Fernandez de la Camara C, Salom D, Sequedo MD, Hervas D, Marin-Lambies C, Aller E, et al. Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2013;8(9):e74223.
115. Shen J, Yang X, Dong A, Petters RM, Peng YW, Wong F, et al. Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *J Cell Physiol*. 2005;203(3):457-64.



116. Campochiaro PA, Mir TA. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 2018;62:24-37.
117. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal.* 1984;219(1):1.
118. Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *Journal of pineal research.* 1995;18(4):222-6.
119. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373-99.
120. Mason H. Mechanisms of oxygen metabolism. *Science.* 1957;125(3259):1185-8.
121. Sakamoto K, Suzuki T, Takahashi K, Koguchi T, Hirayama T, Mori A, et al. Iron-chelating agents attenuate NMDA-Induced neuronal injury via reduction of oxidative stress in the rat retina. *Experimental eye research.* 2018;171:30-6.
122. Niki E. oxidant-specific biomarkers of oxidative stress. Association with atherosclerosis and implication for antioxidant effects. Elsevier; 2018.
123. Moncada S, Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology.* 2006;147(S1).
124. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free radical biology and medicine.* 2014;73:383-99.
125. Zanelli S, Naylor M, Kapur J. Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *Brain research.* 2009;1297:23-31.
126. Thirupathi A, Pinho RA. Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles. *Journal of physiology and biochemistry.* 2018:1-9.
127. Williams DL. Oxidative stress and the eye. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;38(1):179-92, vii.
128. Pinazo-Duran MD, Gallego-Pinazo R, Garcia-Medina JJ, Zanon-Moreno V, Nucci C, Dolz-Marco R, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging.* 2014;9:637-52.
129. Kanner J, German JB, Kinsella JE, Hultin HO. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition.* 1987;25(4):317-64.
130. Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1984;235(2):644-9.
131. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and physics of lipids.* 1987;44(2-4):175-89.
132. Poli G, Schaur RJ, Siems Wa, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews.* 2008;28(4):569-631.
133. Uchida K, Stadtman E. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1992;89(10):4544-8.



134. Mihalas BP, Iuliis GN, Redgrove KA, McLaughlin EA, Nixon B. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to oxidative stress-mediated deterioration of the ageing oocyte. *Scientific reports*. 2017;7(1):6247.
135. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(1):7-25.
136. Pizzimenti S, Ciamporcero ES, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in Physiology*. 2013;4:242.
137. Méx MI. estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Medicina Interna de México*. 2014;30(3).
138. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999;424(1):83-95.
139. Srour M, Bילו Y, Juma M, Irhimeh M. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2000;23(1):13-21.
140. Davies K, Goldberg A. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *Journal of biological Chemistry*. 1987;262(17):8220-6.
141. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of biological Chemistry*. 1987;262(20):9895-901.
142. Davies K, Lin S, Pacifici R. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *Journal of biological Chemistry*. 1987;262(20):9914-20.
143. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008;4(2):89.
144. Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J. The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *International journal of radiation biology*. 1988;54(2):131-50.
145. Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*. 1991;37(1-3):166-80.
146. Ling L-B, Chang Y, Liu C-W, Lai P-L, Hsu T. Oxidative stress intensity-related effects of cadmium (Cd) and paraquat (PQ) on UV-damaged-DNA binding and excision repair activities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*. 2017;167:10-8.
147. McCauley MJ, Furman L, Dietrich CA, Rouzina I, Núñez ME, Williams MC. Quantifying the stability of oxidatively damaged DNA by single-molecule DNA stretching. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(8):4033-43.
148. Szaflarska-Popławska A, Siomek A, Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Różalski R, Guz J, et al. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2010;19(8):1960-5.

149. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;574(1):58-66.
150. Sas K, Szabó E, Vécsei L. Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection. *Molecules*. 2018;23(1):191.
151. Richter C, Park J-W, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(17):6465-7.
152. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS letters*. 2018;592(5):728-42.
153. Nemmiche S. Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicological Sciences*. 2016;156(1):4-10.
154. Medda E, Minoprio A, Nisticò L, Bocca B, Simonelli V, D'Errico M, et al. The response to oxidative stress and metallomics analysis in a twin study: The role of the environment. *Free radical biology and medicine*. 2016;97:236-43.
155. Crescenzo R, Cigliano L, Mazzoli A, Cancelliere R, Carotenuto R, Tussellino M, et al. Early effects of a low fat, fructose-rich diet on liver metabolism, insulin signaling and oxidative stress in young and adult rats. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:411.
156. Wolf A, Trendelenburg C-F, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, et al. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;280(3):1328-34.
157. Koh ES, Kim S, Kim M, Hong YA, Shin SJ, Park CW, et al. D-β-Pinitol alleviates cyclosporine A-induced renal tubulointerstitial fibrosis via activating Sirt1 and Nrf2 antioxidant pathways. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(4):1826-34.
158. Latorre Pellicer A. Sistema OXPHOS: integración funcional de dos genomas. 2014.
159. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191(4784):144-8.
160. Okuno D, Iino R, Noji H. Rotation and structure of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. *The Journal of Biochemistry*. 2011;149(6):655-64.
161. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*. 2009;417(1):1-13.
162. Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO journal*. 2013;32(1):9-29.
163. Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, et al. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1995;1271(1):141-51.
164. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2010;1797(2):113-28.

165. Maleki S, Gopalakrishnan S, Ghanian Z, Sepehr R, Schmitt H, Eells JT, et al. Optical imaging of mitochondrial redox state in rodent model of retinitis pigmentosa. *Journal of biomedical optics*. 2013;18(1):016004.
166. Arango Rincón JC, Gámez Díaz LY, López Quintero JÁ. NADPH oxidase system: new challenges and perspectives. *Iatreia*. 2010;23(4):362-72.
167. Morré DJ, Brightman AO. NADH oxidase of plasma membranes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1991;23(3):469-89.
168. Aviello G, Knaus UG. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal immunology*. 2018:1.
169. Jha N, Ryu JJ, Choi EH, Kaushik NK. Generation and Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Induced by Plasma, Lasers, Chemical Agents, and Other Systems in Dentistry. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017.
170. Giardino G, Cicalese MP, Delmonte O, Migliavacca M, Palterer B, Loffredo L, et al. NADPH Oxidase Deficiency: A Multisystem Approach. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017.
171. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(2):532-53.
172. Donato MT. ¿ Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2004.
173. Konigsberg Fainstein M, Aguilar-Maldonado B. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. 2008. Report No.: 9707293217.
174. Quintanilha JCF, de Sousa VM, Visacri MB, Amaral LS, Santos RMM, Zambrano T, et al. Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2017;80(2):223-33.
175. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*. 2005;105(6):2253-78.
176. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;569(1):101-10.
177. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology and medicine*. 2008;44(5):723-38.
178. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric oxide*. 2010;23(1):1-11.
179. Berka V, Liu W, Wu G, Tsai A-L. Comparison of oxygen-induced radical intermediates in iNOS oxygenase domain with those from nNOS and eNOS. *Journal of inorganic biochemistry*. 2014;139:93-105.
180. Tekmen-Clark M, Gleason E. Nitric oxide production and the expression of two nitric oxide synthases in the avian retina. *Vis Neurosci*. 2013;30(3):91-103.
181. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*. 2001;357(3):593-615.

182. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. 1999;43(3):521-31.
183. Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:370-5.
184. Piotr Ź, Mateusz M, Danuta W. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of oral biology*. 2018.
185. Pérez N, Berrío A, Jaramillo JE, Urrego R, Arias MP. Exposure to cigarette smoke causes DNA damage in oropharyngeal tissue in dogs. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014;769:13-9.
186. Chen Z, Wang D, Liu X, Pei W, Li J, Cao Y, et al. Oxidative DNA damage is involved in cigarette smoke-induced lung injury in rats. *Environmental health and preventive medicine*. 2015;20(5):318.
187. Peak J, Peak M, Sikorski R, Jones C. INDUCTION OF DNA-PROTEIN CROSSLINKS IN HUMAN CELLS BY ULTRAVIOLET and VISIBLE RADIATIONS: ACTION SPECTRUM. *Photochemistry and photobiology*. 1985;41(3):295-302.
188. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(37):13765-70.
189. Sun Q, Long Z, Wu H, Liu Y, Wang L, Zhang X, et al. Effect of alcohol on diethylnitrosamine-induced hepatic toxicity: Critical role of ROS, lipid accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2015;67(10):491-8.
190. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
191. González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(40):14660.
192. Fini MA, Gaydos J, McNally A, Karoor V, Burnham EL. Alcohol abuse is associated with enhanced pulmonary and systemic xanthine oxidoreductase activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2017;313(6):L1047-L57.
193. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*. 2005;12(10):1161-208.
194. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
195. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
196. Bresciani G, da Cruz IBM, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in clinical chemistry*. 68: Elsevier; 2015. p. 87-130.

197. Pansarasa O, Bordoni M, Diamanti L, Sproviero D, Gagliardi S, Cereda C. SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis: "Ambivalent" Behavior Connected to the Disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5):1345.
198. Mansuroğlu B, Derman S, Yaba A, Kızılbaş K. Protective effect of chemically modified SOD on lipid peroxidation and antioxidant status in diabetic rats. *International journal of biological macromolecules*. 2015;72:79-87.
199. Candas D, Li JJ. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(10):1599-617.
200. Klotz MG, Klassen GR, Loewen PC. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular biology and evolution*. 1997;14(9):951-8.
201. Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004;61(2):192-208.
202. Nicholls P, Fita I, Loewen PC. *Enzymology and structure of catalases*. 2000.
203. Shi H-Y, Li Z-H, Zhang Y-X, Chen L, Xiang D-Y, Zhang Y-F. Two pear glutathione S-transferases genes are regulated during fruit development and involved in response to salicylic acid, auxin, and glucose signaling. *PLoS One*. 2014;9(2):e89926.
204. Aravindan V, Muthukumaravel S, Gunasekaran K. Interaction affinity of Delta and Epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector. *Journal of vector borne diseases*. 2014;51(1):8.
205. Fukami J-I. Metabolism of several insecticides by glutathione S-transferase. *Pharmacology & therapeutics*. 1980;10(3):473-514.
206. Xu ZB, Zou XP, Zhang N, Feng QL, Zheng SC. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect science*. 2015;22(4):503-11.
207. Benhar M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free radical biology and medicine*. 2018.
208. Sies H, Sharov VS, Klotz L-O, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations a new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *Journal of biological Chemistry*. 1997;272(44):27812-7.
209. Huang J-Q, Zhou J-C, Wu Y-Y, Ren F-Z, Lei XG. Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases. *Free radical biology and medicine*. 2018.
210. Arthur J. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;57(13-14):1825-35.
211. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews*. 2014;94(3):739-77.
212. Schirmer RH, Müller JG, Krauth - Siegel RL. Disulfide - reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angewandte Chemie International Edition*. 1995;34(2):141-54.

213. Kedrowski BL, Gutow JH, Stock G, Smith M, Jordan C, Masterson DS. Glutathione reductase activity with an oxidized methylated glutathione analog. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2014;29(4):491-4.
214. Venkatesh P, Satpal G, Verma L, Kumar TH, Garg S. Antioxidants: Basis concepts in relation to the eye. *Indian journal of Clinical Biochemistry*. 2001;16(1):9.
215. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*. 1997;2(4):152-9.
216. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Buren Lv, Wagner E, Wiseman S, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical research*. 2002;36(2):217-33.
217. Connor AM, Luby JJ, Tong CB, Finn CE, Hancock JF. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2002;127(1):89-97.
218. Moyer AM, Sun Z, Batzler AJ, Li L, Schaid DJ, Yang P, et al. Glutathione pathway genetic polymorphisms and lung cancer survival after platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2010;19(3):811-21.
219. Choi J, Liu R-M, Kundu RK, Sangiorgi F, Wu W, Maxson R, et al. Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *Journal of biological Chemistry*. 2000;275(5):3693-8.
220. Diaz-Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, Foyer CH. Glutathione—linking cell proliferation to oxidative stress. *Free radical biology and medicine*. 2015;89:1154-64.
221. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):42-59.
222. Chen Y, Dong H, Thompson D, Shertzer H, Nebert D, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food and chemical toxicology*. 2013;60:38-44.
223. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1985;25(1):715-44.
224. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual review of biochemistry*. 1983;52(1):711-60.
225. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of biological Chemistry*. 1988;263(33):17205-8.
226. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(5):3143-53.
227. Crane F. New functions for coenzyme Q. *Protoplasma*. 2000;213(3-4):127-33.
228. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(6):591-8.
229. Shukla S, Dubey KK. CoQ10 a super-vitamin: review on application and biosynthesis. *3 Biotech*. 2018;8(5):249.



230. Badria FA. Melatonin, serotonin, and tryptamine in some Egyptian food and medicinal plants. *Journal of medicinal food*. 2002;5(3):153-7.
231. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of pineal research*. 2003;34(1):75-8.
232. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8):16981-7004.
233. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free radical biology and medicine*. 2018.
234. Diplock A, Charuleux J-L, Crozier-Willi G, Kok F, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition*. 1998;80(S1):S77-S112.
235. Subramanian N. On the brain ascorbic acid and its importance in metabolism of biogenic amines. *Life sciences*. 1977;20(9):1479-84.
236. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;54(6):1147S-52S.
237. May JM, Harrison FE. Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(17):2068-83.
238. Pullar JM, Carr AC, Vissers M. The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients*. 2017;9(8):866.
239. Drouin G, Godin J-R, Pagé B. The genetics of vitamin C loss in vertebrates. *Current genomics*. 2011;12(5):371-8.
240. Benzie IF, Choi S-W. Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Advances in food and nutrition research*. 71: Elsevier; 2014. p. 1-53.
241. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*. 1999;13(10):1145-55.
242. Wong RS, Radhakrishnan AK. Tocotrienol research: past into present. *Nutrition reviews*. 2012;70(9):483-90.
243. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free radical biology and medicine*. 2014;72:76-90.
244. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(5):270-8.
245. Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M, Salas-Salvadó J. Dietary polyphenols, Mediterranean diet, prediabetes, and Type 2 diabetes: A narrative review of the evidence. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017.
246. Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 2011;125(2):288-306.

247. Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015.
248. Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):3350-76.
249. Keating E, Martel F. Antimetabolic effects of polyphenols in breast cancer cells: focus on glucose uptake and metabolism. *Frontiers in nutrition*. 2018;5:25.
250. Freysson A, Page G, Fauconneau B, Bilan AR. Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural regeneration research*. 2018;13(6):955.
251. Gildawie KR, Galli RL, Shukitt-Hale B, Carey AN. Protective Effects of Foods Containing Flavonoids on Age-Related Cognitive Decline. *Current nutrition reports*. 2018;7(2):39-48.
252. Mukherjee S, Das SK, Vasudevan D. Role of polyphenols in diet and nutrition-an updated review. *Current Nutrition & Food Science*. 2009;5(2):149-59.
253. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 2002;17(6):271-8.
254. Trueba GP, Sanchez GM. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm Bonaerense*. 2001;20(4):297-306.
255. Braicu C, Ladomery MR, Chedea VS, Irimie A, Berindan-Neagoe I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*. 2013;141(3):3282-9.
256. Jiang P, Sheng Y, Ji L. The age-related change of glutathione antioxidant system in mice liver. *Toxicology mechanisms and methods*. 2013;23(6):396-401.
257. Liu H, Wang H, Shen S, Hagen TM, LIU RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1019(1):346-9.
258. Miró Ò, Casademont J, Casals E, Perea M, Urbano-Márquez Á, Rustin P, et al. Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovascular research*. 2000;47(3):624-31.
259. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(18):10469-74.
260. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015;74:101-10.
261. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014;42(s3):S125-S52.



262. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(17):1216-22.
263. Group PS. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(3):176-83.
264. Louwese ES, Weverling GJ, Bossuyt PM, Meyjes FEP, de Jong JV. Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*. 1995;52(6):559-64.
265. Seddon JM, Christen WG, Manson J, LaMotte FS, Glynn RJ, Buring JE, et al. The use of vitamin supplements and the risk of cataract among US male physicians. *American Journal of Public Health*. 1994;84(5):788-92.
266. Institute NE. <https://nei.nih.gov/areds2> [Agosto 2018].
267. Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA*. 1994;272(18):1413-20.
268. Clinicaltrials.gov

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=AMD&term=Vitamin+A&cntry=&state=&city=&dis>  
t= [

269. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*. 1960;235:1992-7.
270. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*. 2014;71(16):2997-3025.
271. Pevet P, Klosen P, Felder-Schmittbuhl M. The hormone melatonin: Animal studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017.
272. Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and molecular biology international*. 1995;35(3):627-34.
273. Chen G, Huo Y, Tan D-X, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life sciences*. 2003;73(1):19-26.
274. Huang H, Wang Z, Weng S-J, Sun X-H, Yang X-L. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Progress in retinal and eye research*. 2013;32:64-87.
275. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 2015;61(2-3):77-84.
276. Vakkuri O, Rintamäki H, Leppäluoto J. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *Journal of endocrinology*. 1985;105(2):263-8.

277. Fukushige H, Fukuda Y, Tanaka M, Inami K, Wada K, Tsumura Y, et al. Effects of tryptophan-rich breakfast and light exposure during the daytime on melatonin secretion at night. *Journal of physiological anthropology*. 2014;33(1):33.
278. Wiechmann AF, Sherry DM. Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;300:211-42.
279. Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug discovery today*. 2014;19(9):1410-8.
280. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. *The FEBS journal*. 2006;273(13):2813-38.
281. Kim JH, Duffy JF. Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders in Older Adults. *Sleep Medicine Clinics*. 2017.
282. Duffy JF, Zitting K-M, Chinoy ED. Aging and circadian rhythms. *Sleep Medicine Clinics*. 2015;10(4):423-34.
283. Sharma M, Palacios-Bois J, Schwartz G, Iskandar H, Thakur M, Quirion R, et al. Circadian rhythms of melatonin and cortisol in aging. *Biological psychiatry*. 1989;25(3):305-19.
284. Zdanys KF, Steffens DC. Sleep disturbances in the elderly. *Psychiatric Clinics*. 2015;38(4):723-41.
285. Tan DX, Xu B, Zhou X, Reiter RJ. Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules*. 2018;23(2):301.
286. Rudnitskaya EA, Maksimova KY, Muraleva NA, Logvinov SV, Yanshole LV, Kolosova NG, et al. Beneficial effects of melatonin in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology*. 2015;16(3):303-16.
287. Saeed Y, Abbott SM. Circadian Disruption Associated with Alzheimer's Disease. *Current neurology and neuroscience reports*. 2017;17(4):29.
288. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry*. 1980;34(6):1761-3.
289. Reiter R, Rosales-Corral S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *Journal of periodontal research*. 2015;50(1):9-17.
290. Wurtman RJ, Waldhauser F, Lieberman HR. The secretion and effects of melatonin in humans. *The Pineal Gland and Its Endocrine Role*: Springer; 1983. p. 551-73.
291. Munoz-Hoyos A, Jaldo-Alba F, Molina-Carballo A, Rodriguez-Cabezas T, Molina-Font J, Acuna-Castroviejo D. Absence of plasma melatonin circadian rhythm during the first 72 hours of life in human infants. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993;77(3):699-703.
292. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British journal of pharmacology*. 2018.
293. Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ. La melatonina. *Investigación y ciencia*. 2007;373:30-8.

294. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2016;56:361-83.
295. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;351(2):152-66.
296. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-10.
297. Adi N, Mash DC, Ali Y, Singer C, Shehadeh L, Papapetropoulos S. Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Medical science monitor*. 2010;16(2):BR61-BR7.
298. Zlotos DP, Jockers R, Cecon E, Rivara S, Witt-Enderby PA. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;57(8):3161-85.
299. Ram P, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer T, Lai L, et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer letters*. 2002;179(2):141-50.
300. Brunner P, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *European Journal of Histochemistry*. 2009;50(4):311-6.
301. Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppäluoto J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life sciences*. 2005;76(10):1123-34.
302. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(12):1844-52.
303. Watson N, Diamandis T, Gonzales-Portillo C, Reyes S, Borlongan CV. Melatonin as an antioxidant for stroke neuroprotection. *Cell transplantation*. 2016;25(5):883-91.
304. Adamczyk-Sowa M, Pierzchala K, Sowa P, Mucha S, Sadowska-Bartosz I, Adamczyk J, et al. Melatonin acts as antioxidant and improves sleep in MS patients. *Neurochemical research*. 2014;39(8):1585-93.
305. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never - ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of pineal research*. 2007;42(1):28-42.
306. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of pineal research*. 2013;54(3):245-57.
307. Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*. 2005;165(1):139-49.
308. Jha PK, Challet E, Kalsbeek A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;418:74-88.

309. Kimball SR, Abbas A, Jefferson LS. Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras. *J Pineal Res.* 2008;44(4):379-86.
310. Guo Y, Wang J, Wang Z, Yang Y, Wang X, Duan Q. Melatonin protects N2a against ischemia/reperfusion injury through autophagy enhancement. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2010;30(1):1-7.
311. Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, García-Macia M, de Gonzalo-Calvo D, Oliveira PJ, et al. Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J Pineal Res.* 2012;52(1):80-92.
312. Xu GX, Xiao ZY, Xie MS, Feng YL, Guo J, Fu LX. [Protective effects of melatonin on cultural human retinal pigment epithelial cells against oxidative damage in vitro]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2009;45(6):528-32.
313. Osborne NN, Nash MS, Wood JP. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(12):2374-83.
314. Fu Y, Tang M, Fan Y, Zou H, Sun X, Xu X. Anti-apoptotic effects of melatonin in retinal pigment epithelial cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:1461-8.
315. Belforte NA, Moreno MC, de Zavalía N, Sande PH, Chianelli MS, Keller Sarmiento MI, et al. Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *J Pineal Res.* 2010;48(4):353-64.
316. Patschan D, Hildebrandt A, Rinneburger J, Wessels JT, Patschan S, Becker JU, et al. The hormone melatonin stimulates renoprotective effects of "early outgrowth" endothelial progenitor cells in acute ischemic kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(10):F1305-12.
317. Rastmanesh R. Potential of melatonin to treat or prevent age-related macular degeneration through stimulation of telomerase activity. *Med Hypotheses.* 2011;76(1):79-85.
318. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health-. *The American journal of clinical nutrition.* 2000;71(6):1698S-702S.
319. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2004;134(1):38-42.
320. Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen Z-Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *The Journal of nutrition.* 2001;131(9):2248-51.
321. Botten D, Fugallo G, Fraternali F, Molteni C. Structural Properties of Green Tea Catechins. *J Phys Chem B.* 2015;119(40):12860-7.
322. Johnson J, Bailey H, Mukhtar H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. *Phytomedicine.* 2010;17(1):3-13.
323. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition.* 2003;133(10):3275S-84S.

324. Yong Feng W. Metabolism of green tea catechins: an overview. *Current drug metabolism*. 2006;7(7):755-809.
325. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*. 2006;25(2):79-99.
326. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. 2003.
327. Adikesavan G, Vinayagam MM, Abdulrahman LA, Chinnasamy T. (–)-Epigallocatechin-gallate (EGCG) stabilize the mitochondrial enzymes and inhibits the apoptosis in cigarette smoke-induced myocardial dysfunction in rats. *Molecular biology reports*. 2013;40(12):6533-45.
328. Chakrawarti L, Agrawal R, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2016;26(8):907-16.
329. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(12):1807-21.
330. Lin Y-L, Lin J-K. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Molecular pharmacology*. 1997;52(3):465-72.
331. Ryan P, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCG and ECG with iron (III). *Journal of inorganic biochemistry*. 2007;101(4):585-93.
332. Lotito SB, Zhang W-J, Yang CS, Crozier A, Frei B. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free radical biology and medicine*. 2011;51(2):454-63.
333. Liu Q-M, Jiang J-G. Antioxidative activities of medicinal plants from TCM. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2012;12(11):1154-72.
334. Wang X, Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Han Y. *Traditional Chinese Medicine: Current State, Challenges, and Applications. Serum Pharmacochimistry of Traditional Chinese Medicine: Elsevier; 2017. p. 1-6.*
335. McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002;21(1):1-13.
336. Wu CD, Wei GX. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*. 2002;18(5):443-4.
337. Afzal M, Safer AM, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology*. 2015;23(4):151-61.
338. Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeanniton D, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(38):8807-14.
339. Chu KO, Chan KP, Yang YP, Qin YJ, Li WY, Chan SO, et al. Effects of EGCG content in green tea extract on pharmacokinetics, oxidative status and expression of

- inflammatory and apoptotic genes in the rat ocular tissues. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(11):1357-67.
340. Rhone M, Basu A. Phytochemicals and age-related eye diseases. *Nutrition reviews*. 2008;66(8):465-72.
341. Zhang B, Osborne NN. Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate. *Brain Res*. 2006;1124(1):176-87.
342. Li C-P, Yao J, Tao Z-F, Li X-M, Jiang Q, Yan B. Epigallocatechin-gallate (EGCG) regulates autophagy in human retinal pigment epithelial cells: a potential role for reducing UVB light-induced retinal damage. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;438(4):739-45.
343. Shen C, Chen L, Jiang L, Lai TY. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of chronic glaucoma. *Neuroscience letters*. 2015;600:132-6.
344. Zhang B, Rusciano D, Osborne NN. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. *Brain Res*. 2008;1198:141-52.
345. Silva KC, Rosales MA, Hamassaki DE, Saito KC, Faria AM, Ribeiro PA, et al. Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(2):1325-36.
346. Zhang B, Safa R, Rusciano D, Osborne NN. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain Res*. 2007;1159:40-53.
347. Peng PH, Ko ML, Chen CF. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity. *Exp Eye Res*. 2008;86(4):637-46.
348. Acuña Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(2):221-40.
349. Yeung HM, Hung MW, Fung ML. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats. *J Pineal Res*. 2008;45(4):373-82.
350. Fernández-Sánchez L, Lax P, Pinilla I, Martín-Nieto J, Cuenca N. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):4998-5008.
351. Sauve Y, Lu B, Lund RD. The relationship between full field electroretinogram and perimetry-like visual thresholds in RCS rats during photoreceptor degeneration and rescue by cell transplants. *Vision Res*. 2004;44(1):9-18.
352. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(13):2001-18.
353. Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J Biol Rhythms*. 1986;1(3):219-29.
354. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 1993;49(8):654-64.



355. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998;78(3):687-721.
356. Banaś I, Buntner B, Niebrój T, Ostrowska Z. [Levels of melatonin in serum of patients with retinitis pigmentosa]. *Klin Oczna.* 1995;97(11-12):321-3.
357. Lax P, Otalora BB, Esquivia G, Rol MeL, Madrid JA, Cuenca N. Circadian dysfunction in P23H rhodopsin transgenic rats: effects of exogenous melatonin. *J Pineal Res.* 2011;50(2):183-91.
358. Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol.* 2014;2:187-95.
359. Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. Health-promoting effects of green tea. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(3):88-101.
360. Chaudhury S, Ghosh I, Saha G, Dasgupta S. EGCG prevents tryptophan oxidation of cataractous ocular lens human  $\gamma$ -crystallin in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Int J Biol Macromol.* 2015;77:287-92.
361. Li CP, Yao J, Tao ZF, Li XM, Jiang Q, Yan B. Epigallocatechin-gallate (EGCG) regulates autophagy in human retinal pigment epithelial cells: a potential role for reducing UVB light-induced retinal damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438(4):739-45.
362. Xie J, Jiang L, Zhang T, Jin Y, Yang D, Chen F. Neuroprotective effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in optic nerve crush model in rats. *Neurosci Lett.* 2010;479(1):26-30.
363. Chen F, Jiang L, Shen C, Wan H, Xu L, Wang N, et al. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the adult rat retina. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(8):e609-15.
364. Shen C, Chen L, Jiang L, Lai TY. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of chronic glaucoma. *Neurosci Lett.* 2015;600:132-6.
365. Karthikeyan B, Harini L, Krishnakumar V, Kannan VR, Sundar K, Kathiresan T. Insights on the involvement of (-)-epigallocatechin gallate in ER stress-mediated apoptosis in age-related macular degeneration. *Apoptosis.* 2017;22(1):72-85.
366. al-Ubaidi MR, Pittler SJ, Champagne MS, Triantafyllos JT, McGinnis JF, Baehr W. Mouse opsin. Gene structure and molecular basis of multiple transcripts. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20563-9.
367. Machida S, Kondo M, Jamison JA, Khan NW, Kononen LT, Sugawara T, et al. P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(10):3200-9.
368. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2004;45(12):4611-6.
369. McGill TJ, Prusky GT, Douglas RM, Yasumura D, Matthes MT, Lowe RJ, et al. Discordant anatomical, electrophysiological, and visual behavioral profiles of retinal degeneration in rat models of retinal degenerative disease. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2012;53(10):6232-44.

370. McGill TJ, Prusky GT, Luna G, LaVail MM, Fisher SK, Lewis GP. Optomotor and immunohistochemical changes in the juvenile S334ter rat. *Experimental eye research*. 2012;104:65-73.
371. King JL, Wong AA, Brown RE. Age-Related Changes in the Spatial Frequency Threshold of Male and Female 3xTg-AD Mice Using OptoMotry. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;62(2):591-6.
372. Perlman I. *The electroretinogram: ERG*. 2007.
373. Frishman L. *Electroretinography*. 2009.
374. Perlman I. *The Electroretinogram: ERG by Ido Perlman*. Webvision: The Organization of the Retina and. 2015.
375. de León Vera M, Fariñas IM. La electroretinografía como método de diagnóstico en las especies canina y felinas: revisión bibliográfica. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*. 2005(2):58-65.
376. Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular: Editorial Médica Panamericana*; 2012.
377. Torres Soriano D. *Electrodiagnóstico: protocolo clínico y estandarización de Electroretinografía (ERG) y Potenciales Evocados Visuales (PEV) en el perro beagle: Universidad de Murcia*; 2010.
378. Pinilla I, Lund R, Sauve Y. Contribution of rod and cone pathways to the dark-adapted electroretinogram (ERG) b-wave following retinal degeneration in RCS rats. *Vision research*. 2004;44(21):2467-74.
379. Pinilla I, Lund R, Lu B, Sauve Y. Measuring the cone contribution to the ERG b-wave to assess function and predict anatomical rescue in RCS rats. *Vision research*. 2005;45(5):635-41.
380. Pinilla I, Lund R, Sauve Y. Enhanced cone dysfunction in rats homozygous for the P23H rhodopsin mutation. *Neuroscience letters*. 2005;382(1-2):16-21.
381. Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol*. 1978;72(1):131-60.
382. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
383. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology and medicine*. 1991;11(1):81-128.
384. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan J-C, Chaudiere J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*. 1998;11(10):1184-94.
385. Tenorio FA, del Valle L, Pastelín G. Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2005;36(1).



386. Heines SV. Peter Griess—Discoverer of diazo compounds. *Journal of Chemical Education*. 1958;35(4):187.
387. Aoyama K, Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):21021-44.
388. Aebi HE. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. 1983;3:273-86.
389. Meister A. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*: John Wiley & Sons; 2009.
390. Beyer Jr WF, Wang Y, Fridovich I. Phosphate inhibition of the copper-and zinc-containing superoxide dismutase: a reexamination. *Biochemistry*. 1986;25(20):6084-8.
391. Flohe L. [10] Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology*. 105: Elsevier; 1984. p. 93-104.
392. Lax P, Otalora BB, Esquiva G, Rol Mde L, Madrid JA, Cuenca N. Circadian dysfunction in P23H rhodopsin transgenic rats: effects of exogenous melatonin. *J Pineal Res*. 2011;50(2):183-91.
393. Lax P, Esquiva G, Fuentes-Broto L, Segura F, Sánchez-Cano A, Cuenca N, et al. Age-related changes in photosensitive melanopsin-expressing retinal ganglion cells correlate with circadian rhythm impairments in sighted and blind rats. *Chronobiology international*. 2016;33(4):374-91.
394. Rivas MA, Vecino E. Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa. *Histol Histopathol*. 2009;24(10):1295-322.
395. Chang B, Hawes N, Hurd R, Davisson M, Nusinowitz S, Heckenlively J. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision research*. 2002;42(4):517-25.
396. Slijkerman RW, Song F, Astuti GD, Huynen MA, van Wijk E, Stieger K, et al. The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. *Progress in retinal and eye research*. 2015;48:137-59.
397. Strettoi E. A survey of retinal remodeling. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:494.
398. Orhan E, Dalkara D, Neuille M, Lechauve C, Michiels C, Picaud S, et al. Genotypic and phenotypic characterization of P23H line 1 rat model. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127319.
399. LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA. Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Curr Eye Res*. 1987;6(6):825-34.
400. LaVail MM, Nishikawa S, Steinberg RH, Naash MI, Duncan JL, Trautmann N, et al. Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 2018;167:56-90.
401. Fernandez-Sanchez L, Lax P, Campello L, Pinilla I, Cuenca N. Astrocytes and Muller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:484.
402. Kniestedt C, Stamper RL. Visual acuity and its measurement. *Ophthalmology Clinics of North America*. 2003;16(2):155-70, v.

403. Tauber ES, Koffler S. Optomotor response in human infants to apparent motion: evidence of innateness. *Science*. 1966;152(3720):382-3.
404. Kline DW, Schieber F, Abusamra LC, Coyne AC. Age, the eye, and the visual channels: contrast sensitivity and response speed. *Journal of Gerontology*. 1983;38(2):211-6.
405. Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Sauve Y, Segura FJ, Martinez-Navarrete G, Tamarit JM, et al. Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front Neuroanat*. 2014;8:151.
406. Barabas P, Huang W, Chen H, Koehler CL, Howell G, John SW, et al. Missing optomotor head-turning reflex in the DBA/2J mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(9):6766-73.
407. Umino Y, Cuenca N, Everhart D, Fernandez-Sanchez L, Barlow RB, Solessio E. Partial rescue of retinal function in chronically hypoglycemic mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(2):915-23.
408. Perdices L, Fuentes-Broto L, Segura F, Gdara NB, Sánchez-Cano AI, Sánchez GI, et al. Hepatic oxidative stress in pigmented P23H rhodopsin transgenic rats with progressive retinal degeneration. *Free radical biology and medicine*. 2018.
409. Gramajo AL, Marquez G, Torres V, Juárez CP, Rosenstein RE, Luna J. Therapeutic benefit of melatonin in refractory central serous chorioretinopathy. *Eye*. 2015;29(8):1036.
410. Lv X, Liu S, Cao Z, Gong L, Feng X, Gao Q, et al. Correlation between serum melatonin and aMT6S level for age-related macular degeneration patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(20):4196-201.
411. Pescosolido N, Gatto V, Stefanucci A, Rusciano D. Oral treatment with the melatonin agonist agomelatine lowers the intraocular pressure of glaucoma patients. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2015;35(2):201-5.
412. Yi C, Pan X, Yan H, Guo M, Pierpaoli W. Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1057:384-92.
413. Iwai-Takekoshi L, Ramos A, Schaler A, Weinreb S, Blazeski R, Mason C. Retinal pigment epithelial integrity is compromised in the developing albino mouse retina. *J Comp Neurol*. 2016;524(18):3696-716.
414. Rapp LM, Williams TP. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res*. 1980;20(12):1127-31.
415. LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Yasumura D. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Prog Clin Biol Res*. 1987;247:439-54.
416. Ross JE, Clarke DD, Bron AJ. Effect of age on contrast sensitivity function: uniocular and binocular findings. *Br J Ophthalmol*. 1985;69(1):51-6.
417. Garcia GA, Khoshnevis M, Yee KMP, Nguyen JH, Nguyen-Cuu J, Sadun AA, et al. The effects of aging vitreous on contrast sensitivity function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018;256(5):919-25.

418. Elliott DB. Contrast sensitivity decline with ageing: a neural or optical phenomenon? *Ophthalmic Physiol Opt.* 1987;7(4):415-9.
419. Owsley C. Aging and vision. *Vision Res.* 2011;51(13):1610-22.
420. Sulkava S, Muggalla P, Sulkava R, Ollila HM, Peuralinna T, Myllykangas L, et al. Melatonin receptor type 1A gene linked to Alzheimer's disease in old age. *Sleep.* 2018;41(7).
421. Sarlak G, Jenwitheesuk A, Chetsawang B, Govitrapong P. Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(1):9-24.
422. Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res.* 2013;23(3):267-300.
423. Majidinia M, Reiter RJ, Shakouri SK, Yousefi B. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. *Ageing Res Rev.* 2018.
424. Chan CM, Huang JH, Chiang HS, Wu WB, Lin HH, Hong JY, et al. Effects of (-)-epigallocatechin gallate on RPE cell migration and adhesion. *Mol Vis.* 2010;16:586-95.
425. Fernandez-Sanchez L, Bravo-Osuna I, Lax P, Arranz-Romera A, Maneu V, Esteban-Perez S, et al. Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration and vision loss in P23H rats. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177998.
426. Chrysostomou V, Stone J, Valter K. Life history of cones in the rhodopsin-mutant P23H-3 rat: evidence of long-term survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(5):2407-16.
427. Rayapudi S, Schwartz SG, Wang X, Chavis P. Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(12):CD008428.
428. Nagai N, Iwata S, Kaji H, Sampei K, Katsukura Y, Onami H, et al. Protective effects of sustained transscleral unoprostone delivery against retinal degeneration in S334ter rhodopsin mutant rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016;104(8):1730-7.
429. Hoffman DR, Hughbanks-Wheaton DK, Pearson NS, Fish GE, Spencer R, Takacs A, et al. Four-year placebo-controlled trial of docosahexaenoic acid in X-linked retinitis pigmentosa (DHAX trial): a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(7):866-73.
430. Hanif AM, Kim MK, Thomas JG, Ciavatta VT, Chrenek M, Hetling JR, et al. Whole-eye electrical stimulation therapy preserves visual function and structure in P23H-1 rats. *Exp Eye Res.* 2016;149:75-83.
431. Lavoie J, Rosolen SG, Chalier C, Hébert M. Negative impact of melatonin ingestion on the photopic electroretinogram of dogs. *Neuroscience letters.* 2013;543:78-83.
432. Cuesta M, Clesse D, Pévet P, Challet E. From daily behavior to hormonal and neurotransmitters rhythms: comparison between diurnal and nocturnal rat species. *Hormones and behavior.* 2009;55(2):338-47.

433. Zhang B, Rusciano D, Osborne NN. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. *Brain research*. 2008;1198:141-52.
434. Qi S, Wang C, Song D, Song Y, Dunaief JL. Intraperitoneal injection of (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Molecular vision*. 2017;23:171.
435. Ren JL, Yu QX, Liang WC, Leung PY, Ng TK, Chu WK, et al. Green tea extract attenuates LPS-induced retinal inflammation in rats. *Scientific reports*. 2018;8(1):429.
436. Arroba AI, Campos-Caro A, Aguilar-Diosdado M, Valverde AM. IGF-1, Inflammation and Retinal Degeneration: a close network. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:203.
437. Rutar M, Natoli R, Chia R, Valter K, Provis JM. Chemokine-mediated inflammation in the degenerating retina is coordinated by Müller cells, activated microglia, and retinal pigment epithelium. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12(1):8.
438. Mohand-Said S, Deudon-Combe A, Hicks D, Simonutti M, Forster V, Fintz A-C, et al. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(14):8357-62.
439. Yu D-Y, Cringle SJ, Su E-N, Paula KY. Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3999-4006.
440. Chrysostomou V, Valter K, Stone J. Cone–Rod Dependence in the Rat Retina: Variation with the Rate of Rod Damage. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(6):3017-23.
441. Yu DY, Cringle S, Valter K, Walsh N, Lee D, Stone J. Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(6):2013-9.
442. Aleman TS, LaVail MM, Montemayor R, Ying G, Maguire MM, Laties AM, et al. Augmented rod bipolar cell function in partial receptor loss: an ERG study in P23H rhodopsin transgenic and aging normal rats. *Vision Res*. 2001;41(21):2779-97.
443. Naash MI, Ripps H, Li S, Goto Y, Peachey NS. Polygenic disease and retinitis pigmentosa: albinism exacerbates photoreceptor degeneration induced by the expression of a mutant opsin in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. 1996;16(24):7853-8.
444. Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW, Prusky GT. Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Vis Neurosci*. 2005;22(5):677-84.
445. Lucas-Sánchez A, Martínez-Nicolas A, Escames G, de Costa J. Envejecimiento del sistema circadiano. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 2012;47(2):76-80.
446. Aubin S, Gacon C, Jennum P, Ptito M, Kupers R. Altered sleep–wake patterns in blindness: a combined actigraphy and psychometric study. *Sleep medicine*. 2016;24:100-8.

447. Uchiyama M, Lockley SW. Non-24-hour sleep-wake rhythm disorder in sighted and blind patients. *Sleep Medicine Clinics*. 2015;10(4):495-516.
448. Abbott KS, Queener HM, Ostrin LA. The ipRGC-Driven Pupil Response with Light Exposure, Refractive Error, and Sleep. *Optom Vis Sci*. 2018;95(4):323-31.
449. Esquivá G, Lax P, Cuenca N. Impairment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells associated with late stages of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):4605-18.
450. Vartanian GV, Li BY, Chervenak AP, Walch OJ, Pack W, Ala-Laurila P, et al. Melatonin Suppression by Light in Humans Is More Sensitive Than Previously Reported. *J Biol Rhythms*. 2015;30(4):351-4.
451. Ostrin LA. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin Exp Optom*. 2018.
452. Mi Y, Qi G, Fan R, Ji X, Liu Z, Liu X. EGCG ameliorates diet-induced metabolic syndrome associating with the circadian clock. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(6):1575-89.
453. Park K-S, Han J-Y, Moon D-C, Hong JT, Oh K-W. (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate Augments Pentobarbital-Induced Sleeping Behaviors Through Cl<sup>-</sup> Channel Activation. *Journal of medicinal food*. 2011;14(11):1456-62.
454. Han J-Y, Moon Y-J, Han J-H, Kim J-H, Woo J-H, Yoo H-S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) attenuates the hemodynamics stimulated by caffeine through decrease of catecholamines release. *Archives of pharmacal research*. 2016;39(9):1307-12.
455. Moreno ML, Mérida S, Bosch-Morell F, Miranda M, Villar VM. Autophagy Dysfunction and Oxidative Stress, Two Related Mechanisms Implicated in Retinitis Pigmentosa. *Front Physiol*. 2018;9:1008.
456. Wang P, Xie K, Wang C, Bi J. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 2014;72(3-4):249-54.
457. Chiurchiù V. Novel targets in multiple sclerosis: to oxidative stress and beyond. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(22):2590-9.
458. D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:509-27.
459. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017;39(1):73-82.
460. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature medicine*. 2004;10(7):S18.
461. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000;45(2):115-34.
462. Yu D-Y, Cringle S, Valter K, Walsh N, Lee D, Stone J. Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(6):2013-9.

463. Wang N, Anderson RE. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from rat retinal pigment epithelium to rod outer segments. *Current eye research*. 1992;11(8):783-91.
464. Liu Y, Tipoe GL, Fung ML. Melatonin attenuates intermittent hypoxia-induced lipid peroxidation and local inflammation in rat adrenal medulla. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(10):18437-52.
465. Manikonda PK, Jagota A. Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology*. 2012;13(5):511-24.
466. Álvarez-Diduk Rn, Galano A, Tan DX, Reiter RJ. N-Acetylserotonin and 6-hydroxymelatonin against oxidative stress: Implications for the overall protection exerted by melatonin. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015;119(27):8535-43.
467. Oršolić N, Sirovina D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Jembrek MJ, Kosalec I. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013;757(1):36-44.
468. Ueda T, Ueda T, Armstrong D. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic research*. 1996;28(3):184-92.
469. Oršolić N, Sirovina D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Jazvinščak Jembrek M, Kosalec I. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG). *Mutat Res*. 2013;757(1):36-44.
470. Higuchi A, Yonemitsu K, Koreeda A, Tsunenari S. Inhibitory activity of epigallocatechin gallate (EGCg) in paraquat-induced microsomal lipid peroxidation--a mechanism of protective effects of EGCg against paraquat toxicity. *Toxicology*. 2003;183(1-3):143-9.
471. Nacerai H, Gregory T, Sihem B, Salah A, Souhila AB. GREEN TEA BEVERAGE AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE ATTENUATE NICOTINE CARDIOCYTOTOXICITY IN RAT. *Acta Pol Pharm*. 2017;74(1):277-87.
472. Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, Reuhl KR, Ju J, Yang CS. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food and chemical toxicology*. 2010;48(1):409-16.
473. James KD, Forester SC, Lambert JD. Dietary pretreatment with green tea polyphenol,(-)-epigallocatechin-3-gallate reduces the bioavailability and hepatotoxicity of subsequent oral bolus doses of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Food and chemical toxicology*. 2015;76:103-8.
474. Ugarte N, Petropoulos I, Friguet B. Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13(4):539-49.
475. Huggins T, Staton M, Dyer D, Detorie N, Walla M, Baynes J, et al. o-Tyrosine and Dityrosine Concentrations in Oxidized Proteins and Lens Proteins with Age a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;663(1):436-7.
476. Reeg S, Grune T. Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxidants & redox signaling*. 2015;23(3):239-55.



477. Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2001;56(11):B459-B67.
478. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan D-X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2009;44(4):175-200.
479. Blanco S, Hernández R, Franchelli G, Ramos-Álvarez MM, Peinado MÁ. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric oxide*. 2017;62:32-43.
480. Akcay YD, Yalcin A, Sozmen E. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(2):321-9.
481. Aydogan S, Yerer MB, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(3):281-7.
482. Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol*. 2006;41(11):1165-73.
483. Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, et al. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res*. 2009;87(13):3002-10.
484. Djordjevic B, Cvetkovic T, Stoimenov TJ, Despotovic M, Zivanovic S, Basic J, et al. Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase, VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin/nicotinamide induced pre-diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2018;833:290-7.
485. Fan W, He Y, Guan X, Gu W, Wu Z, Zhu X, et al. Involvement of the nitric oxide in melatonin-mediated protection against injury. *Life Sci*. 2018;200:142-7.
486. Fatima S, Al-Mohaimed N, Al-Shaikh Y, Tyagi P, Banu N, Hasan S, et al. Combined treatment of epigallocatechin gallate and Coenzyme Q10 attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity via suppression of oxidative/nitrosative stress, inflammation and cellular damage. *Food and chemical toxicology*. 2016;94:213-20.
487. Guo BC, Wei J, Su KH, Chiang AN, Zhao JF, Chen HY, et al. Transient receptor potential vanilloid type 1 is vital for (-)-epigallocatechin-3-gallate mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59(4):646-57.
488. Trachsel-Moncho L, Benlloch-Navarro S, Fernández-Carbonell Á, Ramírez-Lamelas DT, Olivar T, Silvestre D, et al. Oxidative stress and autophagy-related changes during retinal degeneration and development. *Cell Death Dis*. 2018;9(8):812.
489. Oliveira PVS, Laurindo FRM. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(12):1257-80.

490. Sentellas S, Morales-Ibanez O, Zanuy M, Albertí JJ. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(5):1006-15.
491. Uys JD, Mulholland PJ, Townsend DM. Glutathione and redox signaling in substance abuse. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(6):799-807.
492. Carpi-Santos R, Ferreira MJ, Pereira Netto AD, Giestal-de-Araujo E, Ventura AL, Cossenza M, et al. Early changes in system [Formula: see text] and glutathione in the retina of diabetic rats. *Exp Eye Res*. 2016;146:35-42.
493. Guzman DC, Olguin HJ, Garcia EH, Peraza AV, de la Cruz DZ, Soto MP. Mechanisms involved in the development of diabetic retinopathy induced by oxidative stress. *Redox Rep*. 2017;22(1):10-6.
494. Campochiaro PA, Strauss RW, Lu L, Hafiz G, Wolfson Y, Shah SM, et al. Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa? *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(7):643-8.
495. Sánchez-Vallejo V, Benlloch-Navarro S, Trachsel-Moncho L, López-Pedrajas R, Almansa I, Romero FJ, et al. Alterations in glutamate cysteine ligase content in the retina of two retinitis pigmentosa animal models. *Free Radic Biol Med*. 2016;96:245-54.
496. Kurhaluk N, Szarmach A, Zaitseva OV, Sliuta A, Kyriienko S, Winklewski PJ. Effects of melatonin on low dose lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the mouse liver, muscle and kidney. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018.
497. Siew-Keah L, Sundaram A, Sirajudeen KN, Zakaria R, Singh HJ. Effect of melatonin supplementation and cross-fostering on renal glutathione system and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Biochem*. 2014;70(1):73-9.
498. Maurya PK, Rizvi SI. Protective role of tea catechins on erythrocytes subjected to oxidative stress during human aging. *Nat Prod Res*. 2009;23(12):1072-9.
499. Kaneko Y, Rao NA. Mitochondrial oxidative stress initiates visual loss in sympathetic ophthalmia. *Jpn J Ophthalmol*. 2012;56(3):191-7.
500. Kruk J, Kubasik-Kladna K, Y Aboul-Enein H. The role oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases: current status and a dual role of physical activity. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2016;16(3):241-57.
501. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:201-18.
502. Blasiak J, Petrovski G, Veréb Z, Facskó A, Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int*. 2014;2014:768026.
503. Chrysostomou V, Rezanian F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(1):12-5.
504. Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J Pineal Res*. 2015;59(3):292-307.



505. Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, Hosseinzadeh A, Reiter RJ, Safa M, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 2018;193:20-33.
506. Cao G, Chen M, Song Q, Liu Y, Xie L, Han Y, et al. EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK1/c-Jun pathway in ARPE19 cells. *Mol Med Rep.* 2012;5(1):54-9.
507. Goth L, Nagy T. Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2013;753(2):147-54.
508. Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, et al. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 2018;17:297-314.
509. Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2012;37(8):1601-14.
510. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2007;39(1):44-84.
511. Mrowicka M, Mrowicki J, Szaflik JP, Szaflik M, Ulinska M, Szaflik J, et al. Analysis of antioxidative factors related to AMD risk development in the polish patients. *Acta Ophthalmol.* 2017;95(5):530-6.
512. Yildirim O, Ateş NA, Tamer L, Muşlu N, Ercan B, Atik U, et al. Changes in antioxidant enzyme activity and malondialdehyde level in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica.* 2004;218(3):202-6.
513. Suresh DR, Annam V, Pratibha K, Prasad BV. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci.* 2009;16:61.
514. Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2009;64(11):750-9.
515. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2008;1780(11):1362-7.
516. Mayo JC, Tan D-X, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free radical research.* 2003;37(5):543-53.
517. Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, Chakraborty SB. Melatonin ameliorates H. *Biol Res.* 2018;51(1):17.
518. Zhao Z, Lu C, Li T, Wang W, Ye W, Zeng R, et al. The protective effect of melatonin on brain ischemia and reperfusion in rats and humans: in vivo assessment and a randomized controlled trial. *J Pineal Res.* 2018:e12521.

519. Han SG, Han SS, Toborek M, Hennig B. EGCG protects endothelial cells against PCB 126-induced inflammation through inhibition of AhR and induction of Nrf2-regulated genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;261(2):181-8.
520. Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(3):744-54.
521. Velavan B, Divya T, Sureshkumar A, Sudhandiran G. Nano-chemotherapeutic efficacy of (-)-epigallocatechin 3-gallate mediating apoptosis in A549 cells: Involvement of reactive oxygen species mediated Nrf2/Keap1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(3):1723-31.
522. Han XD, Zhang YY, Wang KL, Huang YP, Yang ZB, Liu Z. The involvement of Nrf2 in the protective effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on NaAsO. *Oncotarget.* 2017;8(39):65302-12.
523. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275(21):16023-9.
524. Chou FP, Chu YC, Hsu JD, Chiang HC, Wang CJ. Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(5):643-50.
525. Li YM, Chan HYE, Huang Y, Chen ZY. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Molecular nutrition & food research.* 2007;51(5):546-54.
526. Feng B, Fang Y, Wei SM. Effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against the hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts. *J Cosmet Sci.* 2013;64(1):35-44.
527. Karamese M, Guvendi B, Karamese SA, Cinar I, Can S, Erol HS, et al. The protective effects of epigallocatechin gallate on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity: an in vitro study on Hep3B cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(5):483-9.
528. Pal S, Dey SK, Saha C. Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: a biophysical approach. *PLoS One.* 2014;9(7):e102460.
529. Barchas J, DaCosta F, Spector S. Acute pharmacology of melatonin. *Nature.* 1967;214(5091):919-20.
530. Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR, Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res.* 2000;29(4):193-200.
531. Wade AG, Farmer M, Harari G, Fund N, Laudon M, Nir T, et al. Add-on prolonged-release melatonin for cognitive function and sleep in mild to moderate Alzheimer's disease: a 6-month, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Clin Interv Aging.* 2014;9:947-61.
532. Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig.* 2016;36(3):169-75.

533. Grima NA, Rajaratnam SMW, Mansfield D, Sletten TL, Spitz G, Ponsford JL. Efficacy of melatonin for sleep disturbance following traumatic brain injury: a randomised controlled trial. *BMC Med.* 2018;16(1):8.
534. Ortiz-Franco M, Planells E, Quintero B, Acuña-Castroviejo D, Rusanova I, Escames G, et al. Effect of Melatonin Supplementation on Antioxidant Status and DNA Damage in High Intensity Trained Athletes. *Int J Sports Med.* 2017;38(14):1117-25.
535. Wasdell MB, Jan JE, Bomben MM, Freeman RD, Rietveld WJ, Tai J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of controlled release melatonin treatment of delayed sleep phase syndrome and impaired sleep maintenance in children with neurodevelopmental disabilities. *J Pineal Res.* 2008;44(1):57-64.
536. Amstrup AK, Sikjaer T, Mosekilde L, Rejnmark L. The effect of melatonin treatment on postural stability, muscle strength, and quality of life and sleep in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Nutr J.* 2015;14:102.
537. Mereles D, Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):5592-603.
538. Bonkovsky HL. Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese green tea (*Camellia sinensis*). *Ann Intern Med.* 2006;144(1):68-71.
539. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(10 Pt 1):1025-32.
540. Fernandes RC, Araújo VA, Giglio BM, Marini ACB, Mota JF, Teixeira KS, et al. Acute Epigallocatechin 3 Gallate (EGCG) Supplementation Delays Gastric Emptying in Healthy Women: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Study. *Nutrients.* 2018;10(8).
541. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3312-9.
542. Most J, Timmers S, Warnke I, Jocken JW, van Boekschoten M, de Groot P, et al. Combined epigallocatechin-3-gallate and resveratrol supplementation for 12 wk increases mitochondrial capacity and fat oxidation, but not insulin sensitivity, in obese humans: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(1):215-27.
543. Marik PE, Flemmer M. Do dietary supplements have beneficial health effects in industrialized nations: what is the evidence? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* 2012;36(2):159-68.
544. Jerome-Morais A, Diamond AM, Wright ME. Dietary supplements and human health: for better or for worse? *Molecular nutrition & food research.* 2011;55(1):122-35.
545. Mathes A, Bellanger R. Herbs and other dietary supplements: current regulations and recommendations for use to maintain health in the management of the common cold or other related infectious respiratory illnesses. *Journal of pharmacy practice.* 2010;23(2):117-27.

546. Chuang JI, Chang TY, Liu HS. Glutathione depletion-induced apoptosis of Ha-ras-transformed NIH3T3 cells can be prevented by melatonin. *Oncogene*. 2003;22(9):1349-57.
547. Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(4):185-93.
548. Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J*. 1999;13(12):1537-46.
549. Jiang T, Chang Q, Cai J, Fan J, Zhang X, Xu G. Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3528274.
550. Sande PH, Dorfman D, Fernandez DC, Chianelli M, Dominguez Rubio AP, Franchi AM, et al. Treatment with melatonin after onset of experimental uveitis attenuates ocular inflammation. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5696-707.
551. Jiang T, Chang Q, Zhao Z, Yan S, Wang L, Cai J, et al. Melatonin-mediated cytoprotection against hyperglycemic injury in Müller cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e50661.
552. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;64(4):517-26.
553. Barsacchi R, Kusmic C, Damiani E, Carloni P, Greci L, Donato L. Vitamin E consumption induced by oxidative stress in red blood cells is enhanced by melatonin and reduced by N-acetylserotonin. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(7-8):1187-92.
554. Radogna F, Paternoster L, De Nicola M, Cerella C, Ammendola S, Bedini A, et al. Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;239(1):37-45.
555. Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci*. 2000;68(4):387-99.
556. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of pineal research*. 2014;57(2):131-46.
557. Wölfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K, Liebmann PM. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett*. 2001;502(3):127-31.
558. Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodriguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;108(1):14-20.
559. Wang D, Wang Y, Wan X, Yang CS, Zhang J. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate triggered hepatotoxicity in mice: responses of major antioxidant enzymes and the Nrf2 rescue pathway. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;283(1):65-74.