



UNIVERSIDAD
AUSTRAL

**CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

Universidad Austral

Facultad de Ciencias Biomédicas

**Rol de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) y
sus polifenoles en la prevención de las
lesiones del epitelio pigmentario de la retina
(EPR) asociadas a estrés oxidativo**

Tesis doctoral

Lic. Pablo Sebastián Tate

2022



I I M T

IIMT-CONICET

Universidad Austral

Facultad de Ciencias Biomédicas

**Rol de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) y
sus polifenoles en la prevención de las
lesiones del epitelio pigmentario de la retina
(EPR) asociadas a estrés oxidativo**

Tesis doctoral

Lic. Pablo Sebastián Tate

Directora: Dra. Angela M. Suburo

Laboratorio de Medicina Celular y Molecular

2022

Dedicado a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional y a la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral por concederme el espacio para realizar mi trabajo de tesis y por permitirme formar parte del plantel docente de la Carrera de Medicina de dicha Universidad.

A la Doctora Angela Suburo sin la cual el trabajo no podría haberse realizado. Muchas gracias por guiarme estos años y por la buena predisposición a escuchar y debatir ideas ayudándome a mejorar como persona y como científico. Gracias también por la confianza depositada en mi en mis tareas como docente no sólo en la cátedra de Histología sino también (y sobre todo) en los cursos de ingreso y de verano.

A los demás miembros del laboratorio, Mariela, Bachor por el apoyo y sobre todo a Meli, por ayudarme en prácticamente todo y por estar siempre dispuesta a aconsejarme. Es bueno trabajar con gente con la que uno puede contar.

Al resto de los becarios, a los que estaban y ya no están, a los que no estaban y llegaron después y a los que no estaban y ya no están. Gracias por los mates en las horas de incubación, por las risas compartidas y también por la ayuda y las ideas sobre mi trabajo, porque sí, aunque a veces no parezca, también hablamos de ciencia.

Imposible no agradecer también a Norma y Rodri que estuvieron siempre dando una mano, compartiendo y acompañando.

A Romina, a pesar de que es muy difícil expresar todo con palabras, no puedo no agradecerte. Por todo, por la compañía, el oído y por estar siempre, sin importar el contexto, ahí, al lado, siempre viendo cómo o en qué me podías ayudar.

A mis amigos de la vida pre-doctoral, Mili, Gonza, Vir, Ari y Pedro, por el aguante estos años, por escuchar quejas y frustraciones y por hacerme reír incluso cuando no tenía ganas. También fueron de mucha ayuda sus consejos/opiniones en más de una ocasión.

Por último, pero para nada menos importante, a mi familia a quien va dedicada esta Tesis. A mis padres por el apoyo incondicional, con discusiones y todo, lo que soy es gracias a ustedes y aunque a veces no tenga paciencia, sé que puedo contar con ustedes siempre, pase lo que pase. A mi hermana Laura y a Rocío, mi hermanita que ya no es para nada hermanita. Si hubo alguien que me aguantó y aguantó fuiste y sos vos, a veces dando consejos útiles y a veces sin entender nada de lo que me estoy quejando, pero siempre ahí con el mate y algún que otro reto, a veces mutuo, a veces no. Muchas gracias Ro.

RESUMEN

Los nutrientes son las sustancias químicas contenidas en los alimentos que consumimos y que proveen la energía necesaria para realizar todo tipo de función vital y tener una vida sana. Los alimentos no solo son fuentes de energía y de las moléculas estructurales que forman los organismos, sino que además pueden proporcionar otras moléculas que poseen efectos beneficiosos para la salud sin necesariamente contribuir al pool energético. Estos alimentos, cuyo estudio es de gran actualidad, son conocidos como alimentos funcionales. Esta categoría incluye alimentos y bebidas con alto contenido de ciertos compuestos fenólicos, una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, con una importante actividad antioxidante, que han demostrado la capacidad de contribuir a la prevención de algunas enfermedades crónicas.

Muchas enfermedades crónicas se asocian con el envejecimiento. Entre ellas se encuentra la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que ha superado a las cataratas como la principal causa de pérdida de visión en países desarrollados. La DMAE es una enfermedad multifactorial. Aunque su etiopatogenia no está totalmente aclarada, se asocia con fallas en el control del estrés oxidativo que es fisiológicamente muy elevado en la retina externa y su epitelio pigmentario. La pérdida del control antioxidante, atribuible a diversas condiciones genéticas y ambientales, se asocia con lesiones celulares bien definidas: alteraciones del tráfico intracelular, muerte celular y senescencia. Estas constituyen un importante mecanismo patogénico en ambas formas de la DMAE, la neovascular y la atrófica. Por otra parte, se ha demostrado que el consumo de antioxidantes reduce el desarrollo de la DMAE avanzada.

La yerba mate (*ilex paraguariensis*, YM) es una planta nativa de Sudamérica cultivada y consumida en diversos países de la región en forma de infusiones. Numerosos reportes indican un efecto beneficioso del consumo de la YM en diversas enfermedades asociadas a un aumento del estrés oxidativo como hiperlipidemia, aterogénesis, cáncer, condiciones inflamatorias, obesidad y diabetes. Estos efectos benéficos son atribuidos precisamente a su alto contenido de polifenoles, entre los que se encuentran los ácidos cafeico y clorogénico (CAF y CHL respectivamente). Dado que el consumo de YM puede proporcionar cantidades significativas de estos antioxidantes, la principal finalidad de esta tesis es investigar los efectos de la YM, y los ácidos CAF y CHL aislados en dos modelos de DMAE, uno *in vitro* y otro *in vivo*.

En los experimentos *in vitro*, los cultivos de la línea celular ARPE-19 fueron tratados con YM, CAF y CHL antes de ser expuestos a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno. En todos los casos se observó un efecto protector, asociado a la disminución de especies reactivas de oxígeno (EROs) intracelulares y del daño al ADN, junto con un significativo incremento en la expresión de moléculas pertenecientes a diversas vías de protección celular y de defensa antioxidante. En los experimentos *in vivo*, se administró un extracto soluble de YM a ratones de la cepa C57Bl/6 antes de generar daño oxidativo utilizando iodato de sodio (NaIO₃, SI). En el EPR, YM indujo un incremento en la expresión de genes vitales para el funcionamiento celular y para la defensa antioxidante. Es decir, que la YM y sus polifenoles generaron una mayor eficiencia del tejido para el manejo del daño oxidativo, previniendo las alteraciones morfológicas y funcionales del EPR, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Nuestros datos experimentales sugieren que el consumo de YM, de alta aceptación en la población de nuestro país, al igual que productos nutracéuticos derivados de la misma, podrían reducir el avance de la DMAE. Sin embargo, se requieren mayores investigaciones, especialmente estudios epidemiológicos, para verificar esta hipótesis.

ABSTRACT

Nutrients are chemical substances present in food which provide the energy to perform all kinds of vital functions and allow us to have a healthy life. Food is not only a source of energy and structural molecules that make up organisms, but It can also provide other molecules that have beneficial effects on health without necessarily contributing to the energy pool. Food that provides these beneficial effects, are known as functional foods. This category includes food and beverages with a high content of certain phenolic compounds, one of the main classes of secondary metabolites of plants, with an important antioxidant activity, which have been shown to contribute to the prevention of some chronic diseases.

Many chronic diseases are associated with aging. Among them is age-related macular degeneration (AMD), which has overtaken cataracts as the leading cause of vision loss in developed countries. AMD is a multifactorial disease. Although the etiopathogenesis is not fully clarified, it is associated with failures in the control of oxidative stress, which is physiologically very high in the external retina and its pigment epithelium. Loss of antioxidant control, due to various genetic and environmental conditions, is associated with well-defined cell lesions: alterations in intracellular traffic, cell death and senescence, which constitute an important pathogenetic mechanism in both forms of AMD, neovascular and atrophic. Furthermore, the consumption of antioxidants has been shown to reduce the development of advanced AMD.

Yerba mate (*ilex paraguariensis*, YM) is a native plant of South America cultivated and consumed in various countries of the region in the form of infusions. Numerous reports indicate a beneficial effect of YM in various diseases associated with increased oxidative

stress such as hyperlipidemia, atherogenesis, cancer, inflammatory conditions, obesity and diabetes. These beneficial effects are attributed precisely to its high content of polyphenols, among which are caffeic and chlorogenic acids (CAF and CHL respectively). Since the ingestion of YM can provide significant amounts of these antioxidants, the main purpose of this thesis is to investigate the effects of YM, and the isolated acids CAF and CHL in two models of AMD, one *in vitro* and the other one *in vivo*.

Cultures of the ARPE-19 cell line were treated with YM, CAF and CHL before being exposed to oxidative damage by hydrogen peroxide. In all cases, a protective effect was observed, associated with the decrease in intracellular reactive oxygen species (ROS) and DNA damage, together with a significant increase in the expression of molecules related to various protective and antioxidant pathways.

Moreover, a soluble extract of YM was administered to mice of the C57Bl / 6 strain before generating oxidative damage using sodium iodate (NaIO₃, SI). In retinal pigment epithelium (RPE), YM induced an increase in the expression of genes that are vital for cell function and antioxidant defenses, preventing morphological and functional alterations of RPE.

Our experimental data suggest that the ingestion of YM, highly accepted in the population of our country, as well as nutraceutical products derived from it, could reduce the progression of AMD. However, further research, especially epidemiological studies, is required to verify this hypothesis.

PUBLICACIONES

- **Tate PS**, Marquioni-Ramella MD, Cerchiaro CL, Suburo AM. Ilex Paraguariensis extracts prevent oxidative damage un a mouse model of age-related macular degeneration. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2022. doi: 10.1002/mnfr.202100807
- **Tate PS***, Potilinski MC*, Lorenc VE, Gallo JE. New insights into oxidative stress and immune mechanisms involved in age-related macular degeneration tackled by novel therapies. *Neuropharmacology*. 2021. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108513
- **Tate PS**, Marazita MC, Marquioni-Ramella MD, Suburo AM. *Ilex paraguariensis* extracts and its polyphenols prevent oxidative damage and senescence of human retinal pigment epithelium cells. *J Funct Foods*. 2020. doi: 10.1016/j.jff.2020.103833.
- Marquioni-Ramella MD, Cubilla MA, Bermúdez V, **Tate PS**, Marazita MC, Suburo AM. Glucocorticoid and progesterone mechanisms in photoreceptor survival. *Exp Eye Res*. 190:107854, 2020. doi: 10.1016/j.exer.2019.107854.
- Leiguarda, C., Potilinski, C., Rubione, J., **Tate, P.**, Villar, M. J., Montaner, A., Bisagno, V., Constandil, L. Brumovsky, P. R. IMT504 Provides Analgesia by Modulating Cell Infiltrate and Inflammatory Milieu in a Chronic Pain Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2020. doi: 10.1007/s11481-020-09971-2

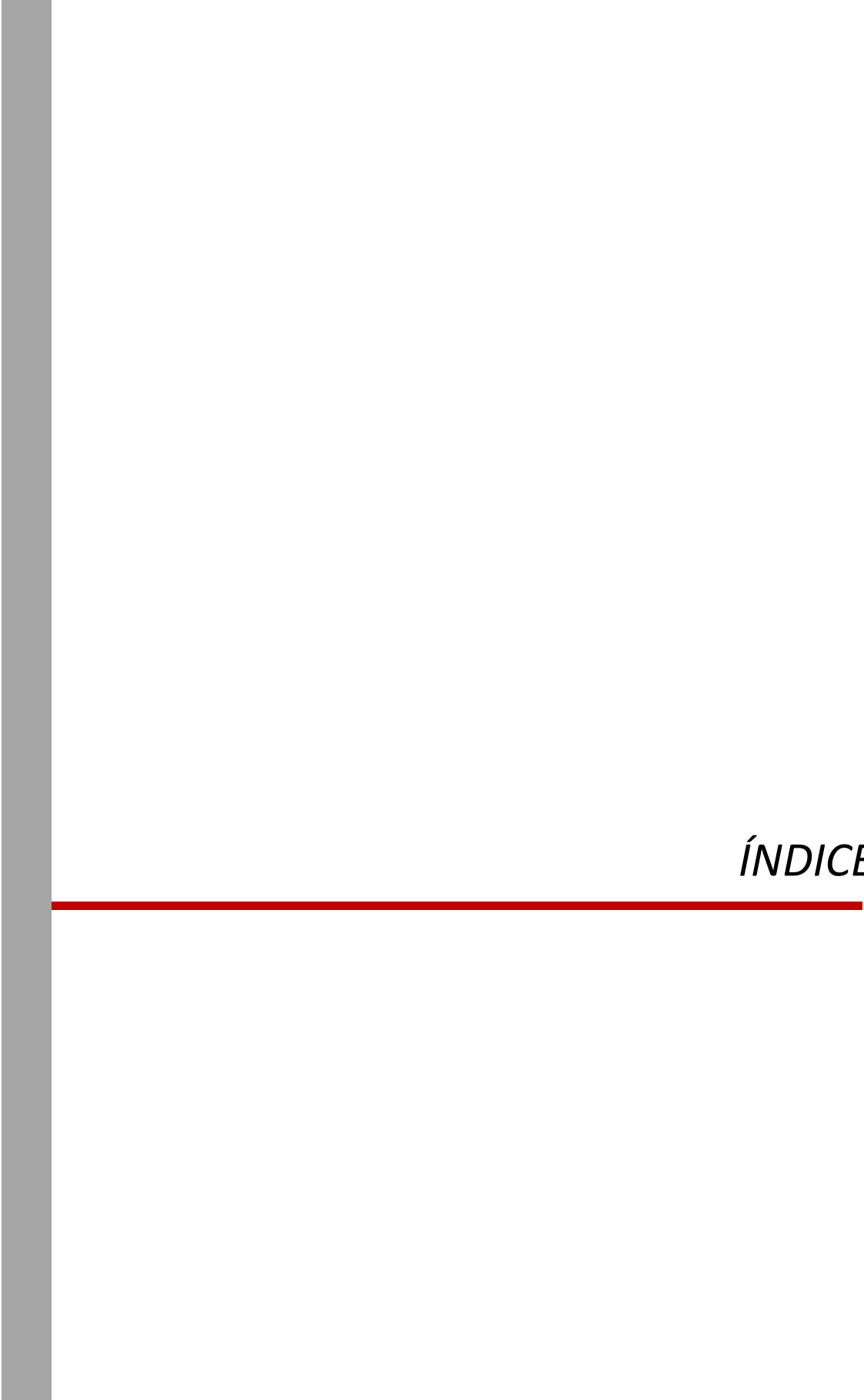
ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
AMP	Adenosina mono fosfato
AMPK	del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARVO	del inglés <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
BCL2	del inglés <i>B cell lymphoma 2</i>
BDNF	del inglés <i>brain derived neurotrophic factor</i>
CAF	Ácido cafeico
CBP	del inglés <i>CREB binding protein</i>
CCL-2	del inglés <i>CC chemokine ligand 2</i>
cg	Células ganglionares
CHL	Ácido clorogénico
CICUAL	Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
cne	Capa nuclear externa
cni	Capa nuclear interna
CNTF	del inglés <i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO2	Dióxido de carbono
cpe	Capa plexiforme externa
cpv	Capa plexiforme interna
CREB	del inglés <i>cyclic AMP response element binding protein</i>

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFHDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceina di-acetato
DMAE	degeneración macular asociada con la edad
DMEM/F12	del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	epigallocatequin–galato
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERK	del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FGF	del inglés <i>fibroblast growth factor</i>
FITC	del inglés <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
fno	Fibras del nervio óptico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCL	glutamato-cisteín-ligasa
GDNF	del inglés <i>glial derived neurotrophic factor</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCL	Ácido clorhídrico
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
IGF	del inglés <i>insulin growth factor</i>
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IRBP	Proteína de unión al retinol del espacio interfotorreceptor

Keap1	del inglés <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
MAPK	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mle	Membrana limitante externa
mli	Membrana limitante interna
MMP-9	del inglés <i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido
NaIO ₃	Iodato de sodio
NFκB	del inglés <i>nuclear factor κB</i>
NGF	del inglés <i>nerve growth factor</i>
NQO1	NADPH quinina oxidorreductasa 1
NRF2	de inglés <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NT3	Neurotrofina 3
OCT	del inglés <i>Optimal Cutting Temperature</i>
PBS	del inglés <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEDF	del inglés <i>pigment epithelium-derived factor</i>
PI3K	del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
qPCR	PCR cuantitativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RDH12	Retinol deshidrogenasa 12
RDH5	Retinol deshidrogenasa 5

RDH8	Retinol deshidrogenasa 8
RPE65	del inglés <i>retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein</i>
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SDS	dodecil sulfato de sodio
se	Segmentos externos
SFB	Suero fetal bovino
SIRT1	Sirtuína 1
SOD2	Superóxido dismutasa 2
TBS	del inglés <i>Tris-Buffered Saline</i>
TGFb2	del inglés <i>Transforming Growth Factor Beta 2</i>
VEGF	del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
YM	Yerba mate
β-GAL	β-galactosidasa
β-GAL+	β-galactosidasa positivo



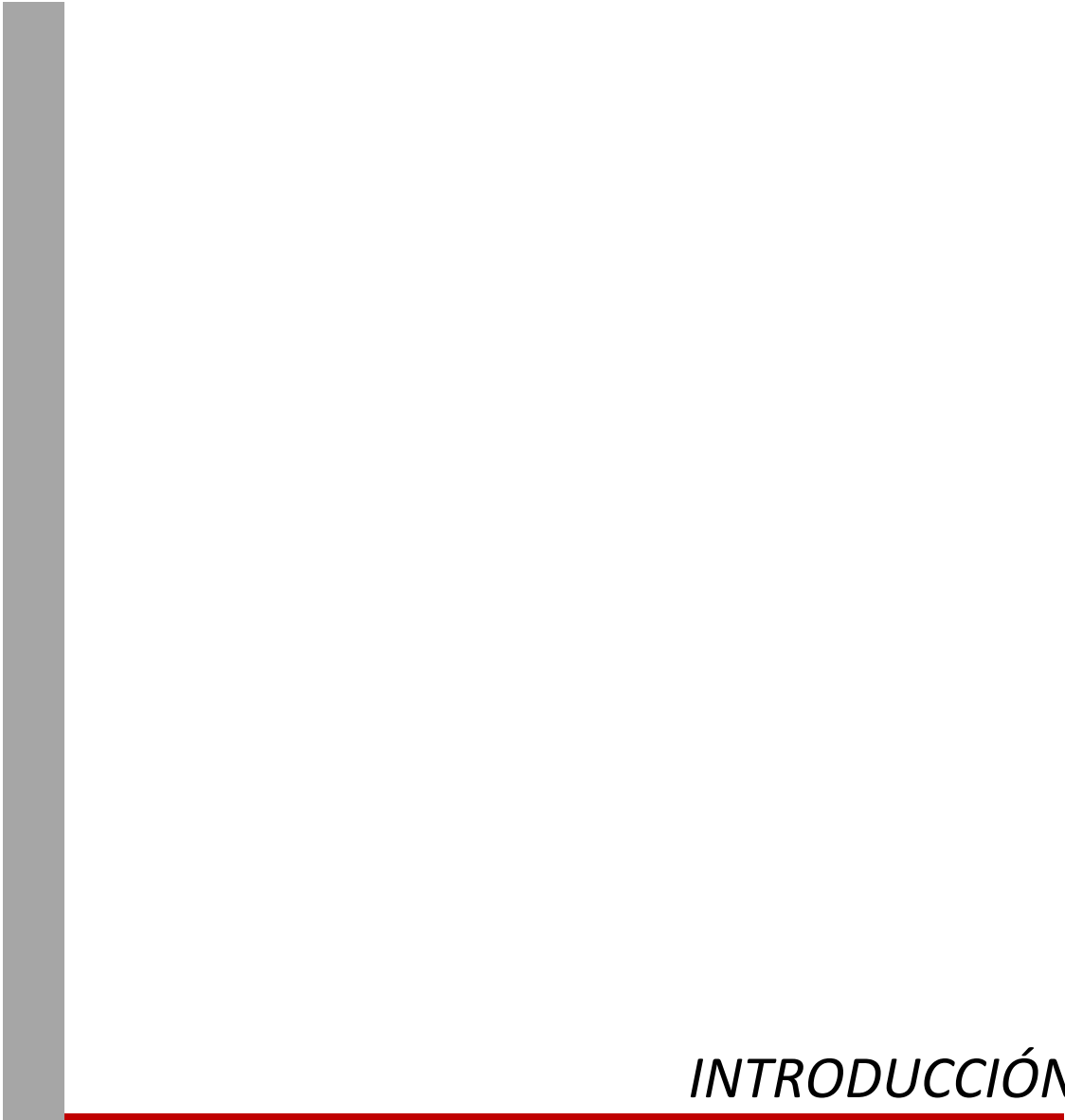
ÍNDICE

ÍNDICE

1	Introducción	22
1.1	El globo ocular	22
1.1.1	Anatomía	22
1.1.2	Estructuras oculares involucradas en la formación de la imagen y en la transmisión de la información visual hacia el cerebro.....	25
1.1.3	Conos y bastones.....	27
1.1.4	Fototransducción y generación de radicales libres.....	28
1.1.5	Epitelio pigmentario de la retina.....	29
1.1.6	Exposición a la luz y estrés oxidativo	30
1.1.7	EPR y ciclo visual.....	31
1.2	Degeneración macular asociada a la edad	32
1.2.1	Características y patobiología de la DMAE.....	33
1.2.2	Degeneración del EPR en la DMAE.....	35
1.3	Senescencia celular	35
1.3.1	Características de la célula senescente	36
1.4	Modelos de DMAE.....	38
1.4.1	Modelos <i>in vitro</i>	38
1.4.2	Modelos <i>in vivo</i>	40
1.5	Compuestos bioactivos	42
1.5.1	Alimentos funcionales.....	42
1.5.2	Compuestos fenólicos como alimentos funcionales.....	43
1.5.3	Fuentes naturales de obtención de compuestos fenólicos	44
1.5.4	Vías de acción de los polifenoles y efectos celulares reportados.	46
1.5.4.1	Polifenoles y activación de la vía de ERK.....	48
1.5.4.2	Polifenoles y activación de la vía de CREB	49
1.5.4.3	Efecto de polifenoles en la expresión de NRF2.....	50
1.5.5	Yerba mate	52
1.5.5.1	Principales formas de consumo de yerba mate	54
1.5.5.2	Yerba mate como fuente de polifenoles.....	56
1.5.5.3	Absorción y disponibilidad fisiológica de los ácidos cafeico y clorogénico.....	57
1.5.5.4	Beneficios reportados de la yerba mate y sus polifenoles en la salud	58
1.6	Hipótesis.....	60

1.7	Objetivos	61
1.7.1	Objetivos generales.....	61
1.7.2	Objetivos específicos.....	61
2	Materiales y métodos	64
2.1	Drogas y sustancias utilizadas	64
2.2	Cultivo de línea celular	65
2.3	Modelo animal	65
2.3.1	Intervenciones y procedimientos.....	66
2.3.1.1	Administración oral de extractos de yerba mate.....	66
2.3.1.2	Inyección intraperitoneal de NaIO ₃	66
2.3.1.3	Anestesia	66
2.4	Ensayos de viabilidad celular.....	66
2.5	Inducción de senescencia y actividad β -galactosidasa (β -GAL)	67
2.6	Detección de EROs intracelulares	68
2.7	Procedimientos Inmunoquímicos	68
2.7.1	Inmunofluorescencia.....	68
2.7.2	Western blot.....	69
2.8	Extracción de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)	71
2.9	Examen del fondo de ojo	73
2.10	Muestras de tejidos.....	74
2.10.1	Enucleación y fijación	74
2.10.2	Cortes en crióstato	75
2.10.3	Técnicas histológicas	75
2.11	Análisis estadístico	76
3	Diseño experimental y resultados: Polifenoles y extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> en cultivos de epitelio pigmentario de la retina	78
3.1	Supervivencia celular frente a dosis altas de estrés oxidativo.....	78
3.2	Evaluación de la generación de EROs intracelulares.....	80
3.3	Modificación en la expresión de la histona p-H2AX.....	81
3.4	Inducción del fenotipo senescente	84
3.5	Vías de protección activadas por CAF y CHL	86
3.5.1	Evaluación de los niveles de activación de CREB	86
3.5.2	Expresión de BCL2	88
3.5.3	Activación de vías antioxidantes	90
3.6	Efecto del extracto soluble de YM	92
3.6.1	Viabilidad celular	92

3.6.2	Prevención del fenotipo senescente.....	93
4	Diseño experimental y resultados: Extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> en la degeneración del EPR <i>in vivo</i>	95
4.1	Procedimientos desarrollados para este objetivo	95
4.1.1	Extracción del EPR para Western blot y qPCR.....	95
4.1.2	Puesta a punto del modelo <i>in vivo</i> de daño oxidativo del EPR	97
4.2	Análisis de fondo de ojo	98
4.3	Análisis de la histoarquitectura de la retina por la técnica de rojo neutro.....	101
4.4	Vías de señalización intracelulares activadas por el consumo de YM	103
4.4.1	Vías antioxidantes	103
4.4.2	Vías involucradas en la función visual.....	107
5	Discusión	110
5.1	Efecto de la YM y sus polifenoles <i>in vitro</i>	110
5.1.1	Mecanismos de protección activados por los polifenoles <i>in vitro</i>	110
5.1.2	Dosis utilizadas <i>in vitro</i>	112
5.2	Efecto del consumo de YM en el daño oxidativo del EPR	112
5.2.1	Activación de las defensas antioxidantes en el EPR <i>in vivo</i>	113
5.2.2	Efecto del consumo de YM en los niveles de RPE65	114
5.3	Posibles beneficios terapéuticos del consumo de YM	115
6	Conclusiones.....	118
6.1	CAF y CHL protegen del daño oxidativo <i>in vitro</i>	118
6.2	<i>In vitro</i> el extracto soluble de YM posee el mismo efecto que los polifenoles puros	119
6.3	El consumo de YM previene la degeneración del EPR <i>in vivo</i>	119
6.4	La YM activa genes importantes para el EPR y de defensa antioxidante <i>in vivo</i>	120
7	Bibliografía	122



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El globo ocular

1.1.1 Anatomía

El globo ocular contiene el aparato óptico del sistema visual.¹ Está formado por tres capas, una capa fibrosa externa, una capa vascular media y una capa neuroepitelial interna.^{1,2}

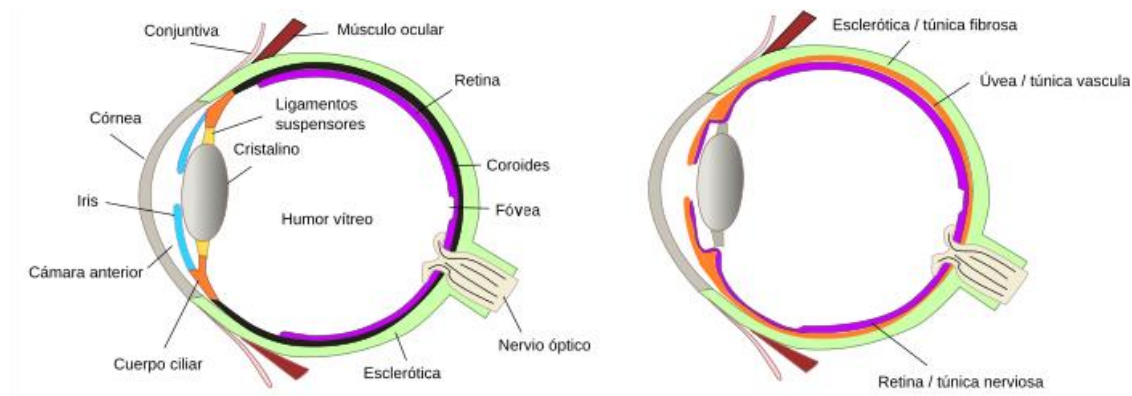


Figura 1: Estructura anatómica del globo ocular³

La capa fibrosa está compuesta por la esclera y la córnea. La esclera o esclerótica es la porción opaca que ocupa los cinco sextos posteriores del ojo y es la estructura fibrosa que contribuye a la forma y la resistencia del globo ocular. La córnea es la porción transparente y cubre sólo el sexto anterior del ojo. Ambas partes se diferencian principalmente por la disposición de las fibras de colágeno que las componen. La capa vascular, también llamada úvea, está formada por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides forma la porción más grande de la capa vascular y tapiza la mayor parte de la esclera. Los vasos sanguíneos de mayor calibre se encuentran en la parte externa, cercanos a la esclera, mientras que los vasos más finos, organizados en un lecho capilar

muy extenso, son adyacentes a la retina. En relación con la masa de tejido irrigado, el flujo sanguíneo ocular es uno de los más altos de todo el organismo, poniendo en evidencia la alta demanda metabólica de este órgano.

El cuerpo ciliar es una estructura muscular y vascular que conecta la coroides con la circunferencia del iris. Los pliegues de su cara interna, los procesos ciliares, secretan el humor acuoso que rellena las cámaras anterior y posterior del ojo.

El iris es un diafragma contráctil sobre la cara anterior del cristalino cuya abertura central, la pupila, regula el paso de la luz. El diámetro de la pupila es controlado por dos músculos involuntarios: el esfínter de la pupila con innervación parasimpática y el dilatador de la pupila estimulado por nervios simpáticos.¹

En sus porciones anteriores, la capa neuroepitelial se integra al cuerpo ciliar y el iris. Pero, en su mayor parte, esta capa forma la retina, que es sensible a la luz. La retina posee dos capas principales. La externa forma el epitelio pigmentario de la retina (EPR), mientras que la interna contiene los fotorreceptores y las primeras neuronas de la vía visual. La funduscopia permite observar, en el fondo del ojo, la cara anterior de la retina. Allí se encuentra el disco óptico, la región por donde salen las fibras del nervio óptico y transcurren los vasos centrales de la retina. Como esta región no posee células sensibles a la luz, recibe el nombre de punto ciego.¹ Por fuera del punto ciego, y en el centro óptico del ojo, se ubica la mácula, una especialización característica de la retina de los primates. Apenas comprende el 4% del área total de la retina y es imprescindible para la visión fina. En su centro existe una depresión, la fovea, que ocupa un área total apenas mayor a 1 mm², especialmente encargada de la visión de precisión, como por ejemplo para la lectura. La fovea está compuesta principalmente por conos, células fotorreceptoras

especializadas en la visión de los colores.⁴ En esta región los vasos sanguíneos, las células ganglionares, la capa nuclear interna y las capas plexiformes, quedan desplazadas hacia los lados en lugar de apoyarse directamente sobre los conos. Esto permite que la luz llegue a las estructuras fotorreceptoras sin pasar previamente por otras capas celulares de la retina

El cristalino es una estructura flexible, transparente y avascular que refracta la luz hacia la retina. Está unida por las fibras zonulares a la cara interna del cuerpo ciliar, cuya relajación/contracción modifica la forma del cristalino, cambiando su índice de refracción y su distancia focal. Estos cambios permiten enfocar objetos cercanos u objetos lejanos.

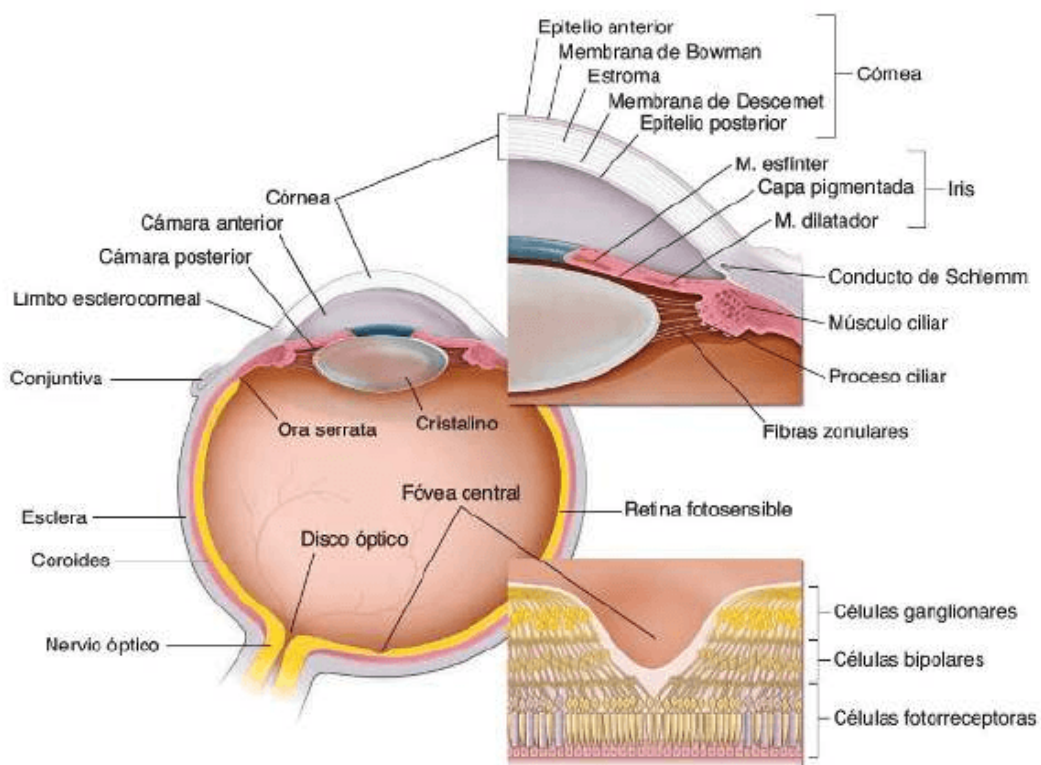


Figura 2: Detalle de la las tunicas que componen el globo ocular²

1.1.2 Estructuras oculares involucradas en la formación de la imagen y en la transmisión de la información visual hacia el cerebro

Los medios transparentes del ojo son la córnea, el humor acuoso, el cristalino y el humor vítreo. Su estructura posibilita el paso de la luz hasta llegar a las células foto-sensibles.⁴

La córnea, el primer medio óptico que debe atravesar la luz en su recorrido, participa en el enfoque de la luz. Junto con el cristalino, permite que los rayos luminosos enfocados se concentren en el centro óptico del globo ocular.

La retina es la túnica más interna del globo y se divide en dos subcapas: el epitelio pigmentario de la retina (EPR) que se encuentra en contacto con la coroides, y la retina neural que contiene los fotorreceptores y otras neuronas involucradas en el procesamiento de la imagen visual: las células horizontales, bipolares, amácrinas y ganglionares. Estas últimas originan las fibras del nervio óptico. La retina neural también incluye células gliales: células de Müller, astrocitos y microglía.

Si se tiene en cuenta la organización de las diferentes células, tanto de la retina neural como del EPR, y sus prolongaciones dentro de la retina, se la puede dividir en capas bien organizadas que, desde la coroides, son: la monocapa celular del EPR, la capa que incluye los segmentos externos (se) de los fotorreceptores (ver más adelante), la membrana limitante externa (mle), que corresponde al extremo apical de las células de Müller, la capa nuclear externa (cne) donde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores, la capa plexiforme externa (cpe) que es la región donde se encuentran las prolongaciones de los fotorreceptores y de las células bipolares, amácrinas y horizontales y sus conexiones, la capa nuclear interna (cni) con los núcleos de las células

de Müller, bipolares, amácrinas y horizontales, la capa plexiforme interna (cpi) similar a la plexiforme externa pero compuesta por las conexiones entre las células de la capa anterior y las células ganglionares, la capa ganglionar (cg) donde se encuentran los somas de las células ganglionares y desde donde salen las fibras del nervio óptico (fno) y por último la membrana limitante interna (mli) compuesta por la lámina basal de las células de Müller.

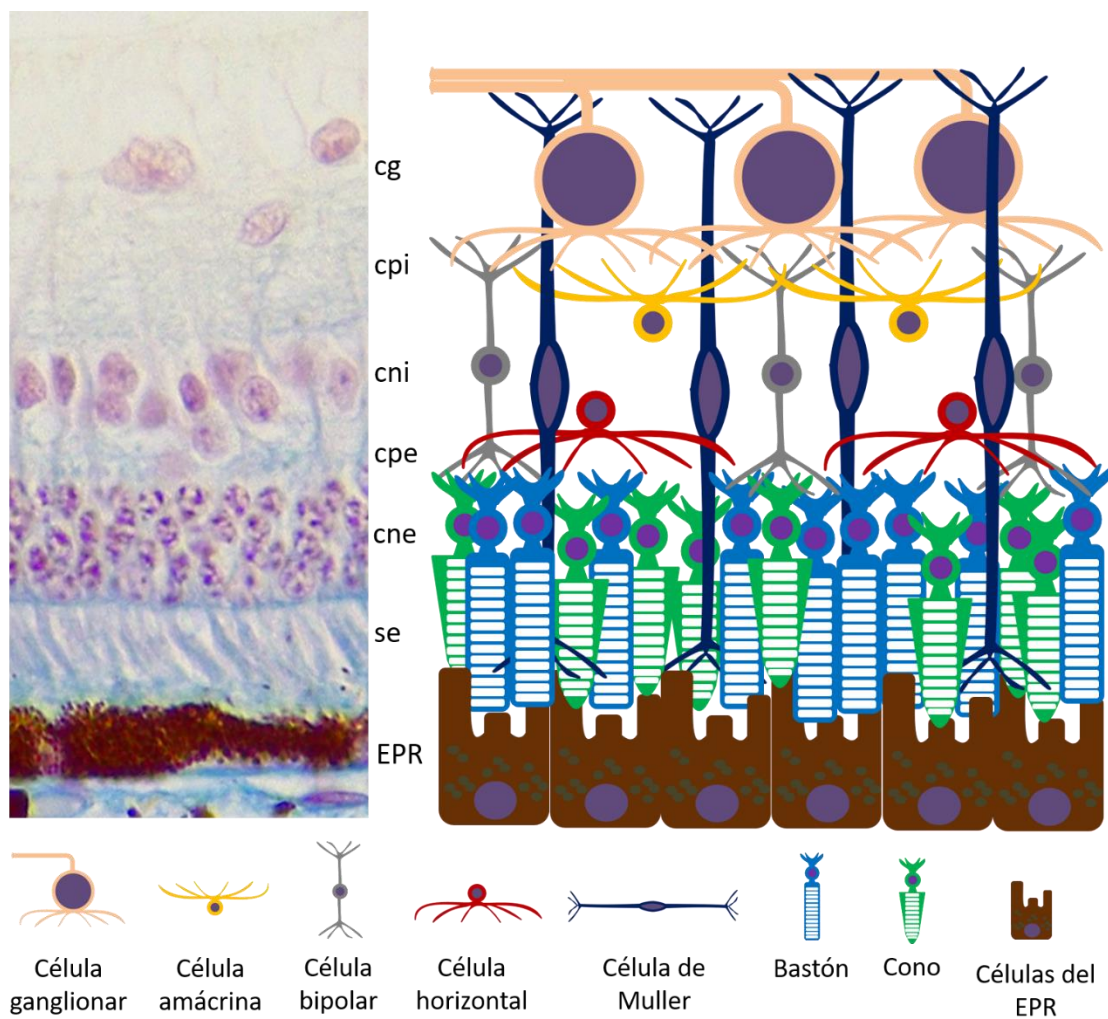


Figura 3: Corte histológico de la retina y esquema de las células que forman los distintos estratos (Pablo Tate)

1.1.3 Conos y bastones

Existen dos tipos de células fotorreceptoras: los conos y los bastones. Ambos son células altamente polarizadas formadas por distintos segmentos especializados para la recepción de señales luminosas, su conducción a lo largo de la célula y su transmisión mediante sinapsis sensoriales.

- El segmento externo contiene discos membranosos, apilados como monedas. En cada fotorreceptor llega a haber hasta 1000 discos. La membrana discal posee una alta proporción de proteínas, debido a la presencia de las moléculas fotosensibles, la rodopsina en los bastones y las opsinas sensibles a distintas longitudes de onda en los conos. Estas proteínas transmembranosas son receptores acoplados a proteínas G cuyo ligando es el 11-cis retinal, un cromóforo que deriva de la vitamina A. Las membranas discales también incluyen otras proteínas involucradas en la vía de transducción.
- Un segmento interno unido al anterior por un cilio de conexión, que contiene diversas organelas, entre las que se destacan numerosas mitocondrias y las cisternas del retículo endoplásmico involucradas en la síntesis de las opsinas.
- El cuerpo del fotorreceptor contiene el núcleo. Por fuera se une al segmento interno y por dentro se continúa con el pedículo sináptico. Este último forma contactos especializados con las células bipolares y horizontales, que componen la siguiente etapa de la cadena visual.

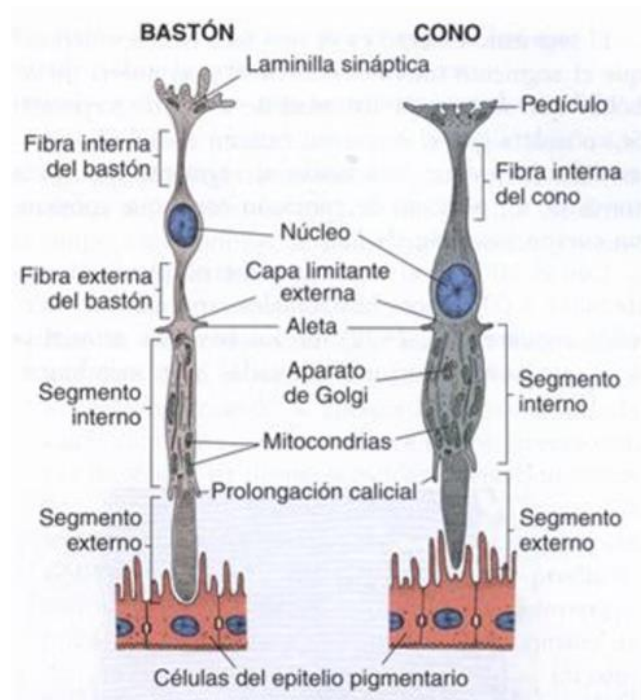


Figura 4: Esquema de las células fotorreceptoras.²

1.1.4 Fototransducción y generación de radicales libres

La fototransducción se inicia cuando la luz isomeriza el cromóforo 11-cis-retinal de la rodopsina a su isómero todo-trans, induciendo un cambio conformacional del pigmento visual. El cromóforo abandona la proteína transmembranosa y se degrada en cuestión de nanosegundos. La rodopsina activada estimula los cambios eléctricos en el fotorreceptor que luego son transmitidos hacia el sistema nervioso central.⁴ El todo-trans-retinal se reconvierte en 11-cis-retinal mediante una serie de reacciones bioquímicas conocidas como ciclo visual en las que el EPR y las células de Müller cumplen un rol fundamental (ver más adelante).

La energía transferida de los pigmentos excitados por la luz puede generar radicales libres dentro de las células fotorreceptoras. Estas especies reactivas reaccionan con componentes celulares generando sustancias tóxicas, daño al ADN y alterando vías

metabólicas, lo que conlleva a la pérdida de función o la muerte celular. La retina, además, posee una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados presentes en los discos membranosos de los fotorreceptores que son altamente susceptibles a la oxidación. La acumulación de estas especies reactivas, en conjunto con los discos membranosos oxidados generan un ambiente altamente oxidante, que de no ser manejado correctamente por las células lleva a la destrucción del tejido. Para evitar estos efectos nocivos en la retina, el epitelio pigmentario de la retina posee un rol sumamente importante que se desarrollara en las secciones siguientes.

1.1.5 Epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa celular con diversas funciones vitales para la función y supervivencia de la retina.⁵⁻⁷ La cara interna o apical de este epitelio se encuentra en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores. Su cara externa o basal se asocia a la coroides por intermedio de la membrana de Bruch, una estructura compleja que incluye la lámina basal del EPR, dos capas ricas en colágeno separadas por una capa de fibras elásticas, y la membrana basal de los capilares coroideos.⁸ Debido a su ubicación, el EPR transporta nutrientes, iones y metabolitos entre la retina neural y los capilares coroideos.

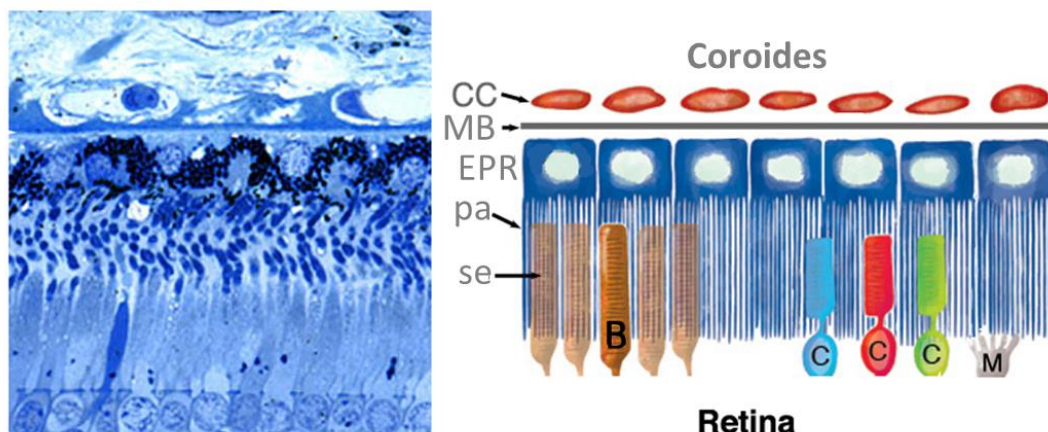


Figura 5: Izquierda: microfotografía del EPR humano, con la coroides arriba y la retina neural debajo. Derecha: esquema alineado a la microfotografía. CC, capilares coroides; MB, membrana de Bruch; ap, procesos apicales; se, segmentos externos; B, bastones; C, conos. Modificado de Strauss 2005. ⁷

1.1.6 Exposición a la luz y estrés oxidativo

Debido a la exposición continua a luz y su alta tasa metabólica, los fotorreceptores son susceptibles al daño por estrés oxidativo.⁹ Este daño ocurre cuando la energía transferida de los pigmentos de los fotorreceptores excitados por la luz genera especies reactivas de oxígeno (EROs). Estos radicales reaccionan con componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos generando alteraciones en vías metabólicas y la muerte celular.¹⁰ Este efecto fototóxico es aumentado en la retina por la alta demanda de oxígeno del tejido y la acumulación de discos de membrana plasmática presentes en los fotorreceptores que contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a la oxidación.¹¹ En este sentido el EPR cumple un rol crítico, ya que está encargado del reciclaje de los segmentos externos de los conos y bastones. A medida que los discos son generados en la base del segmento externo del fotorreceptor, la

región apical que contiene discos envejecidos (con lípidos y proteínas oxidadas) es fagocitada por las células del EPR, impidiendo su acumulación. El balance entre la síntesis y la fagocitosis mantiene la longitud del segmento externo constante.¹²

Otras funciones del EPR incluyen la secreción de factores de supervivencia entre los que se incluyen neurotrofinas clásicas (NGF, BDNF y NT3) e IGF, GDNF, PEDF, CNTF, VEGF y FGF. Esta secreción está polarizada, ya sea hacia los fotorreceptores en la superficie apical (por ejemplo, PEDF) o hacia la coroides a través de la membrana basal de Bruch (por ejemplo, VEGF).⁷ Además contiene gránulos de melanina que absorben los fotones que llegan más allá de los segmentos externos, reduciendo su dispersión.⁹

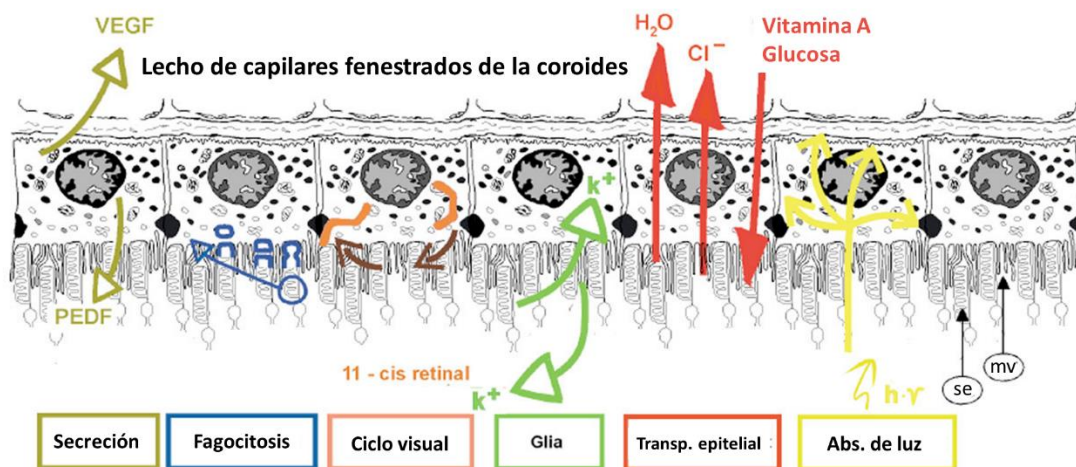


Figura 6: Resumen de las principales funciones del EPR. Modificado de Strauss 2005.⁷

1.1.7 EPR y ciclo visual

El EPR no sólo transporta retinoides desde el torrente sanguíneo, sino que además es esencial para la regeneración del 11-cis retinal. Como se mencionó anteriormente, el cromóforo de la rodopsina se isomeriza a todo-trans-retinal por acción de la luz y es reciclado a 11-cis-retinal durante el ciclo visual.^{13,14}

La forma canónica o clásica del ciclo visual, comienza con la expulsión del todo-trans-retinal hacia afuera del fotorreceptor, mediada por el transportador ABCA4, donde se une a la proteína de unión al retinol (IRBP) acumulada en el espacio interfotorreceptor. Allí es reducido a todo-trans-retinol por las enzimas retinol deshidrogenasa 8 y 12 (RDH8 y RDH12). Luego difunde al EPR, donde es esterificado y almacenado en cuerpos lipídicos llamados retinosomas. La proteína RPE65 (del inglés retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein) forma 11-cis-retinol, que a su vez es oxidado a 11-cis-retinal por la enzima RDH5. Por último, el 11-cis-retinal difunde hacia los fotorreceptores, donde se une a una opsina para comenzar el ciclo nuevamente.¹⁵

El ciclo visual específico de los conos permite a estos recuperar su sensibilidad a la luz con mayor velocidad debido a la rápida reposición del 11-cis-retinal. Las enzimas de este ciclo se encuentran en la retina neural y producen 11-cis-retinol, una molécula que solo puede ser utilizada por los conos ya que expresan una 11-cis-retinol deshidrogenasa.¹⁶

1.2 Degeneración macular asociada a la edad

La degeneración macular asociada con la edad (DMAE), incluida en las patologías asociadas al envejecimiento, representa una de las principales causas de discapacidad visual irreversible en individuos mayores de 65 años. Se estima que afecta actualmente a 196 millones de personas, cifra que aumentaría a 288 millones en 2040.¹⁷ Se trata de una enfermedad degenerativa de origen multifactorial, cuyos principales factores de riesgo incluyen el envejecimiento, componentes genéticos (se conocen por lo menos 34 loci genéticos de susceptibilidad para la DMAE ¹⁸) y factores ambientales como el humo de cigarrillo.¹⁹ El estrés oxidativo parece ser común a muchos de estos factores

etiológicos. La generación de especies reactivas en los tejidos está asociada a trastornos metabólicos, hiperglucemia, envejecimiento e inflamación crónica y genera una respuesta protectora que puede agotarse cuando el estrés oxidativo se prolonga en el tiempo. Al agotarse esta protección endógena, el daño comienza a acumularse y a alterar componentes celulares como el ADN y las proteínas. El resultado final de este proceso es la senescencia celular prematura o la muerte celular con la consecuente destrucción tisular.²⁰

1.2.1 Características y patobiología de la DMAE

La primera etapa de esta enfermedad, que afecta primariamente a la retina externa, comienza con lesiones del EPR (pigmentación irregular, acumulación de lipofuscina) y depósitos extracelulares entre el EPR y la membrana de Bruch. Estos depósitos (llamados drusen) aumentan progresivamente en número y en tamaño.²¹ Los denominados drusen blandos, grandes ($>125\ \mu\text{m}$) y de bordes difusos, no aparecen en el envejecimiento normal y su presencia se asocia con un alto riesgo de DMAE.²²

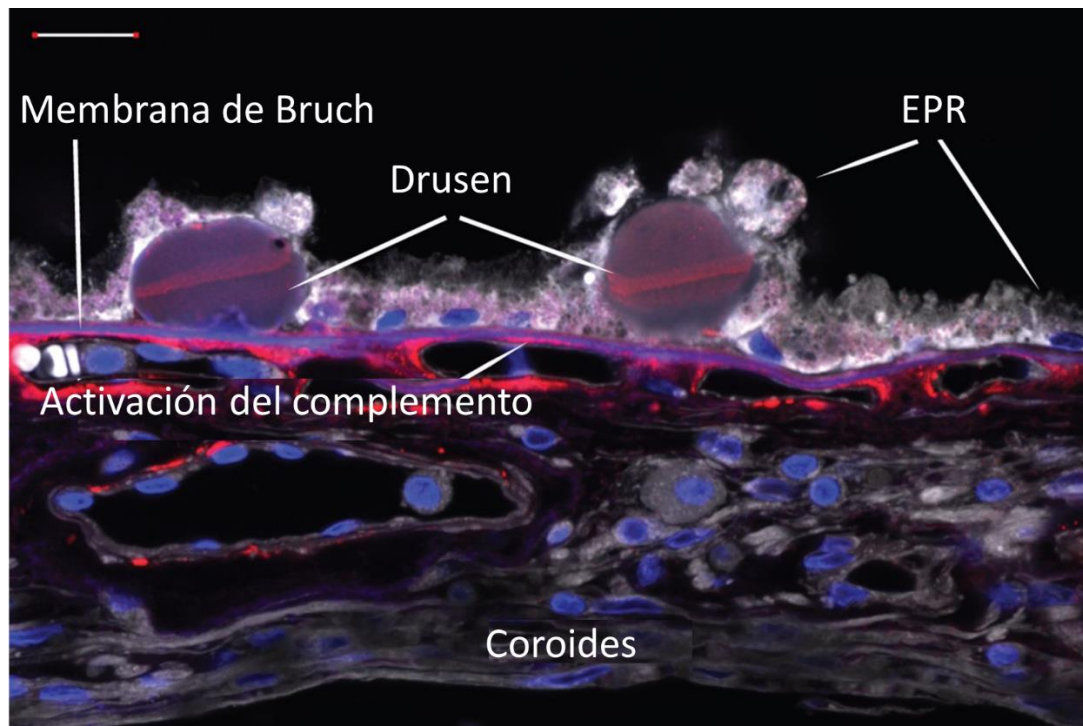


Figura 7: Microfotografía de los depósitos extracelulares (drusen) por debajo del EPR.

Modificado de Forest y colaboradores, 2015.²³

Eventualmente, estos drusen de mayor tamaño son reemplazados por áreas no pigmentadas que reflejan la desaparición del epitelio, hasta llegar a la atrofia geográfica característica de la forma seca o no exudativa de la DMAE, donde el EPR y los fotorreceptores del área macular desaparecen gradualmente con la consiguiente pérdida de la capacidad visual. En la forma húmeda o exudativa aparece neovascularización coroidea que acelera la progresión de la enfermedad. Los vasos patológicos pueden ser eliminados con tratamientos antiangiogénicos que bloquean la acción del factor de crecimiento vascular (anti-VEGF), pero hasta el momento no existe un tratamiento eficiente para la DMAE no exudativa.²⁴⁻²⁶

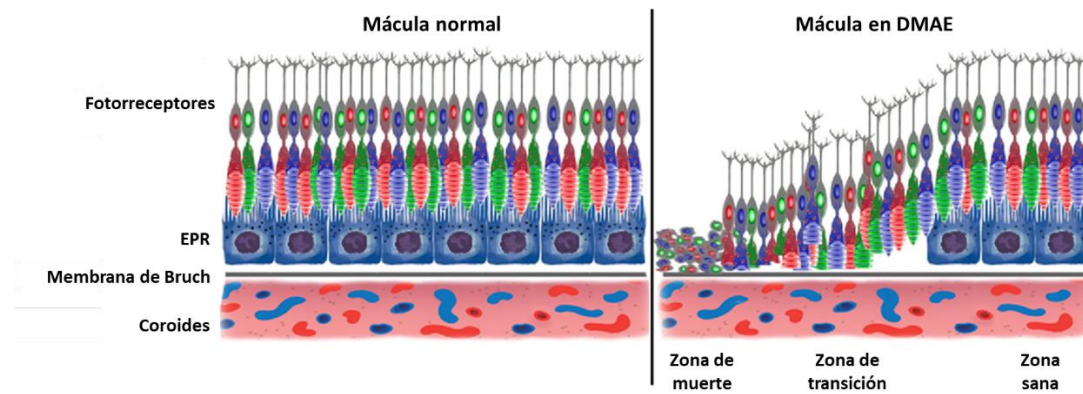


Figura 8: Esquema de las diferencias en la organización de la retina entre una mácula normal (izquierda) y la mácula en el contexto de la DMAE (derecha). Modificado de Jha y colaboradores, 2015.²⁷

1.2.2 Degeneración del EPR en la DMAE

La senescencia del EPR es actualmente postulada como el principal mecanismo patogénico en la DMAE. Diversas evidencias indican que el envejecimiento del epitelio determina la formación de los drusen y la consiguiente evolución de la enfermedad. Además, las células del EPR envejecido disminuyen su capacidad de degradar los discos de los segmentos externos, acumulándose lipofuscina en los lisosomas y aumentando los niveles de EROs intracelulares, que como se mencionó previamente, están estrechamente ligados al desarrollo de la patología y la inducción del estado senescente.²⁸

1.3 Senescencia celular

El envejecimiento constituye el factor de riesgo más importante en el desarrollo de numerosas patologías y está generado por la acumulación temporal de diversos daños celulares y la consecuente pérdida de función de tejidos y órganos. Estas enfermedades

(denominadas patologías asociadas a la edad) son causantes de largos períodos de incapacidad, pérdida de funciones del organismo e incluso la muerte.²⁹

Se han descrito una serie de mecanismos moleculares que explican la naturaleza del envejecimiento y de los procesos involucrados en el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad. Entre estos se destaca la senescencia celular, cuya modulación se postula como un mecanismo de control y/o prevención de las patologías ligadas al envejecimiento.³⁰

La senescencia celular prematura se define como un programa transcripcional que establece el arresto irreversible del ciclo celular y que es acompañado por un conjunto de cambios fenotípicos.³¹ Las células senescentes son células metabólicamente activas que no proliferan, aún en presencia de nutrientes o factores mitogénicos.³² Se considera que este fenotipo celular fue seleccionado evolutivamente como un mecanismo supresor del desarrollo de tumores, dado que evitaría la proliferación de células con potencial oncogénico.^{32,33} A pesar de este efecto beneficioso, la acumulación de células senescentes contribuye a la pérdida de función de los tejidos y al consiguiente desarrollo de patologías asociadas a la edad.³³

1.3.1 Características de la célula senescente

A pesar de que no se ha identificado ningún marcador específico de senescencia celular, estas células presentan diversas características que en su conjunto definen el fenotipo senescente. Entre ellos se encuentran cambios morfológicos (suelen ser células alargadas, aplanadas y de mayor tamaño con presencia de vacuolas originadas por estrés del retículo endoplasmático),^{34,35} el arresto irreversible del ciclo celular,³² la actividad de β -galactosidasa positiva asociada a senescencia³⁶ y la formación de focos

(foci) de daño al ADN (contienen proteínas como histona H2AX fosforilada que se expresan en forma constitutiva en las células senescentes y que serían esenciales para la irreversibilidad del arresto).^{37,38} Además, las células con fenotipo senescente alteran notoriamente la expresión génica, aumentan la expresión de genes asociados a la inhibición del ciclo celular como p16INK4a y p21CIP1, dos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas^{39,40} y disminuyen la expresión de genes que codifican proteínas estimulantes de la progresión del ciclo celular, como c-FOS y ciclina A/B.^{31,41}

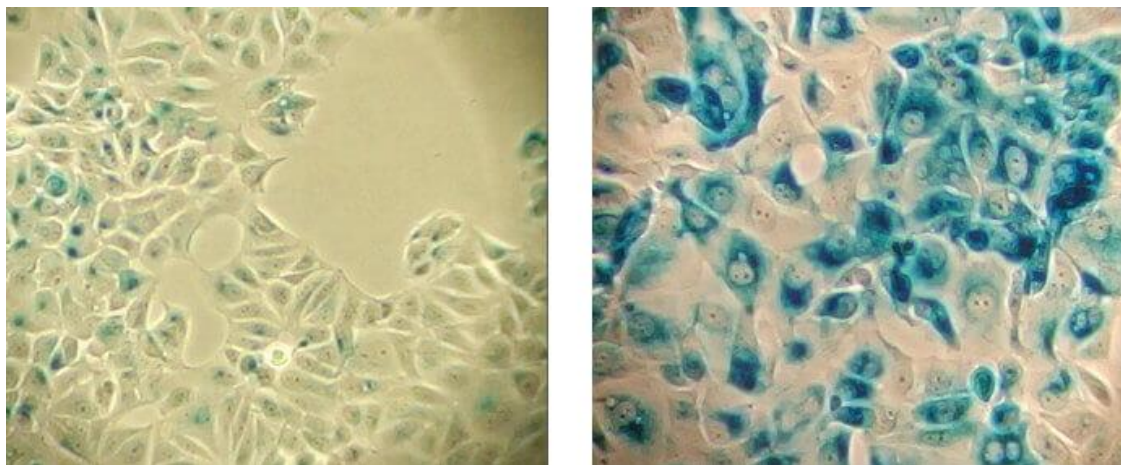


Figura 9: Coloración típica debida a la actividad enzimática de β -galactosidasa. Izquierda cultivo control. Derecha cultivo senescente donde se pueden observar el aumento de actividad de β -galactosidasa y el cambio de morfología celular.⁴²

Otros cambios del transcriptoma senescente incluyen un aumento en la expresión de interleuquinas pro inflamatorias (como IL-1 e IL-6), quemoquinas (IL-8 y CCL-2), proteasas (metaloproteinasas) y factores de crecimiento (IGF y VEGF) con efectos autocrinos y parácrinos.⁴³⁻⁴⁶ Esta expresión génica característica fue denominada fenotipo secretorio asociado a senescencia (senescence-associated secretory

phenotype, SASP) o secretoma senescente y tiene un papel central en las actividades patológicas de estas células dentro de los tejidos.⁴⁷

1.4 Modelos de DMAE

Los modelos de enfermedades degenerativas de la retina no sólo resultan útiles para identificar los mecanismos moleculares implicados en el inicio y la progresión de dichas enfermedades, sino que también sirven como plataforma para la evaluación de nuevas drogas y/o terapias. Tanto modelos *in vitro* como *in vivo* fueron utilizados con exitosamente para obtener la evidencia experimental necesaria para la realización de ensayos clínicos que sustentan los tratamientos actualmente utilizados para la DMAE de tipo neovascular.^{48,49} Como se mencionó anteriormente, la oftalmología todavía no dispone de tratamientos eficientes para la DMAE no exudativa, cuya forma mas grave es la atrofia geográfica.

1.4.1 Modelos *in vitro*

Como se explicó anteriormente (sección 1.2.2.2), la senescencia del EPR es actualmente postulada como uno de los principales mecanismos patogénicos en la DMAE. Debido a que no existen protocolos de generación de cultivos primarios de EPR en los que se obtenga una gran cantidad de células, las líneas celulares inmortalizadas derivadas del EPR son comúnmente utilizadas en modelos *in vitro* de la enfermedad. Entre ellas se destaca la línea ARPE-19, que mantiene muchas características típicas de las células del EPR humano, a pesar de presentar uniones entre células más débiles que las encontradas en el EPR *in vivo*.^{50,51}

Para generar cultivos en condiciones de envejecimiento semejantes a las encontradas en la DMAE, el uso de agentes oxidantes es una de las principales herramientas. Entre los agentes oxidantes utilizados se incluyen el peróxido de hidrógeno, el tert-butilhidroperóxido, extractos de humo de cigarrillo y iodato de sodio. Estos inductores de estrés oxidativo aumentan la expresión de p21, p16, p38, los niveles de EROs intracelulares, los foci de histona H2AX característicos del daño al ADN y la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.^{52,53} La exposición crónica a estos agentes induce el fenotipo senescente, caracterizado por el arresto del ciclo celular, actividad β -galactosidasa, aumento del tamaño celular y la expresión de factores característicos de la senescencia celular como p21 y la proteína precursora de β -amiloide.⁵⁴ Por su parte, el péptido β -amiloide también puede inducir senescencia en el EPR, acompañada de un aumento en los factores IL-8 y MMP-9 que podrían afectar la adhesión y también la permeabilidad de las células del EPR.⁵⁵ Estos forman parte del denominado fenotipo secretor de las células senescentes. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que las células ARPE-19 senescentes aumentan la producción de IL-6, IL-8 y VEGF, factores que podrían aportar al estado de inflamación crónica característico del tejido y a la neovascularización coroidal. Además, disminuyen la expresión del Factor H del complemento, un factor inhibitorio que podría promover la activación de esta vía contribuyendo a la destrucción tisular.⁵²

También se demostró que el estrés oxidativo producido por nicotina, cloruro de cobalto y peróxido de hidrógeno, altera el estado fisiológico normal del EPR generando reacciones inflamatorias, en un modelo *in vitro* de DMAE con generación de drusen.⁵⁶

1.4.2 Modelos *in vivo*

Desarrollar un modelo de DMAE que tenga las características tanto de los estadios tempranos como tardíos de la enfermedad sigue siendo un desafío. Además, por tratarse de una patología multifactorial, que incluye tanto polimorfismos genéticos como factores ambientales, la DMAE es un proceso patológico complejo, difícilmente replicable en condiciones experimentales.^{57,58} A la complejidad del proceso molecular detrás del desarrollo de la enfermedad, se suman diferencias anatómicas entre la retina de las especies animales normalmente utilizadas en experimentación y la humana. Por ejemplo, los roedores de uso en laboratorio representan un modelo ventajoso por su relativamente corta esperanza de vida, bajo costo, rápida progresión de enfermedades y la posibilidad de obtener individuos modificados genéticamente con relativa facilidad. Puede argumentarse que la retina de estos modelos animales carece de mácula lútea y fovea, que sólo se encuentran en los primates superiores.⁵⁸ Sin embargo, aunque con menor importancia clínica, la DMAE también afecta a la retina no macular.

Se han generado diferentes cepas de ratones que buscan replicar el desarrollo de la DMAE. Entre ellas se destaca la cepa SAMP8, que presenta un envejecimiento acelerado. En estos animales se puede observar una patología ocular con características similares a la DMAE que incluye depósitos de β -amiloide, aumento en la expresión de p16 en el EPR y de los factores IL-6 e IL-8 asociados al fenotipo secretor de las células senescentes.⁵⁹

La degradación de SOD2 en células del EPR de ratones por la transfección de un adenovirus que expresa una ribozima, genera animales con rasgos característicos de la DMAE entre los que se encuentran un incremento en la expresión de marcadores de

estrés oxidativo, un adelgazamiento de la membrana de Bruch, degeneración del EPR, atrofia de los fotorreceptores y un incremento en la autofluorescencia del tejido.⁶⁰

Inyecciones subretinales de péptido β -amiloide en ratones producen degeneración retinal acompañada de un aumento en la expresión de p16 y de IL-6 e IL-8.⁶¹ La utilización de condiciones oxidantes como la exposición a humo de cigarrillo, luz azul y dietas altas en grasa, también generan el adelgazamiento de la membrana de Bruch y la formación de depósitos basales similares a los drusen.⁶²⁻⁶⁵

La exposición a luz intensa constituye otro modelo de degeneración retinal.⁶⁶ Aquí, los segmentos externos de los fotorreceptores son las estructuras más dañadas, generando la muerte por apoptosis de estas células, mientras que exposiciones prolongadas también generan daño en el EPR.^{10,67}

El iodato de sodio (NaIO_3) es un agente oxidante capaz de dañar selectivamente las células del EPR *in vivo*, con la consecuente degeneración de los fotorreceptores y la pérdida de función de la retina.⁶⁸⁻⁷¹ En las concentraciones utilizadas, tanto por vía intravenosa como intraperitoneal, las lesiones afectan específicamente al EPR. Esta selectividad se explica por la altísima perfusión de la coriocapilaris ($1400 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 100 \text{ g tejido}^{-1}$, que es aún mayor que la perfusión renal.⁷ Los otros tejidos y órganos, incluyendo la retina interna, siempre menos vascularizados que el EPR, no son afectados por las dosis que lesionan al EPR. El iodato de sodio genera la producción EROs^{72,73} que a su vez alteran diversos mecanismos que llevan a la muerte celular, como la inhibición de diversas actividades enzimáticas y la conversión de glicina a glioxilato tóxico, trastornos mitocondriales, bloqueo de la autofagia e inhibición de las actividades fagocíticas, importantes en la degradación de los segmentos externos de los

fotorreceptores.^{70,74,75} La disfunción y la muerte del EPR, aparentemente por vías necroptóicas, alteran la barrera hemo-retinal externa, promoviendo la muerte de los fotorreceptores.⁷⁰

1.5 *Compuestos bioactivos*

1.5.1 Alimentos funcionales

Los alimentos constituyen fuentes de calorías, vitaminas y minerales que permiten el funcionamiento de los tejidos y la correcta salud de los organismos. Además, proporcionan los sustratos celulares para la generación de energía, la diferenciación y proliferación celular y las barreras químicas contra la oxidación. Entre los distintos tipos de alimentos, los categorizados como alimentos funcionales son cada vez más estudiados. El termino alimento funcional fue usado por primera vez en Japón en 1980.⁷⁶

En 2017, Granato y colaboradores definieron los alimentos funcionales como alimentos naturales o procesados industrialmente que cuando son regularmente consumidos en la dieta tienen efectos potencialmente beneficiosos en la salud más allá de la nutrición básica.⁷⁷ Esta definición determina que para poder considerar a cualquier alimento como funcional, se debe contar con evidencia experimental que asegure la seguridad y funcionalidad de su consumo.⁷⁸ Además, se debe demostrar que genera beneficios en la salud cuando se lo consume junto a una dieta balanceada.^{79,80}

Entre los alimentos funcionales más difundidos se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados, los prebióticos, probióticos y simbióticos y los antioxidantes.⁸¹

1.5.2 Compuestos fenólicos como alimentos funcionales.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, que además pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.⁸²

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas, en su mayor parte se originan en la ruta del ácido shikímico (ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) y en el metabolismo de los fenilpropanoides.⁸³ Los fenilpropanoides simples derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina y son producidos en la ruta del ácido shikímico. Existen diversas familias de compuestos fenólicos que se diferencian en el número de átomos de carbono que componen su esqueleto molecular. Entre ellos se encuentran los ácidos cinámicos y benzoicos, flavonoides, proantocianidinas, estilbenos, cumarinas, lignanos y ligninas.

Dado que muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen al efecto antioxidante de los compuestos fenólicos,⁸⁴ desde 1990 varias organizaciones internacionales de la nutrición recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una ingesta adecuada de antioxidantes para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.⁸⁵ Entre las enfermedades en las que se ha encontrado un efecto benéfico de los polifenoles se incluyen las enfermedades neurodegenerativas, la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, cáncer, inflamación, diabetes, dislipemia, alergias y enfermedades relacionadas al sistema inmune.⁸⁶⁻¹⁰¹ Además se encuentra reportado un

rol importante en la prevención de diferentes tipos de cáncer entre los que se destacan cáncer de hígado, próstata y colorrectal.¹⁰²⁻¹⁰⁴

1.5.3 Fuentes naturales de obtención de compuestos fenólicos

Una de las fuentes de compuestos fenólicos en la dieta más estudiados en la actualidad son las frutas, en las que es frecuente encontrar derivados de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoles, catequinas, y taninos condensados e hidrolizables.¹⁰⁵ La mayoría de estos compuestos permanecen en productos elaborados a base de frutas y bayas, como por ejemplo zumos, mermeladas, jaleas, gelatinas, etc.¹⁰⁶

Los ácidos fenólicos también son abundantes en los alimentos derivados de vegetales siendo los más frecuentes el ácido cafeico, y en menor medida el ácido ferúlico. El ácido cafeico también se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico (ácido 5-cafeilquínico), un polifenol presente en el café, la yerba mate y en muchas frutas y verduras. Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos: los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico y los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico.

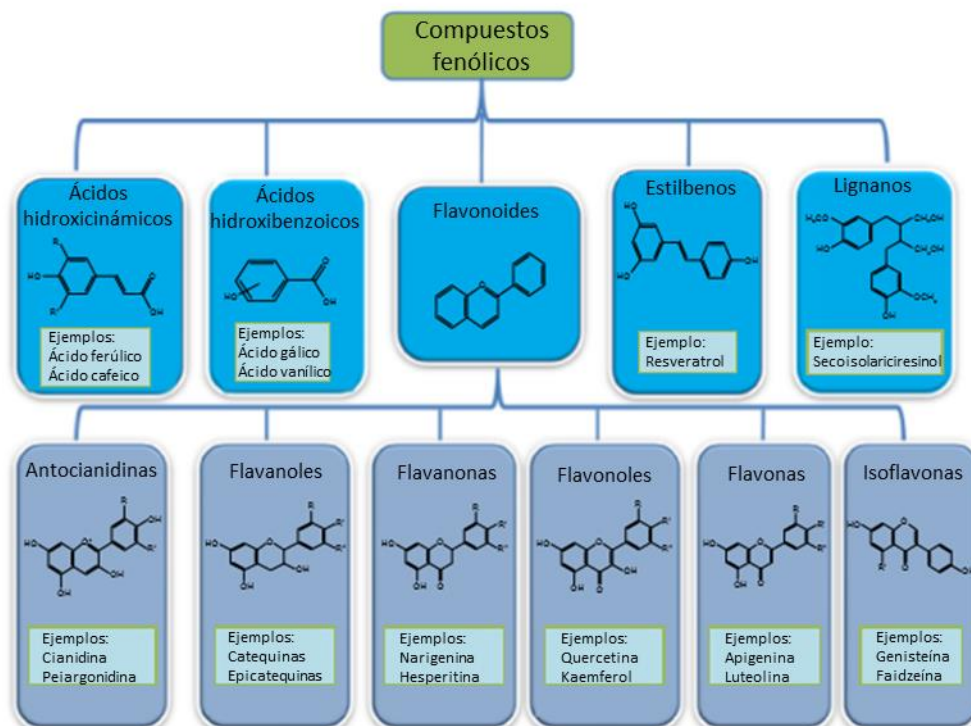


Figura 11: Clasificación de los principales polifenoles con sus estructuras químicas y ejemplos. Modificado de Moosavi y colaboradores, 2016.¹⁰⁷

Los principales ejemplos de ácidos benzoicos son los ácidos gálico, salicílico, p-hidroxibenzoico, protocatéuico, vanílico y sirínico. Los ácidos gálico y eláico son componentes de las fresas, frambuesas y zarzamoras.⁸⁴

Los ácidos cinámicos se encuentran principalmente en las frutas rojas. Generalmente aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa. Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico. Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que como se explicó anteriormente resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico. Así, el ácido cafeico, libre o esterificado, constituye el ácido fenólico más abundante en muchas frutas y vegetales.⁸⁴

Los estilbenos con mayor interés nutricional son el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) y el piceido (resveratrol-3-O- β -D-glucósido), presentes en uvas y vinos, por lo que estos alimentos van a ser las principales fuentes de estilbenos en la dieta. El resveratrol muestra actividades antitumorales e inhibe reacciones que incrementan el riesgo de enfermedades coronarias.⁸⁴ Un vino tinto puede contener 200 mg/L de resveratrol y las uvas rojas de la variedad Napoleón contienen 2.4 mg de estilbenos (resveratrol y piceido) por Kg de peso fresco.

Los flavonoides conforman el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas.⁸⁴ Los principales flavonoles son: quercetina, kaempferol, miricetina e isoramnetina¹⁰⁸ y algunos de sus glicósidos son la rutina (quercetina-3-O-ramnosilglucósido) y la hiperina (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosido).⁸³ Los mayores niveles de quercetina se encuentran en las cebollas (280- 490 mg/Kg de porción comestible). Entre los zumos, el de uva contiene 4.4 mg/L de quercetina y 6.2 de kaempferol y el de naranja 5.7 mg/L de quercetina. El vino tinto 8.3 mg/L de quercetina y 8 mg/L de kaempferol y el té negro 15-17 mg/L de quercetina, 14-16 mg/L de kaempferol y 3 mg/L de miricetina.¹⁰⁸

Las antocianidinas más importantes en los alimentos son la cianidina, la delfinidina, la peonidina, la pelargonidina, la petunidina y la malvidina, y son responsables de los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas y uvas.⁸³

1.5.4 Vías de acción de los polifenoles y efectos celulares reportados.

Los compuestos polifenólicos son capaces de ofrecer protección contra los radicales libres por diversos mecanismos. El primero es por medio de la captación directa de los

radicales (actividad *scavenger*), actuando como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones dentro del anillo aromático.¹⁰⁹

El segundo mecanismo de protección se basa en la modulación de vías celulares de señalización involucradas en la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular.^{110–113}

Se demostró que los polifenoles presentes en el jugo de uva disminuyen los defectos cognitivos leves en sujetos de avanzada edad y que la administración de resveratrol en adultos mayores mejora significativamente la memoria, sugiriendo un potencial uso de estos polifenoles en el mantenimiento de la salud del sistema nervioso durante el envejecimiento.^{114,115}

El consumo de ácidos hidroxibenzoicos, catequinas y flavonoles mejora las pruebas cognitivas de lenguaje y memoria verbal.¹¹⁶ Resultados similares se observaron en individuos en riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, y estudios con epigallocatequín–galato (EGCG) mostraron una mejora significativa del déficit cognitivo en individuos con síndrome de Down.^{117–119}

Estudios realizados usando polifenoles con actividad neuroprotectora demostraron que son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica. Esto demuestra que son capaces de alcanzar el tejido neural y en consecuencia podrían desencadenar un efecto neuroprotector y neuromodulador en respuesta a diferentes patologías.^{120–126}

También se demostró que polifenoles como la luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona), los curcuminoides (compuestos polifenólicos principales de la *Cúrcuma longa*), el EGCG

(polifenol mayoritario del té verde) y el ácido cafeico fenetil éster, entre otros, son capaces de aumentar la supervivencia celular en células PC12, una línea celular de células de tipo neuronal en condiciones de citotoxicidad.¹²⁷⁻¹³¹ Además, otros investigadores demostraron que el tratamiento con genisteína y daidzeína, isoflavonas presentes en los granos de soja, y sus productos derivados aumentan la proliferación y supervivencia de neuronas en el hipocampo.¹³² Resultados similares fueron observados con quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) y ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico).^{133,134}

1.5.4.1 Polifenoles y activación de la vía de ERK

La vía de señalización activada por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK del inglés *extracellular signal-regulated kinase*) promueve la supervivencia celular en diversos tejidos.^{135,136} Esta vía está implicada en diversas funciones fisiológicas de las neuronas, incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia y regulación de la respuesta a varios factores de crecimiento.¹³⁷⁻¹⁴¹

Varios polifenoles generan protección celular mediante la modulación de esta vía celular. El tratamiento con luteolina protege a células de la línea PC12 de la muerte por apoptosis, incrementa la expresión de la proteína GAP-43 (un marcador de diferenciación neuronal) y de hemo-oxigenasa 1 (HO-1). Estos efectos se reducen significativamente con el pretratamiento utilizando un inhibidor de ERK.¹²⁷ El efecto protector de la liquiritina frente a la apoptosis neuronal o la diferenciación de neuronas en cultivos primarios inducidas por el péptido β -amiloide se anula al utilizar un inhibidor de la vía de ERK.¹⁴² Resultados similares fueron observados con icaritina (un flavonoide

derivado de hierbas de origen chino), rutina (3,3',4,5,7-pentahidroxiflavona-3-ramnoglicosido) y fisetina.^{143–145}

1.5.4.2 Polifenoles y activación de la vía de CREB

La proteína de respuesta a AMP cíclico (CREB del inglés *cyclic AMP response element binding protein*), es un regulador transcripcional que reconoce la secuencia CRE, ubicada en la región regulatoria de varios genes. La activación de la vía de CREB implica un aumento en la expresión de genes que regulan la supervivencia, el crecimiento, la plasticidad sináptica, la diferenciación, la formación de dendritas y la memoria de largo plazo.^{146,147} Está reportado que ratones que carecen de la función de CREB en el cerebro, muestran procesos degenerativos en el hipocampo.¹⁴⁸ Estas funciones convierten a la vía de señalización de CREB en una de las vías pro supervivencia más importantes y en este sentido se han estudiado múltiples polifenoles que son capaces de modular su activación durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Se demostró que diversos polifenoles entre los que se encuentran la luteolina, el auraptano (un derivado de la cumarina), la curcumina, la nobiletina y la hesperetina (un flavonoide) incrementan significativamente la activación por fosforilación de CREB en células de la línea PC12.^{128,131,149–152} El resveratrol posee un efecto neurotrófico en neuronas dopaminérgicas de ratas por medio de la activación de CREB en el hipocampo y la amígdala y promueve la neurogénesis en el hipocampo.^{153–155} El tratamiento con catequinas de té verde mostró un incremento significativo en fosforilación de CREB en ratones envejecidos, comparado a animales envejecidos control.¹⁵⁶ Otros polifenoles también aumentan los niveles de activación de CREB en el hipocampo.^{134,157} Además, la administración de esta última a ratas con deficiencia cognitiva inducida por

corticosterona, revierte significativamente la caída en los niveles de BDNF y CREB.¹⁵⁸ En modelos animales de Alzheimer, se observó un aumento en la activación de CREB luego del tratamiento con apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) y pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona).^{159,160}

El tratamiento con artemisinina (una sesquiterpeno lactona, derivada de la planta *Artemisia annua* L.) protege a las células de EPR del daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en un modelo in vitro de DMAE. Esta protección es debida a que el tratamiento activa CREB por medio de la vía de ERK.¹⁶¹

1.5.4.3 Efecto de polifenoles en la expresión de NRF2

El factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (NRF2, de inglés *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) forma parte de la principal vía de protección celular frente al estrés oxidativo. Esta proteína actúa como factor de transcripción, modulando la expresión de enzimas antioxidantes y con capacidad de detoxificación.¹⁶² Entre estas enzimas se encuentran la glutatión peroxidasa, γ -glutamylcisteina sintetasa, glutatión S-transferasa, glutamato-cisteín-ligasa (GCL), HO-1, superóxido dismutasa, NADPH quinina oxidoreductasa 1 (NQO1), peroxiredoxina, sulfiredoxina, tioredoxina y tioredoxin reductasa.^{163–165} Mediante el control de estas enzimas, NRF2 tiene un rol crucial en la homeostasis oxido-reductora intracelular y los mecanismos de defensa antioxidante.¹⁶⁶ Diversos polifenoles pueden modular la actividad de NRF2. Entre ellos se destacan la luteolina, puerarina y derivados de ácido caféico.^{127,167,168} En cultivos de neuronas, el EGCG también demostró tener un efecto protector contra estrés oxidativo, incrementando la expresión de HO-1 por medio de la activación de NRF2.¹⁶⁹

Otros ejemplos de la acción de compuestos antioxidantes de origen vegetal sobre la actividad de NRF2 en modelos de degeneración de la retina se presentan en la Tabla 1.

Compuesto natural		Efecto en NRF2	Efectos río abajo
Alfa mangostina ¹⁷⁰	Xantanoide	Aumenta la traslocación nuclear	Promueve la expresión de HO-1
Astaxantina ¹⁷¹	Xantofila carotenoide, metabolito secundario de bacterias, microalgas y levaduras.	Aumento en la expresión	Activa la vía de PI3K/Akt e inhibe la de NFκB.
Ácido carnósico ¹⁷²	Compuesto natural presente en extractos de romero.	Aumento en la expresión	Aumenta los niveles de enzimas antioxidantes.
Celastrol ¹⁷³	Compuesto natural aislado de la raíz de <i>Tripterygium wilfordii</i> .	Aumento en la expresión	Aumento en la expresión de GCL y HO-1
Curcumina ¹⁷⁴	Polifenol de la <i>Curcuma longa</i> .	Aumento en la activación	Aumento en la expresión de HO-1, tioredoxina y Akt
Delfinidina ¹⁷⁵	Antocianidina de frutas y vegetales.	Aumento en la expresión nuclear	Inhibe la generación intracelular de EROs.
Genipina ¹⁷⁶	Ligando glicosídico de plantas.	Aumento en la expresión	Aumenta la expresión de HO-1 y NQO1
Glicirrizina ¹⁷⁷	Triterpenoide de la raíz de <i>Glycyrrhiza glabr.</i>	Aumento en la expresión	Aumenta la fosforilación de la proteína-quinasa B.
Luteína ^{178,179}	Carotenoide xantófilo sintetizado por plantas.	Aumenta la traslocación nuclear	Aumento en la expresión de GCL, HO-1 y NQO1.
Licopeno ¹⁸⁰	Carotenoide.	Aumento en la expresión	Inhibe la activación de NFκB.
Morina ¹⁸¹	Compuesto aislado de <i>Maclura pomifera</i> , <i>Maclura tinctoria</i> y <i>Psidium guajava</i> .	Aumento en la activación	Activación de la vía de señalización AMPK/NRF2/HO-1.
Quercetina ^{182,183}	Flavonol presente en frutas, vegetales, hojas, semillas y granos.	Aumento en la activación	Aumento en la expresión de GCL, HO-1 y NQO1
Ácido salvianólico ¹⁸⁴	Extracto de <i>Salvia miltiorrhiza</i> .	Aumento en la activación	Aumento en la expresión de HO-1 y activación de Akt.

Taxifolina ¹⁸⁵	Flavonol.	Aumento en la activación	Aumento en la expresión de GCL, HO-1 y NQO1
Thimoquinona	Compuesto activo derivado de <i>Nigella sativa</i> .	Aumento en la activación	Aumento en la expresión de HO-1.
Zeaxantina ¹⁸⁶	Carotenoide	Aumento en la activación	Activación de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK.

Tabla 1: Ejemplos de compuestos naturales y su acción sobre la activación de NRF2 en modelos de degeneración de la retina

1.5.5 Yerba mate

La planta conocida como yerba mate pertenece a la especie *illex paraguariensis* Saint Hilaire de la familia de las Aquifoliaceas. Es un árbol de copa redondeada con hojas persistentes gruesas que en su hábitat natural puede alcanzar hasta 20 metros de altura. Cuando es cultivada con fines productivos, se realizan podas para mantenerla entre 3 y 6 metros de altura, a fin de facilitar la cosecha. Las flores son pequeñas y blancas y el fruto carnoso y pardusco de alrededor de 6 centímetros de diámetro.¹⁸⁷ Es nativa de la región noreste de Argentina, el sur de Brasil y la región oriental de Paraguay.¹⁸⁸

La vida productiva del yerbal comienza entre el cuarto y sexto año de implantación y se extiende normalmente entre los 25 y 30 años, aunque dependiendo del cuidado del suelo puede llegar a los 60 años.

La cosecha o tarea es anual, y se realiza entre abril y octubre, ya que durante este período se evitan las épocas de florecencia y fructificación, disminuye la circulación de sabia y se cuenta con un mayor porcentaje de hojas maduras.¹⁸⁷



Figura 12: *Fotografías en las que se observan las hojas de la planta de yerba mate (izquierda) y los procedimientos de poda (derecha, arriba) y transporte de las hojas y ramas en bolsas de arpillera (derecha, abajo).* ¹⁸⁹⁻¹⁹¹

La recolección de hojas maduras se realiza con tijeras o serruchos y se retira alrededor del 75% del follaje, que luego se deposita sobre paños de arpillera para ser pesado y transportado a establecimientos llamados secaderos. Allí comienza el procesamiento de las hojas que comprende cinco etapas

- 1- Zapecado o escaldado: consiste en exponerlas ramas recolectadas a la acción directa de llamas durante 20 o 30 segundos y luego a gases de combustión de leña por 2 o 3 minutos. Este procedimiento genera vapor de agua en el parénquima foliar, que rompe la epidermis de las hojas e inactiva a las enzimas responsables de los procesos de degradación (en particular se inhiben enzimas como la peroxidasa y polifenoloxidasas) asegurándose la conservación de su color verde. En esta etapa es donde la yerba mate adquiere su aroma característico.¹⁸⁷

- 2- Secado: Se realiza dentro de las 24 horas posteriores al zapecado y su finalidad es reducir la humedad hasta aproximadamente el 4%
- 3- Molienda gruesa o canchado: Este paso permite reducir el volumen de la materia en procesamiento, facilitando su embolsado y transporte. Además, aumenta la superficie de contacto con la atmósfera favoreciendo el inicio de las reacciones que ocurren durante el estacionamiento.
- 4- Estacionamiento: la yerba se coloca en bolsas de arpillera y se mantiene almacenada en depósitos de 6 a 24 meses. Durante este período adquiere las características de sabor aroma y color requeridas por los consumidores.
- 5- Molienda fina y envasado: este paso comprende operaciones sucesivas de trituración, zarandeo y mezcla que producen el tipo de yerba mate adecuado según el gusto o uso de cada región o grupo de consumidores.¹⁸⁷

1.5.5.1 Principales formas de consumo de yerba mate

La yerba mate es principalmente consumida como infusión, ya sea como mate caliente, mate frío (o tereré), o en taza como mate cocido, en saquitos o como mate soluble.

Mate caliente: entre 20 y 100 gramos de yerba mate elaborada se coloca en un recipiente (o mate) sobre el cual se vierte el agua caliente a aproximadamente 90°C que es succionada con una bombilla metálica. El recipiente tradicional es una calabaza, pero pueden variar mucho según la región utilizándose también vasos de vidrio, tazas de cerámica y recipientes de metal entre otros.

Tereré: se consume generalmente en verano. La preparación es similar a la del mate caliente, pero con la diferencia de que se utiliza agua fría o jugos de frutas a una

temperatura entre 5 y 10°C. En algunas regiones de Argentina y Paraguay también se acostumbra adicionar otras hierbas como por ejemplo menta o cedrón.

Yerba Mate en saquitos: la yerba elaborada se encuentra en saquitos de papel de filtro tissue (aproximadamente 3 gramos por saquito) y se consume en tazas de manera similar al té, preparándose con 250 ml de agua a 95°C.

Mate cocido: En este caso la yerba mate elaborada se coloca junto con el agua caliente y la mezcla se calienta hasta la ebullición. Luego se filtra y se sirve en taza, consumiéndose de manera similar al método anterior. En algunos casos esta infusión es saborizada con azúcar o utilizando cáscaras de cítricos.

Mate soluble: Es preparado en forma similar al café instantáneo, lo que le da el nombre de “mate instantáneo”. El extracto soluble se obtiene deshidratando los extractos acuosos de la yerba mate y concentrándolos por evaporación.¹⁸⁷

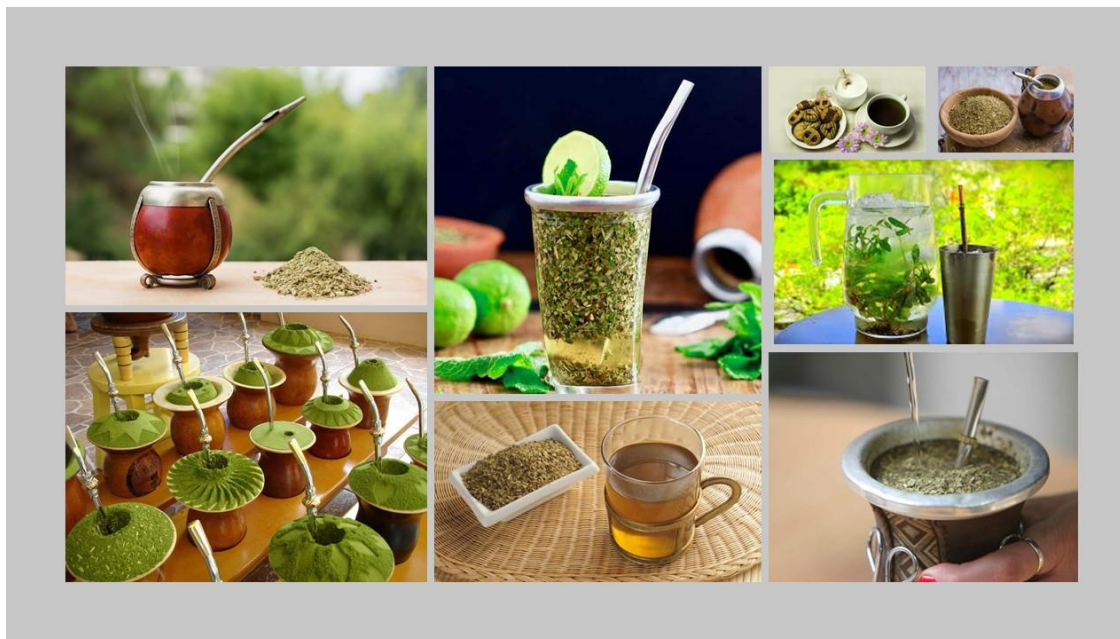


Figura 13: *Distintos tipos de infusiones de yerba mate*

Otros ejemplos de consumo de yerba mate incluyen bebidas energizantes, gaseosas, aguas saborizadas, como saborizante de cervezas amargas, té helado, chocolates, barras de cereal y helados. También se la utiliza en productos cosméticos como jabones, perfumes y cremas.¹⁸⁷

El consumo per cápita de yerba mate en Argentina y Uruguay se encuentra entre los 5-7 kg/año mientras que en Brasil es de 1,2 kg/año.¹⁹²

1.5.5.2 Yerba mate como fuente de polifenoles

Dependiendo de la forma de consumo de la yerba mate, el contenido de polifenoles totales presentes en cada infusión varía. Un estudio demuestra que los dos tipos de consumo con mayor aporte de polifenoles son la infusión de mate en saquitos y el mate caliente y la de menor aporte el tereré.^{193,194}

Los principales compuestos polifenólicos presentes en extractos de yerba mate se encuentran en el grupo de los ácidos hidroxicinámicos, principalmente derivados de ácidos hidroximanoilquínicos. Incluyen, mono-ésteres de ácido quínico y ácido cafeico (ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y ácido criptoclorogénico) y di-ésteres de ácido quínico con ácido cafeico (ácido isoclorogénico y 4,5 dicafeoilquínico).¹⁹⁵⁻¹⁹⁹

Aproximadamente el 90% del contenido de polifenoles totales en la yerba mate elaborada está compuesto por isómeros del ácido cafeoilquínico (alrededor del 53%) y por isómeros del ácido di-y tri-cafeoilquínico (37,5%) lo que equivale a 77 mg por g de materia seca.^{195,200,201}

Entre los compuestos del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, los derivados del ácido cafeico son los más antioxidantes.²⁰²

El mate soluble se obtiene a partir de preparaciones de mate caliente que luego son sometidas a “spray-drying”. Este procedimiento, que permite conservar las propiedades de alimentos y productos farmacéuticos, consiste en atomizar la solución en un ambiente de aire (u otro gas) caliente.²⁰³

La composición del mate soluble es cualitativamente semejante a la de la yerba deshidratada, pero el contenido de polifenoles totales (mg/g) de los extractos solubles es aproximadamente el doble del contenido de las hojas deshidratadas.²⁰⁴ Por el contrario, el contenido de polifenoles de la yerba (en saquitos) utilizada para hacer té es menor que el de la yerba utilizada para el mate caliente.¹⁹⁴

1.5.5.3 Absorción y disponibilidad fisiológica de los ácidos cafeico y clorogénico

Luego de la ingestión de las infusiones de yerba mate, los polifenoles presentes son absorbidos en el tracto digestivo de forma directa o luego de ser degradados por la microflora intestinal que contiene enzimas capaces de clivar los enlaces éster.^{205–213} El ácido cafeico (CAF) se absorbe principalmente en el estómago, mientras que la absorción del ácido clorogénico (CHL) comienza en el estómago, pero continúa en el intestino, donde es transformado en CAF y ácido ferúlico por la flora colónica.^{209,210,213–215}

Como resultado, luego del consumo de yerba mate, tanto el CAF como el CHL se encuentran en concentraciones comparables en el plasma y en los tejidos, permitiendo que las células reciban iguales cantidades de ambos polifenoles. A las 2 horas del consumo de yerba mate, los niveles de CAF y CHL comienzan a disminuir tanto en plasma como en el hígado.²¹⁵

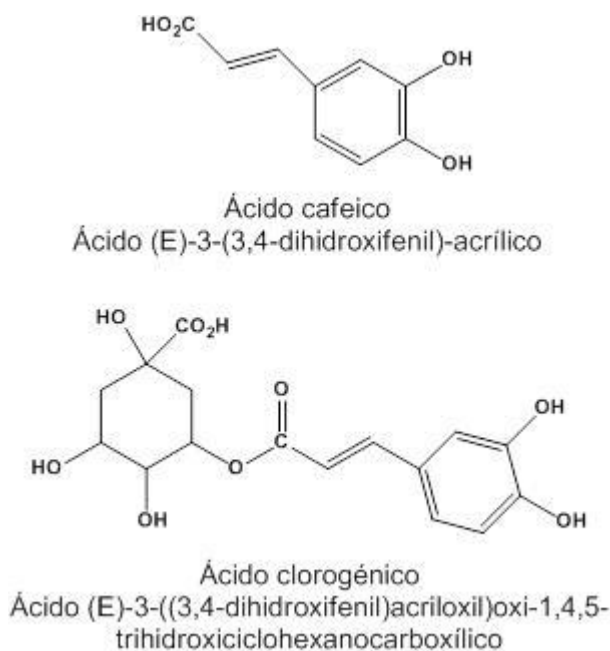


Figura 14: Estructura química de los ácidos cafeico y clorogénico.²¹⁶

Si se toma un consumo de infusión de yerba mate de 1 litro por día, se incorporan alrededor de 3,2 gramos de preparación, que corresponden a entre 300 y 400 mg de CHL y entre 5 y 8 mg de CAF. Sin embargo, está reportado que se puede obtener una cantidad mayor de polifenoles realizando otro tipo de extracciones, diferentes de las preparaciones tradicionales.^{217–219}

1.5.5.4 Beneficios reportados de la yerba mate y sus polifenoles en la salud

Distintos investigadores, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que el consumo de infusiones de yerba mate tiene un efecto fuertemente antioxidante y antiinflamatorio.^{199,220} El consumo de yerba mate mejora el funcionamiento endotelial en modelos de hiperlipidemia y el perfil lipídico tanto en sujetos sanos como con dislipemia, reduciendo el efecto aterogénico de las dietas altas en grasa.^{221–225}

El consumo de extractos de yerba mate disminuye la oxidación de ácidos grasos insaturados en el hígado, y se postula que el CHL está involucrado en ese proceso.²²⁶ Estudios en humanos también demostraron que la suplementación dietaria de estos extractos disminuye la peroxidación lipídica medida en plasma, y que este efecto se mantiene si la administración es prolongada. Los niveles de enzimas antioxidantes encontrados en plasma también aumentan luego de la incorporación, indicando que el consumo regular de infusiones de yerba mate es capaz de mejorar las defensas antioxidantes activando la maquinaria enzimática responsable de la protección frente al estrés oxidativo.²²⁷

También existen reportes de efectos benéficos sobre la obesidad, la evolución de los infartos cardíacos, las alteraciones de los huesos, en células del sistema nervioso y en la mejora de condiciones inflamatorias asociadas al cáncer.^{228–234} Entre los efectos antiinflamatorios caben destacar la inhibición de la elastasa del neutrófilo y la reducción de la inflamación pulmonar en animales expuestos a humo de cigarrillo.^{235–237} Además, se observó que la administración de yerba mate inhibe la angiogénesis en modelos de cáncer de colon y que puede modular la progresión tumoral y las metástasis en modelos de cáncer de mama.^{238,239}

Los polifenoles aislados de la yerba mate también presentan efectos benéficos en distintas enfermedades. El CHL posee propiedades anti obesidad y anti diabetes, que han sido asociadas con un efecto inhibitorio sobre la enzima glucosa-6-fosfato translocasa 1 del intestino y la glucosa-6-fosfatasa hepática, impidiendo la liberación de glucosa.^{240–244} Esto no solo disminuye los niveles de glucosa en sangre (por lo que la

demanda de insulina es menor), sino que además promueve la utilización de las reservas de grasa en el tejido adiposo.²⁴⁵

El CHL actúa como agente anti hipertensivo en pacientes con hipertensión leve.^{246–251}

Tanto CHL como CAF poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias demostradas en múltiples trabajos.^{252–255} Estudios recientes demostraron que tanto CHL como CAF suprimen la expresión inducida por estrés oxidativo de interleuquina 8 (IL-8), pero este efecto no fue observado utilizando ácido quínico (otro de los metabolitos del CHL).^{256,257}

El mate soluble o instantáneo, es una preparación apropiada para su uso farmacéutico, ya que permite administrar cantidades significativas de polifenoles. En un estudio clínico que investigó el efecto de YM en sujetos obesos, se administraron 3 g de extracto soluble por día, durante 12 semanas, sin eventos adversos significativas y con descenso significativo de la grasa corporal.²²⁸ El extracto producido por “Establecimiento Las Marías” también fue utilizado en un estudio de obesidad en ratones C57 en dosis de ~400 mg/kg peso corporal/día.²⁵⁸ El tratamiento se mantuvo 16 semanas y se obtuvieron resultados favorables sin eventos adversos.

1.6 Hipótesis

Debido a su elevado contenido de polifenoles, la yerba mate (YM) activaría vías intracelulares de señalización capaces de promover las defensas antioxidantes y la sobrevivencia de las células del EPR. En consecuencia, su consumo podría reducir las lesiones asociadas al envejecimiento, que habitualmente dependen de un aumento del estrés

oxidativo y/o la disminución de las defensas antioxidantes. Este efecto beneficioso podría ser de ayuda en el tratamiento y/o prevención de enfermedades degenerativas de la retina como la DMAE.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivos generales

Dada la importancia de la YM en la dieta de nuestro país, en esta tesis se analizará en forma experimental su posible papel en la prevención de las lesiones del EPR asociadas a la DMAE. En particular, nos interesa estudiar los efectos de un extracto soluble de YM y dos de sus principales compuestos polifenólicos CAF y CHL, a fin de evaluar su posible utilización como un agente nutracéutico.

1.7.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto protector de CAF y CHL y de un extracto soluble de YM sobre células del EPR *in vitro* sometidas a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno.

Se analizarán los efectos sobre:

- Supervivencia celular
- Desarrollo de senescencia prematura
- Modificaciones en la expresión de genes de la respuesta antioxidante
- Analizar el efecto protector de los extractos de YM *in vivo*, utilizando un modelo murino (ratones C57) donde se lesiona selectivamente el EPR mediante el uso de iodato de sodio (IS). El desarrollo de las lesiones será estudiado en distintos momentos posteriores a la lesión mediante:
 - Funduscopia *in vivo* para verificar el desarrollo de las lesiones

- Análisis de las alteraciones del EPR y de las capas externas de la retina mediante microscopía óptica en cortes obtenidos a partir de globos oculares fijados.
- Modificaciones en la expresión de genes de la respuesta antioxidante evaluadas mediante QPCR en células EPR aisladas *ex vivo*.



MATERIALES Y MÉTODOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Drogas y sustancias utilizadas

Extracto soluble de YM. Provisto por Establecimiento las Marías, Gdor. Virasoro, Corrientes, Argentina. No se trata de un producto comercial pero el mismo extracto ha sido utilizado en publicaciones de otros autores.²⁵⁸ Para los experimentos *in vitro* se partió de una solución madre concentrada (125 mg/ml en PBS), y se realizaron diluciones en medio de cultivo (125 y 250 µg/ml). Para la administración por vía oral (*in vivo*) se utilizó una solución al 40% preparada en agua potable filtrada a 80°C.

Ácido clorogénico (ácido 3-(3,4-dihidroxicinamoil) quínico), Sigma-Aldrich, C3878. Solución madre disuelta en etanol de 40 mM.

Ácido cafeico (ácido 3-4-dihidroxicinámico), Sigma-Aldrich, C0625. Solución madre disuelta en etanol de 112 mM.

Peróxido de hidrogeno (H₂O₂), Merck Química Argentina (Buenos Aires).

Iodato de sodio (NaIO₃, IS), Biopack, Argentina.

X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil β-D-galactopiranosido), Promega Corp, Madison, WI.

DCFHDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceina di-acetato), Thermofisher, Invitrogen, D399.

Poencaína (Proparacaina HCl 0,5%), Laboratorio Poen, Argentina. Dilución 1:3 en solución fisiológica.

Fotorretín (Fenilefrina HCL 5%, Tropicamida 0,5%), Laboratorio Poen, Argentina. Dilución 1:2 en solución fisiológica.

Acrylam (Ácido poliacrílico 0,2%), Laboratorio Poen, Argentina.

OCT (Optimal Cutting Temperature) Compound, Biopack, Argentina.

2.2 *Cultivo de línea celular*

Se utilizó la línea celular ARPE-19 proveniente de EPR humano, de la American Type Culture Collection. Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 (Life Technologies, Invitrogen, Argentina) con 2,5 mM de L-glutamina, 100 U/ml de estreptomicina/penicilina y 10% de suero fetal bovino (SFB; NATOCOR, Córdoba, Argentina), en atmósfera de aire con 5% de CO₂ a 37°C.

2.3 *Modelo animal*

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57Bl/6 de 8-11 semanas de edad, criados bajo condiciones de iluminación estándar con ciclos de luz/oscuridad, de 12 hs por etapa, y niveles máximos de iluminación de 60 lux. Todos los procedimientos se realizaron según las recomendaciones para el uso de animales en investigaciones oftalmológicas (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*, ARVO), y fueron aprobados por el CICUAL de la institución. Proyecto 19-10, Polifenoles de la yerba mate, Efectos protectores sobre el epitelio pigmentario de la retina (EPR) *in vivo* e *in vitro*.

2.3.1 Intervenciones y procedimientos.

2.3.1.1 Administración oral de extractos de yerba mate.

Se utilizó un extracto de yerba mate soluble (Las Marías, Corrientes). La administración fue por vía oral, 40 mg/día en 100 µl de agua potable, utilizando pipeta Gilson. Los controles recibieron agua potable en las mismas condiciones

2.3.1.2 Inyección intraperitoneal de NaIO₃

Se inoculó una dosis única de 20 mg/kg del compuesto, disuelto en solución fisiológica (NaCl 0,9%). El volumen inyectado fue de 100 µl.

2.3.1.3 Anestesia

Los animales fueron anestesiados con ketamina-dexmedetomidina (75 mg y 1 mg respectivamente por cada kilogramo de animal) inyectada por vía intraperitoneal. Para asegurar la analgesia se utilizó proparacaína 0,5% (dilución 1:3; Poencaína, Laboratorio Poen, Argentina) y para obtener midriasis se aplicó tropicamida 0,5% y fenilefrina 5% (dilución 1:2; Fotorretín, Laboratorio Poen, Argentina).

2.4 *Ensayos de viabilidad celular*

Las células ARPE-19 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo. Al día siguiente fueron tratadas con CHL, CAF (100 y 70 µM respectivamente) o YM (125 o 150 µg/ml) por 2 horas y expuestas a H₂O₂ (300 o 450 µM) por 90 minutos. La viabilidad celular fue evaluada a las 24 horas luego del daño oxidativo utilizando el ensayo colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol).²⁵⁹ El medio de cultivo fue reemplazado con una dilución 1:10 de la

solución madre de MTT (5 mg/ml en PBS) e incubado a 37°C por 4 horas. Finalizada la incubación, la solución de MTT fue removida y las células fueron lisadas en 150 µl de una solución de isopropanol y ácido clorhídrico 0.04 N. La densidad óptica a 550 nm se midió luego usando el equipo Multiscan FC microplate photometer (Thermo Scientific 1.00.79 MIB 51119000) y los resultados fueron normalizados con los valores de cultivos controles.

2.5 Inducción de senescencia y actividad β -galactosidasa (β -GAL)

Se establecieron cultivos en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 20.000 células por pocillo. De manera similar a los experimentos de viabilidad, se realizó el tratamiento con CAF, CHL o YM y luego se expusieron los cultivos a daño oxidativo utilizando H₂O₂ (150 µM) por 90 minutos. Este esquema de tratamiento-daño se repitió durante tres días seguidos y luego se cultivó las células en medio completo por 12 días. Luego, se identificaron las células β -GAL positivas utilizando un ensayo histoquímico.²⁶⁰ Los cultivos fueron fijados con formaldehído 3% en PBS por 5 minutos e incubados a 37 °C toda la noche con la solución de coloración (citrato de sodio 40mM, pH 6.0, X-Gal 1mg/ml, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM, K₂Cl₂ 2 mM). El recuento de células β -GAL positivas de cada experimento se realizó en al menos 5 fotografías de 2 pocillos diferentes para cada punto experimental.

2.6 Detección de EROs intracelulares

Los niveles intracelulares de EROs se midieron utilizando la sonda fluorogénica permeable DCFHDA. Para esto, las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 18 x 18 mm a una densidad de 30.000 células por cubreobjeto. Luego se realizó el tratamiento con CHL o CAF y la exposición a H_2O_2 150 μM , como ya fue descrito. Finalizado el daño oxidativo, los cultivos fueron lavados en medio fresco e incubados con la sonda por media hora (5 μM de DCFHDA). Una vez dentro de la célula, es desacetilada por enzimas celulares y oxidada por la presencia de EROs generando el compuesto fluorescente 2',7'diclorofluoresceína. Luego de realizar un lavado con PBS, se tomaron fotos de los cultivos utilizando el filtro de FITC de un microscopio de epifluorescencia (Nikon E800) y se cuantificó la densidad integrada de fluorescencia (pixels/célula) usando el programa ImageJ.

2.7 Procedimientos Inmunoquímicos

2.7.1 Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en cubreobjetos y expuestas a tratamiento y daño oxidativo como se describió anteriormente. A distintos tiempos desde el inicio del tratamiento, fueron fijadas utilizando paraformaldehído 4% por 20 minutos, permeabilizadas con PBS/Triton X-100 1,1 % por 5 minutos y bloqueadas usando una solución de albúmina de suero bovino 2% en PBS durante 1 hora. La incubación con anticuerpos primarios fue realizada toda la noche a 4°C, seguida de la incubación con anticuerpo secundario por 2 horas. En la Tabla 2 se detallan las fuentes de obtención y

concentraciones usadas de cada anticuerpo. Luego de la incubación con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 2 µg/ml por 5 minutos, los cubreobjetos fueron montados con PBS-glicerol 1:1 y se tomaron fotografías de los cultivos utilizando el microscopio Nikon E800. Para la determinación de células positivas para p-H2AX en cada experimento, se contaron no menos de 50 células de dos cubreobjetos de cada tratamiento. Se consideraron positivos los núcleos con una cantidad mayor o igual a 5 *foci* de p-H2AX.

2.7.2 Western blot

Para los experimentos de Western blot, las células fueron sembradas en placas plásticas de 10 cm de diámetro a una densidad de 12.000 células por cm². El esquema de tratamiento y daño fue el mismo que en el caso de los cultivos analizados por inmunofluorescencia. A diferentes tiempos luego de iniciado el tratamiento con polifenoles, las células fueron cosechadas y lisadas con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 2% y ortovanadato de sodio 1 mM. La concentración de proteínas en el extracto fue cuantificado utilizando el método de Bradford.²⁶¹ Se desnaturalizaron las proteínas incubando la muestra con buffer de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%) a 99°C por 5 minutos. Se sembraron 20 µg de proteína por calle en geles de poliacrilamida 15% y se separaron los extractos mediante electroforesis (120 v, 2 horas; BioRAD, Canton, MA). Las proteínas separadas según su peso fueron transferidas (100 v, 90 minutos) a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 1 hora en solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% en TBS 1X) y se las incubó con los anticuerpos primarios de interés (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Terminada la

incubación las membranas se lavaron con Tween-TBS (Tween 20 1% en TBS 0,01 M) por 5 minutos tres veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados para cada caso durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante.

En caso de que se usaran anticuerpos secundarios biotinilados, las membranas fueron lavadas nuevamente y se requirió una última incubación con Extravidina-Peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 h con agitación constante.

Finalmente, las membranas fueron lavadas con Tween-TBS (Tween 20 1% en TBS 0,01 M) por 10 minutos 3 veces y luego dos veces más con TBS 0,01 M.

Se realizó el revelado por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) exponiendo a placas sensibles (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) o utilizando el equipo LI-COR C-DiGit (Lincoln, NE).

La densidad de píxeles por banda se cuantificó utilizando el programa ImageJ, y se presentó la relación entre la proteína de interés y β -actina (utilizada como control de carga).

Anticuerpo	Especie	Fuente/dilución
p21	Clon SX118, Ratón	BD Biosciences (556430) / 1:200
p16 ^{INK4}	Clon G175-405, Ratón	BD Biosciences (551153) / 1:200
p-H2AX	Conejo	ABCAM (ab2896) / 1:1000

BCL2	Ratón	Santa cruz (sc-7382) / 1:1000
p-CREB	Conejo	Cell Signaling (87G3) / 1:1000
actin	Conejo (N-terminal)	Sigma-Aldrich (A2103) / 1:1000
Alexa Fluor®488	Cabra anti conejo	Molecular Probes; Invitrogen; dilución 1:500
Secundario conjugado a peroxidasa	Cabra anti conejo	SigmaAldrich, St. Louis, MO; dilución 1:1000
Secundario conjugado a peroxidasa	Cabra anti ratón	SigmaAldrich, St. Louis, MO; dilución 1:1000

Tabla 2: *Lista de anticuerpos utilizados*

2.8 Extracción de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)

Las células fueron sembradas en placas plásticas de 10 cm de diámetro a una densidad de 12.000 células por cm². Siguiendo el mismo esquema de tratamiento y daño ya explicado, se tomaron muestras a diferentes tiempos luego de iniciado el tratamiento con polifenoles.

Los estudios *in vivo* se realizaron por cuadruplicado. Para cada experimento se estudiaron 7 condiciones, utilizando 2 animales por tratamiento.

La extracción de ARN de las muestras se realizó utilizando el kit General RNA Extraction kit (R1051, Dongsheng Biotech, Guangdong, China).

La concentración de ARN obtenida se determinó utilizando el espectrofotómetro GeneQuant1300. El ADNc se sintetizó a partir de 1,5 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (ThermoFisher, Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evaluar los niveles de expresión de ARNm, el ADNc se amplificó utilizando el ciclador Stratagene Mx 3005P. El cálculo de la expresión de los genes de interés se llevó a cabo mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (cuantificación relativa). Las muestras fueron sembradas en placas de 96 pocillos junto con la mezcla de reacción SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher) y los cebadores específicos (volumen final 25 µl), que fueron diseñados mediante Primer Blast y sintetizados por ThermoFisher (Invitrogen, Argentina). Las secuencias específicas de cada cebador se presentan en la Tabla 3.

Los parámetros de ciclado fueron 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 35 segundos a 56 °C y 60 segundos a 60 °C, finalizando con un ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 95°C.

Los niveles de ARN de interés se normalizaron contra los de GAPDH de la misma muestra en los experimentos *in vitro* y con los de actina en los experimentos *in vivo*. Cada reacción se realizó por duplicado o triplicado, y se verificó la amplificación de un único producto construyendo las curvas de disociación de cada uno. La cantidad relativa del producto de PCR los cultivos control se estableció en 1. Se efectuó un control negativo para cada cebador.

ARNm	Cebador sentido	Cebador anti sentido
NRF2 Humano	5' TCTGCCAACTACTCCCAGGT 3'	5' GGAATGTCTGCGCCAAAAG 3'
SOD2 Humano	5' GAACCCAAAGGGGAGTTGCT 3'	5' AGCCTTGGACACCAACAGAT 3'
SIRT1 Humano	5' TTCAGTGGCTGGAACAGTGA 3'	5' ACTGATTACCATCAAGCCGCC 3'
GAPDH Humano	5' GGGGCTGCCCAGAACATCAT 3'	5' GCCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'
NRF2 Murino	5' TAGATGACCATGAGTCGCTTGC 3'	5' CTGATGAGGGGCAGTGAAGAC 3'
SOD2 Murino	5' AAGTTCAATGGTGGGGGACATA 3'	5' AGCAACTCTCCTTTGGGTTCT 3'
RPE65 Murino	5' ACAACATTGGGAATTGCTTTGGA 3'	5' TGGATCTTCCTTGTCTGCTTTCA 3'
Actina Murino	5' CACTGTCGAGTCGCGTCC 3'	5' CCTTCTGACCCATTCCCACC 3'

Tabla 3: Lista de cebadores utilizados para qPCR

2.9 Examen del fondo de ojo

Los animales fueron anestesiados utilizando ketamina-dexmedetomidina como se explicó anteriormente. Una vez aplicados el anestésico local y el midriático, la córnea fue cubierta por un gel ocular (Acrylam) y un cubreobjetos limpio.^{262,263}

Para visualizar el fondo de ojo se utilizó el microscopio quirúrgico (Carl Zeiss) y se tomaron fotografías utilizando un iPhone SE acoplado al ocular del microscopio con un soporte específico (sistema mostrado en la Figura 15)

Se realizaron 3 experimentos utilizando, en cada uno, 3 animales por tratamiento.

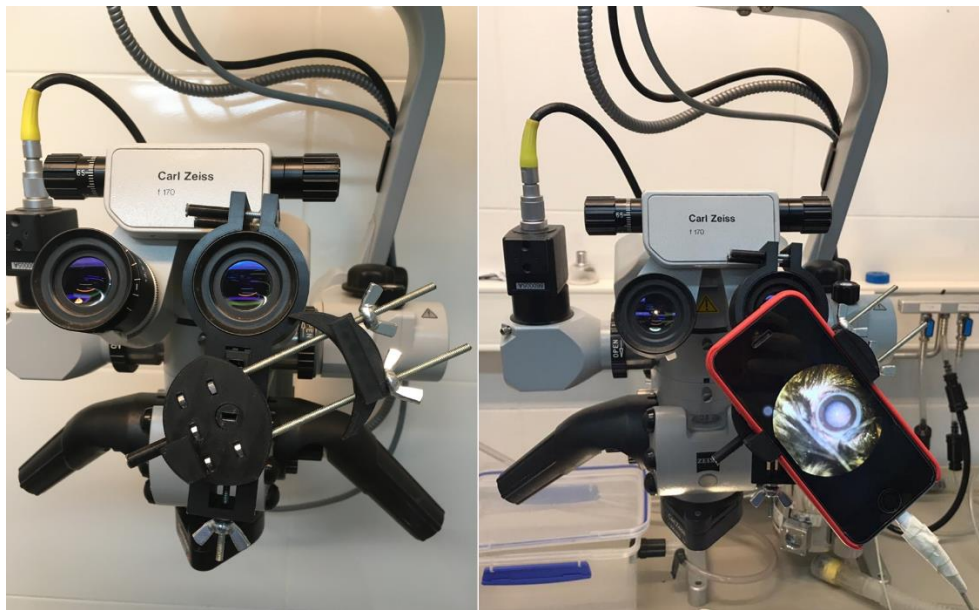


Figura 15: Sistema de obtención de imágenes de fondo de ojo acoplado un iPhone SE al ocular del microscopio quirúrgico con un soporte especialmente diseñado para ese propósito.

2.10 Muestras de tejidos

2.10.1 Enucleación y fijación

Los animales recibieron una dosis letal de hidrato de cloral (2,2,2-tricloroetano-1,1,1-triol) recién disuelto por vía intraperitoneal. Se marcaron los cuadrantes dorsolaterales de los globos oculares y luego se procedió a la enucleación de los mismos. Los ojos enucleados se colocaron en fijador de Davidson donde permanecieron a temperatura ambiente

toda la noche. Al día siguiente se realizaron pasajes en concentraciones crecientes de sacarosa (5%, 7,5%, 10, 15% y 20%) a 4°C.^{264,265}

2.10.2 Cortes en crióstato

Se armaron tacos para cortes en crióstato incluyendo los ojos en OCT y congelándolos en acetona sobre nitrógeno líquido. Cada taco contenía un ojo control y uno experimental, dispuestos en forma tal de obtener cortes paralelos al ecuador.²⁶⁶ Se obtuvieron cortes de 10 µm de espesor utilizando un criostato Microm (HM 500 OM). Se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados y se secaron a temperatura ambiente por al menos 2 horas antes de su utilización.

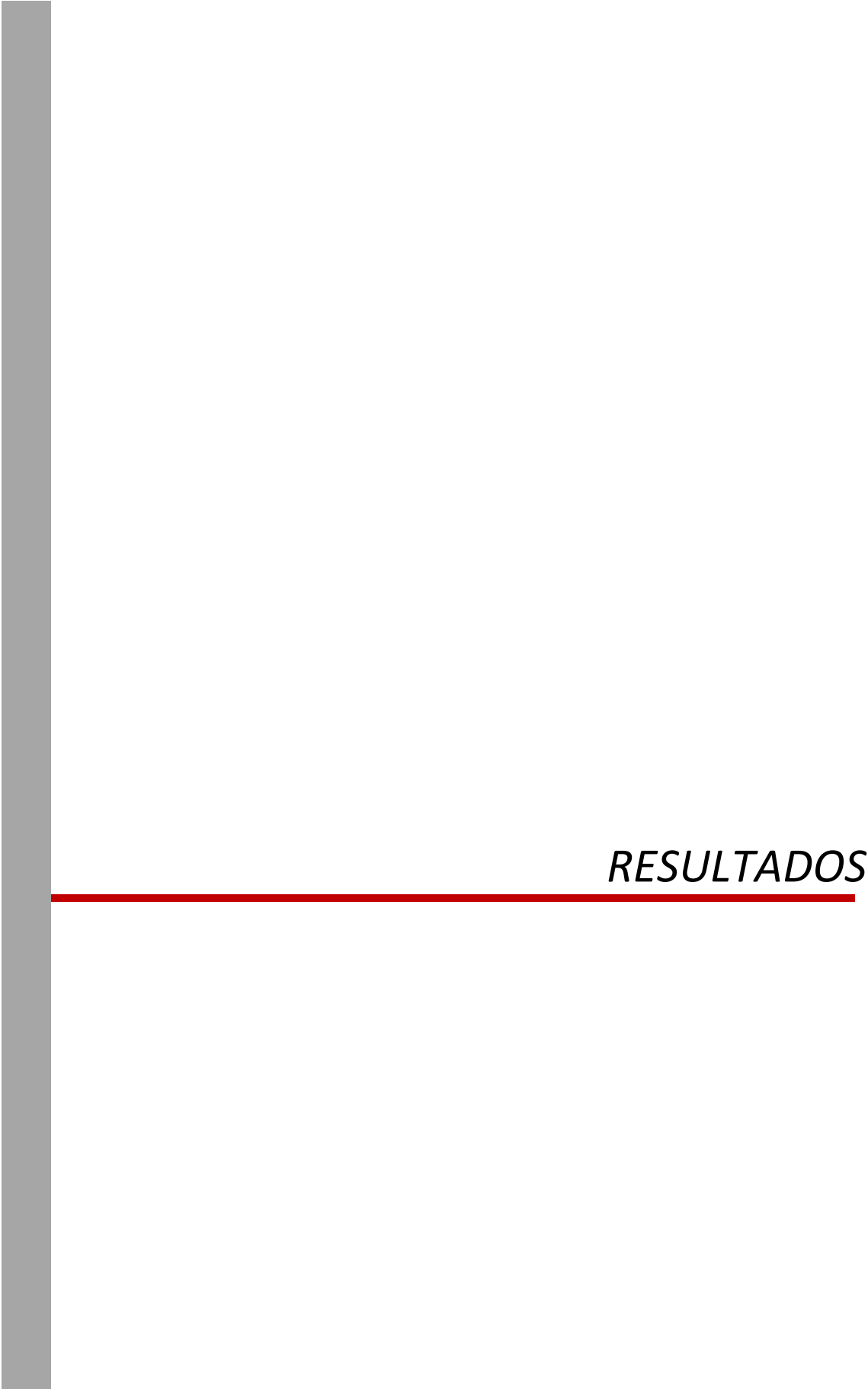
2.10.3 Técnicas histológicas

Una vez secos, los cortes fueron lavados 2 veces en PBS (5 minutos cada vez) y se cubrieron con una solución al 2% de colorante Rojo Neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) por 8 minutos. Pasado ese tiempo se sumergieron en alcoholes de graduación creciente (70 a 100%), se hicieron dos pasajes en xilol y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopack). Los preparados histológicos terminados fueron observados y fotografiados utilizando un microscopio Leica DM500 con una cámara ICC50 E (Bio-Optic, Argentina).

Se realizaron 3 experimentos, cada uno con 3 animales por tratamiento.

2.11 *Análisis estadístico*

La normalidad de los datos obtenidos fue evaluada usando el test de Shapiro-Wilks. Cuando presentaron una distribución normal las comparaciones entre grupos se realizaron usando ANOVA de una vía, seguido del método de Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Este mismo método, pero sin el análisis previo por ANOVA, fue realizado para los datos de comportamiento no paramétrico. Todos los cálculos se hicieron con el programa SigmaPlot versión 14 (Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.systatsoftware.com). Las diferencias significativas se indican en cada gráfico utilizando asteriscos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).



RESULTADOS

3 DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS: POLIFENOLES Y EXTRACTOS DE *ILEX PARAGUARIENSIS* EN CULTIVOS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Para cumplir el primer objetivo estudiamos el efecto de CAF, CHL y extractos de YM sobre cultivos de células ARPE-19, una línea celular derivada del EPR humano. Estas células fueron expuestas a H_2O_2 en condiciones que simulan el estrés oxidativo que acompaña al envejecimiento.⁵² El H_2O_2 no es un radical libre, pero se descompone fácilmente para generar radicales hidroxilo ($\bullet OH$), una especie química que posee un electrón desapareado y por lo tanto es altamente inestable y reactivo.

3.1 *Supervivencia celular frente a dosis altas de estrés oxidativo*

Como se explicó anteriormente, la retina se encuentra expuesta a niveles altos de estrés oxidativo como consecuencia de la exposición continua a la luz, su elevada tasa metabólica y su alta demanda de oxígeno. El EPR cumple un rol crítico en la defensa antioxidante de la retina. Por una parte, detoxifica EROs generados en la región externa de la retina, y por la otra capturan y degradan los discos membranosos envejecidos, que acumulan moléculas oxidadas, y que se desprenden de los segmentos externos en el espacio subretinal.^{5-7,9,12} Todos estos procesos aumentan la producción de EROs, que reaccionan con componentes moleculares de las células alterando sus propiedades funcionales y su capacidad de supervivencia. Cabe notar que las células y los tejidos poseen defensas naturales contra el estrés oxidativo y que las lesiones solo aparecen cuando estas defensas fallan o son insuficientes.⁹⁻¹¹ En consecuencia, se decidió evaluar

si los polifenoles de la YM eran capaces de aumentar la supervivencia de las células de EPR cuando éstas eran expuestas a niveles elevados de EROs.

Se incubaron cultivos de células ARPE-19 con CAF 70 μM o CHL 100 μM por dos horas y luego se los expuso a 300 o 450 μM de H_2O_2 por 90 minutos. Las concentraciones elegidas de CAF y CHL se encuentran en el rango de las reportadas en bibliografía.^{267,268}

Además, no mostraron evidencia de toxicidad en experimentos preliminares realizados en el laboratorio.

La viabilidad fue determinada mediante el ensayo de MTT. La exposición a H_2O_2 300 μM redujo la viabilidad celular al $62 \pm 2\%$, mientras que después de 450 μM la viabilidad descendió al $50 \pm 3\%$. El oxidante disminuyó la viabilidad en forma dependiente de su concentración.

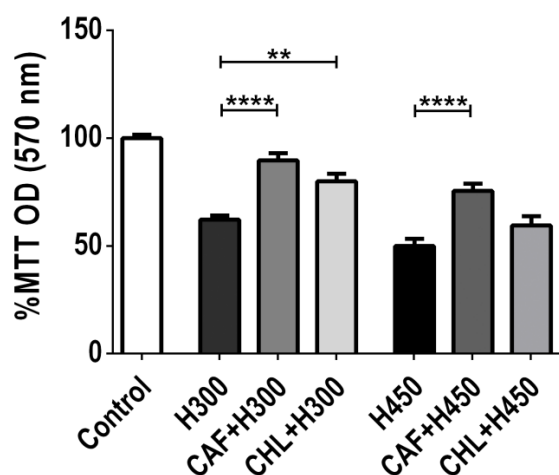


Figura 16: Resultados de viabilidad medida por MTT en cultivos control y en cultivos expuestos a 300 o 450 μM de H_2O_2 (H300 o H450), pretratados (o no) con CAF 70 μM (CAF+H300 o CAF+H450) o CHL 100 μM (CHL+H300 o CHL+H450).

La preincubación con ambos polifenoles disminuyó el efecto tóxico del H₂O₂. Los cultivos pretratados con polifenoles mantuvieron una viabilidad significativamente mayor que aquellos expuestos solo al oxidante. En los cultivos pretratados con CAF, la viabilidad se mantuvo en $90 \pm 3\%$ y $76 \pm 3\%$ para los cultivos expuestos a H₂O₂ 300 y 450 μ M respectivamente. Para los pretratados con CHL, la viabilidad alcanzó el $81 \pm 9\%$ y el $60 \pm 4\%$ después de las mismas exposiciones. Estos resultados evidenciaron que ambos polifenoles pueden evitar la muerte celular en células ARPE-19 expuestas a estrés oxidativo.

3.2 Evaluación de la generación de EROs intracelulares

Para verificar si la mayor resistencia al H₂O₂ fue debida a un efecto de los polifenoles sobre los niveles intracelulares de EROs generados por la exposición al oxidante, se utilizó la sonda fluorescente DCFH-DA. En este experimento se midió la generación intracelular de EROs después de una dosis subletal de H₂O₂ (150 μ M por 90 minutos), en cultivos con y sin pretratamiento de CAF y CHL.

En los cultivos control no se observó señal fluorescente, mientras que en cultivos expuestos a H₂O₂, la mayor parte de las células presentó una fluorescencia muy intensa.

Los cultivos tratados con CAF y CHL presentaron una intensidad de fluorescencia mucho menor que los cultivos expuestos a H₂O₂ sin tratamiento previo (Figura 17). Estos resultados muestran que ambos polifenoles redujeron la producción de EROs intracelulares generados por el oxidante.

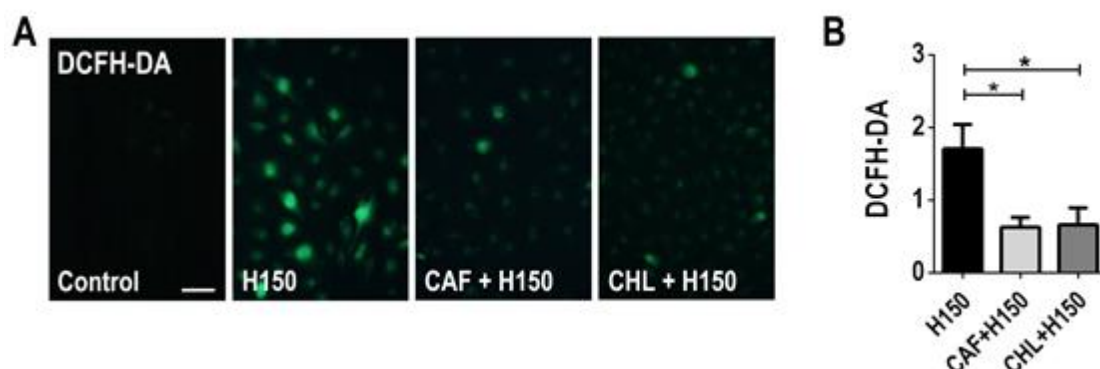


Figura 17: Detección de EROs intracelulares utilizando la sonda DCFH-DA. A, microfografías de cultivos control, expuestos a 150 μ M de H_2O_2 (H150) y pretratados con CAF o CHL y luego expuestos a daño (CAF+H150 y CHL+H150 respectivamente). Barra de calibración 100 μ m. B, Cuantificación de la densidad de fluorescencia (píxel/célula).

3.3 Modificación en la expresión de la histona p-H2AX

Dado que una de las consecuencias principales del estrés oxidativo es el daño al ADN, estudiamos el comportamiento de la histona H2AX en cultivos expuestos a daño oxidativo con y sin tratamiento previo de polifenoles luego de 24 horas de la exposición. La histona H2AX en su forma fosforilada (p-H2AX) es un marcador de daño de doble hebra en el ADN.²⁶⁹ Se puede detectar por inmunofluorescencia fácilmente, ya que se acumula en los sitios de daño formando cúmulos de señal fluorescente (foci).

No se detectó p-H2AX en los cultivos controles, mientras que el $66.0 \pm 0.6\%$ de los núcleos presentaron al menos 5 foci de la histona en los cultivos expuestos a la dosis

subletal de H_2O_2 , 150 μM por 90 minutos (Figura 18), evidenciando un nivel importante de daño del ADN.

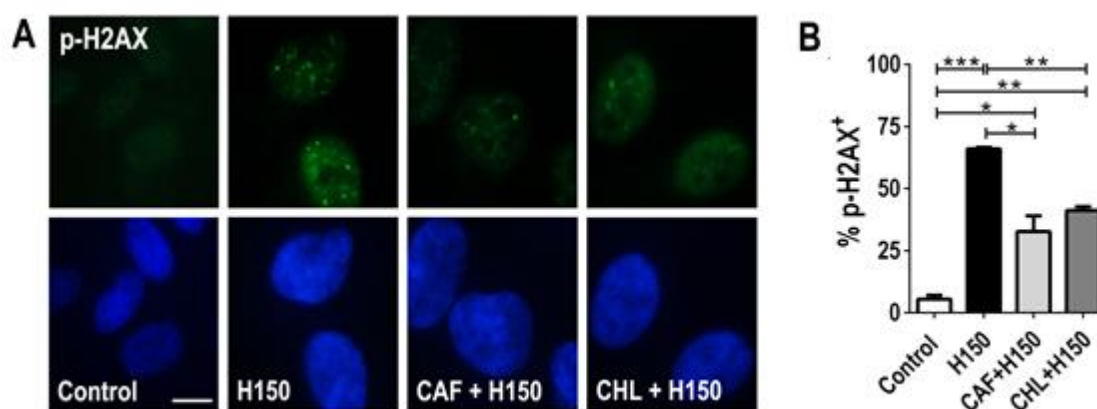


Figura 18: Detección de la histona H2AX por inmunofluorescencia. A. Microfotografías de cultivos control, expuestos a 150 μM de H_2O_2 (H150) y pretratados con CAF o CHL y luego expuestos a daño (CAF+H150 y CHL+H150 respectivamente). Arriba, detección inmunofluorescente de p-H2AX, abajo, núcleos marcados con DAPI. Barra de calibración 10 μm . B, Cuantificación del número de núcleos positivos (con 5 o más focos de daño) para cada tratamiento.

En los cultivos preincubados con CAF o CHL, solamente el $32.8 \pm 6.3\%$ de los núcleos contenía al menos 5 focos de p-H2AX en los cultivos tratados con CAF, y el $41.3 \pm 1.6\%$ cuando los cultivos recibieron tratamiento de CHL previo al daño (Figura 18).

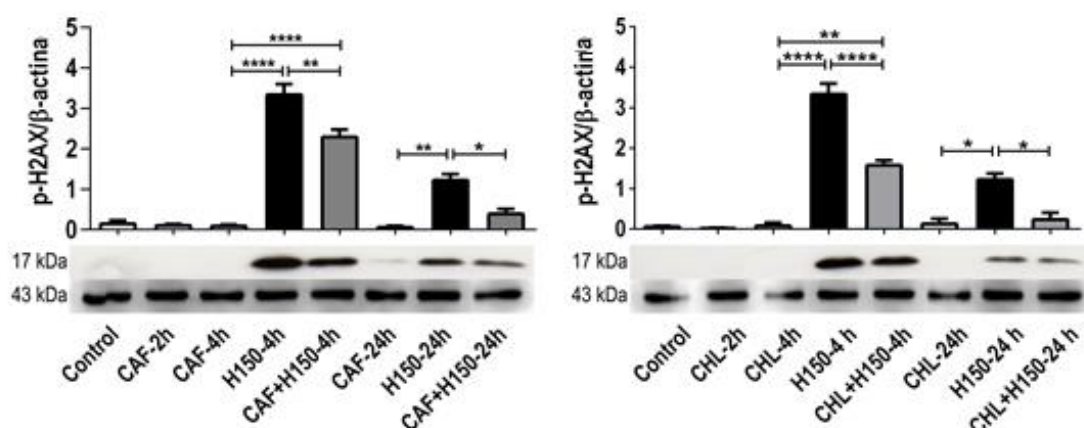


Figura 19: Expresión de p-H2AX medida por Western blot. Izquierda, tratamiento con CAF. Derecha, tratamiento con CHL. Resultados normalizados a la cantidad de actina presente en cada muestra. Los experimentos se inician a tiempo 0 y se toman muestras a las 2 horas (fin del tratamiento con polifenoles), a las 4 horas (media hora después de finalizado el daño oxidativo) y a las 24 horas. Se muestran los resultados para cultivos control, cultivos sólo tratados con CAF o CHL, cultivos sólo expuestos a daño oxidativo (H150) y cultivos tratados con polifenoles y luego expuestos a daño (CAF+H150 o CHL+H150)

En concordancia con los resultados de inmunofluorescencia, el análisis por Western blot de la expresión de la histona mostró un aumento significativo luego de las 4 y las 24 horas de iniciado el experimento (Figura 19). El pretratamiento con CAF o CHL redujo los valores de p-H2AX a las 4 h a la mitad de lo observado en los cultivos expuestos únicamente al oxidante. A las 24 horas, en los cultivos tratados con polifenoles, los niveles de p-H2AX eran mínimos y no diferían de los observados en cultivos sin exposición a daño oxidativo (Figura 19). Estos experimentos mostraron claramente la

capacidad de los polifenoles de la YM para reducir el daño al ADN provocado por el estrés oxidativo.

3.4 Inducción del fenotipo senescente

La acumulación de EROs y su consecuente efecto en el daño a componentes celulares como el ADN son los primeros pasos en el desarrollo de la senescencia prematura celular.²⁰ Para verificar la aparición del fenotipo senescente, se evaluaron la actividad β -galactosidasa mediante un procedimiento histoquímico y la expresión de p16INK4A y p21CIP1, dos inhibidores del ciclo celular.^{39,40}

Para la inducción de senescencia se utilizó un protocolo de exposición crónica a estrés oxidativo, incubando los cultivos a 150 μ M de H₂O₂ por 90 minutos, durante tres días consecutivos.⁵² Siguiendo este esquema, luego de 12 días de comenzado el daño, más del 80% de las células en cultivo presentaron actividad β -galactosidasa (β -GAL+). El tratamiento con polifenoles, 2 horas antes de cada exposición a H₂O₂ redujo significativamente el porcentaje de células β -GAL+ a 47% en los cultivos que recibieron CAF y 45% en aquellos que recibieron CHL (Figura 20).

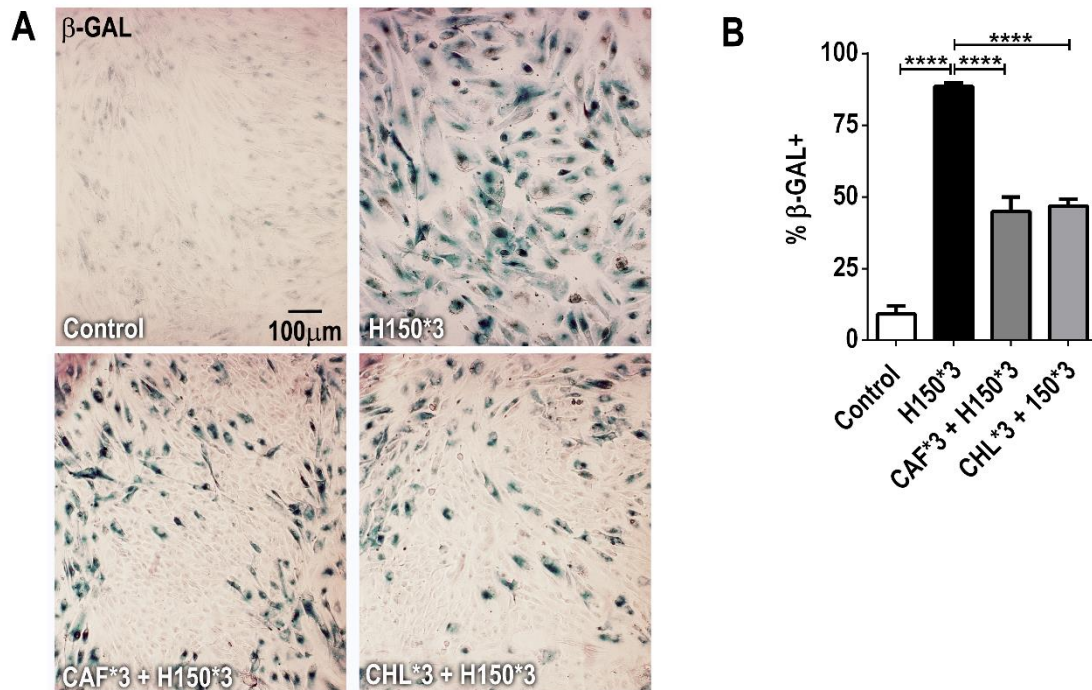


Figura 20: Evaluación de la actividad β -galactosidasa en cultivos control, expuestos a daño oxidativo crónico (H150*3) y tratados con polifenoles antes de cada exposición (CAF*3+H150*3 o CHL*3+H150*3). A, microfotografías de los cultivos que muestran las células β -GAL+ en cada condición. Estas células son de mayor tamaño que las β -GAL-, otro marcador de la senescencia. B, cuantificación del número de células β -GAL+ presentes en cada caso.

Resultados similares se observaron al evaluar los niveles de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p16 y p21. La incubación con CAF y CHL disminuyó los niveles de ambas proteínas al 30 y 47% comparados con cultivos expuestos a daño oxidativo crónico sin pretratamiento con polifenoles (Figura 21). En conjunto, estos resultados indicaron que el pretratamiento con polifenoles previene el desarrollo del fenotipo senescente en células ARPE-19.

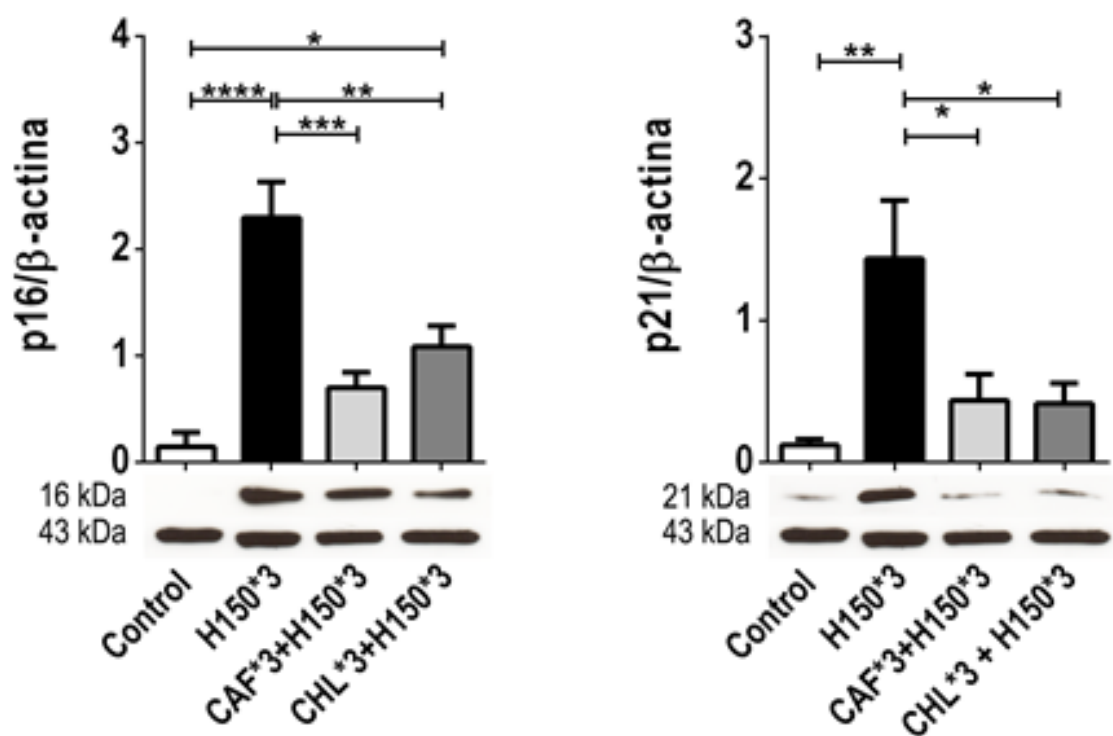


Figura 21: Evaluación por Western blot de los niveles de las proteínas inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclinas p16INK4A Y p21CIP1. Las barras muestran los valores de cultivos control, cultivos expuestos a daño oxidativo crónico (H150*3) y cultivos tratados con polifenoles antes de la exposición al agente oxidante (CAF*3+H150*3 o CHL*3+H150*3). Resultados normalizados a la cantidad de actina presente en cada muestra.

3.5 Vías de protección activadas por CAF y CHL

3.5.1 Evaluación de los niveles de activación de CREB

La activación por fosforilación del factor de transcripción CREB implica, un aumento en la expresión de genes que regulan la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación en células del sistema nervioso.^{146,147} Esto, junto con el hecho de que muchos polifenoles

tienen acción sobre CREB, le da una relevancia importante al momento de evaluar las posibles vías de señalización involucradas en los efectos de CAF y CHL.

Los polifenoles se aplicaron durante 2 h antes de la exposición a H₂O₂ durante 90 min, del mismo modo que para la detección de p-H2AX. Se tomaron muestras a las 2 horas (fin del tratamiento con polifenoles) y a las 4 horas (media hora después de finalizado el daño oxidativo). Los cultivos que no tenían tratamiento o daño permanecieron el tiempo correspondiente en medio fresco.

En las células expuestas a CAF o CHL sin exposición a daño oxidativo, se observó un aumento significativo de los niveles de p-CREB a las 2 h (es decir, al final de la incubación con los polifenoles). El medio con CAF o CHL fue entonces reemplazado por medio fresco, donde se incubaron las células por otras 2 h. Cumplidas las 4 h, el aumento de p-CREB se mantuvo, a pesar de que los polifenoles ya habían sido retirados del medio.

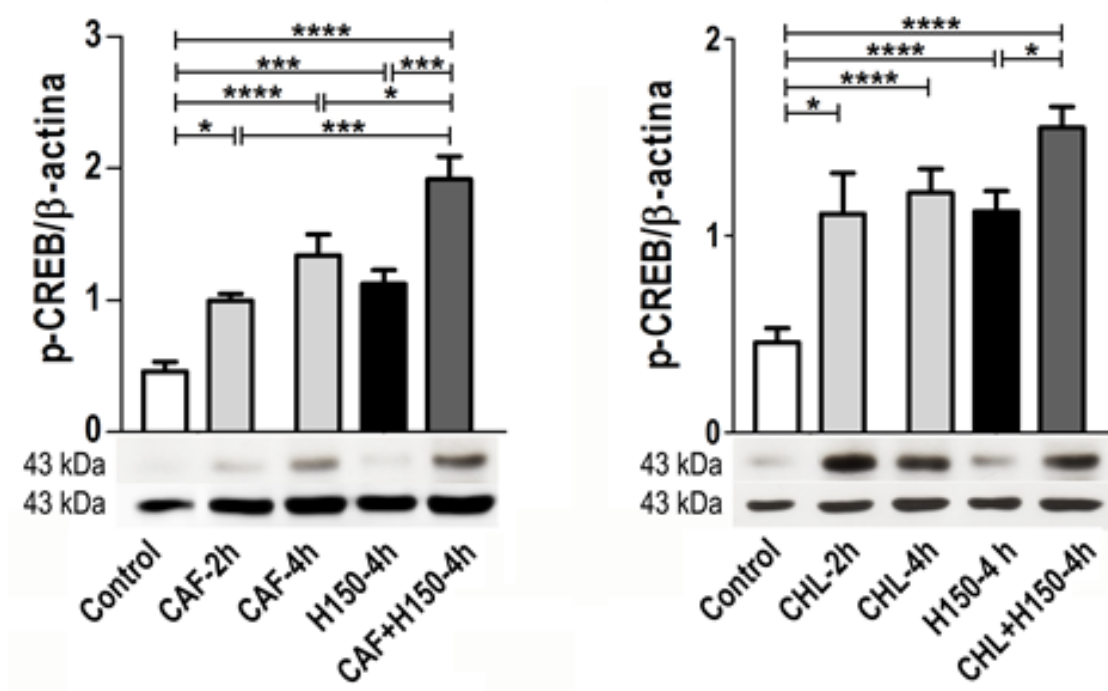


Figura 22: Niveles de p-CREB medidos por Western blot. Izquierda, tratamiento con CAF. Derecha, tratamiento con CHL. Resultados normalizados a la cantidad de actina presente en cada muestra. Las barras representan cultivos control, cultivos sólo tratados con CAF o CHL, cultivos sólo expuestos a daño oxidativo (H150) y cultivos tratados con polifenoles y luego expuestos a daño (CAF+H150 o CHL+H150).

El daño con 150 μ M de H₂O₂ por 90 minutos también incrementó los niveles de p-CREB. Este incremento se debió muy probablemente a la respuesta normal de las células frente al estrés oxidativo y alcanzó valores similares a los que generan los polifenoles.

La activación de p-CREB en cultivos tratados con polifenoles y luego expuestos a daño oxidativo fue la más alta de todos los casos estudiados, siendo significativamente superior a la alcanzada en la respuesta al daño.

Estos resultados sugieren que la incubación con CAF y CHL “prepara” las defensas celulares contra el estrés oxidativo, permitiéndole a las células no solo tener la maquinaria lista para afrontar el daño, sino también responder de forma más eficiente y con una expresión mayor de los genes de supervivencia.

3.5.2 Expresión de BCL2

Uno de los principales blancos de p-CREB es el mecanismo que controla el aumento en la expresión de BCL2 (nombre derivado del inglés *B cell lymphoma 2*).²⁷⁰ Es debido a esto que decidimos estudiar si el aumento en la activación de p-CREB producido por los polifenoles de la YM se correspondía con un aumento en la expresión de BCL2.

Siguiendo un patrón similar al observado con p-CREB, los resultados de Western blot mostraron que, cuando los cultivos fueron incubados con polifenoles, la expresión de BCL2 aumentó con respecto a controles sin tratar. El aumento de BCL2 inducido por CAF fue significativo una vez completado el tratamiento (CAF 2 h) y se mantuvo a las 4 horas (luego de dos horas extra en medio fresco). El efecto de CHL fue similar, solo que el incremento de BCL2 a las 2 h no resultó estadísticamente significativo, como si lo fue 2 h más tarde.

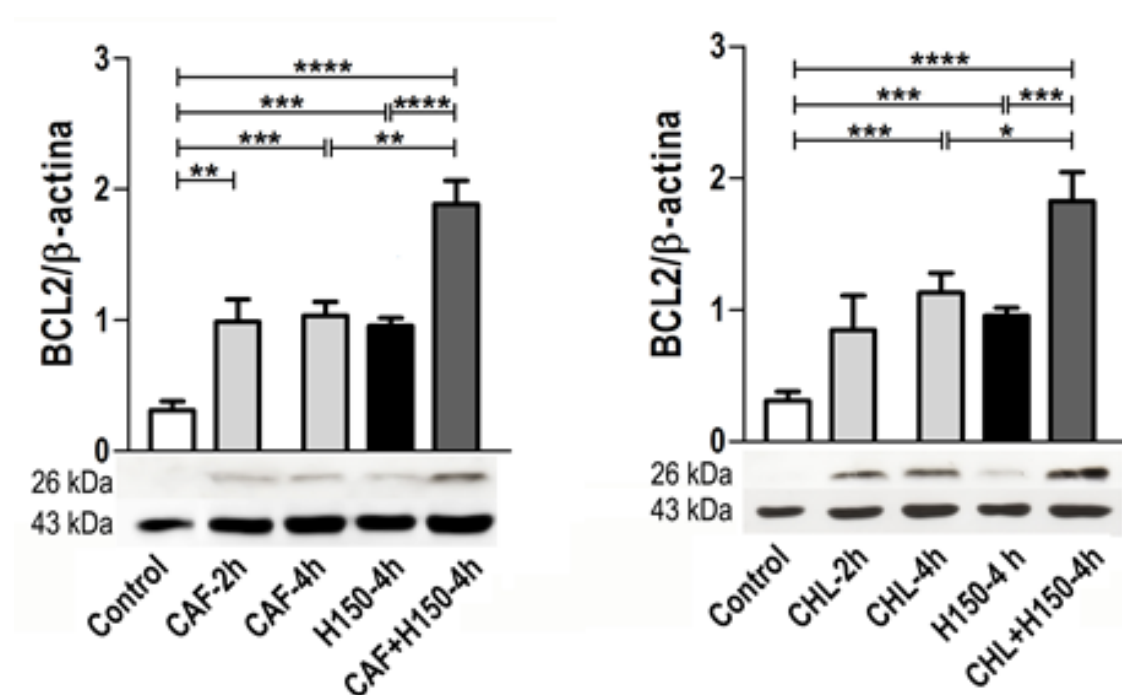


Figura 23: Niveles de expresión de BCL2 medidos por Western blot. Izquierda, tratamiento con CAF. Derecha, tratamiento con CHL. Resultados normalizados a la cantidad de actina presente en cada muestra. Las barras representan cultivos control, cultivos sólo tratados con CAF o CHL, cultivos sólo expuestos a daño oxidativo (H150) y cultivos tratados con polifenoles y luego expuestos a daño (CAF+H150 o CHL+H150).

En respuesta al oxidante, BCL2 aumentó de forma simultánea al incremento de p-CREB.

El mayor incremento de BCL2 se dio en cultivos tratados con polifenoles y luego expuestos al oxidante. Este resultado coincidió con el observado para p-CREB y confirmó que la incubación con CAF y CHL le permitió a los cultivos tener la maquinaria celular preparada para responder de forma más eficiente frente al daño.

3.5.3 Activación de vías antioxidantes

Con el fin de evaluar si CAF y CHL eran capaces de activar otras vías de protección incluso en ausencia de daño oxidativo, estudiamos el comportamiento de la expresión de NRF2 y SOD2 dado que son genes involucrados en la defensa antioxidante (ver sección 1.3.4.3). La activación de NRF2 es la principal vía de protección celular frente al estrés oxidativo. Esta proteína actúa como factor de transcripción, modulando la expresión de enzimas antioxidantes y con capacidad de detoxificación como por ejemplo SOD2.^{162,179,271}

Además, estudiamos la expresión de sirtuina 1 (SIRT1), otro gen involucrado en la defensa celular. Las sirtuinas son enzimas desacetilasas de histonas que utilizan nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) como cofactor. SIRT1 es el miembro más estudiado de la familia ya que actúa como sensor energético y su actividad es de gran relevancia en el control de la homeostasis celular en respuesta al estrés. También regula diversos procesos entre los que se incluyen la reparación de ADN, la apoptosis, la biogénesis mitocondrial y la respuesta inflamatoria, lo que la ubica en un papel principal como agente protector frente al envejecimiento.^{272,273}

Los cultivos fueron expuestos durante 2 horas a CAF o CHL y luego mantenidos en medio fresco durante 2 h más. Se tomaron muestras al momento de retirar los polifenoles (2

horas) y al finalizar la incubación con medio fresco (4 horas). Luego se extrajo el ARN y se analizaron los niveles de NRF2, SOD2 y SIRT1 por qPCR.

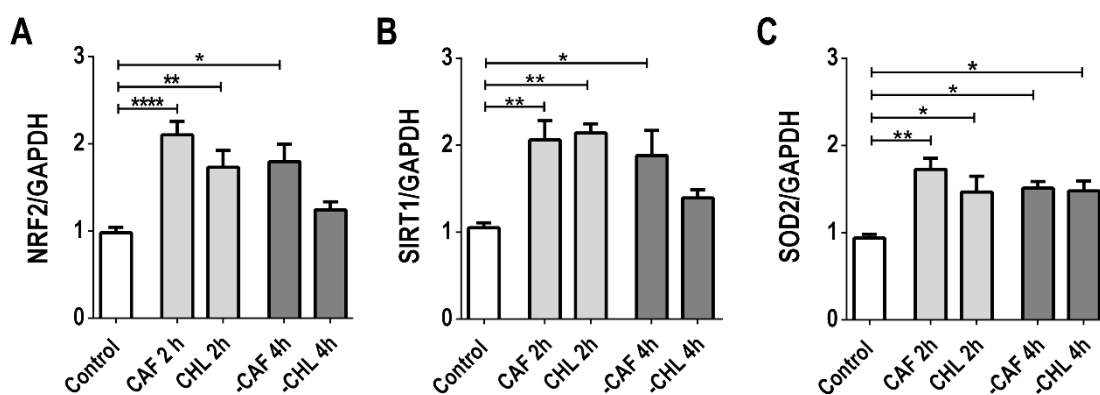


Figura 24: Expresión de NRF2, SOD2 y SIRT1 evaluada por qPCR. Las barras representan cultivos control y cultivos tratados con CAF o CHL a 2 y 4 horas. Se grafica la tasa de cambio respecto del gen control (GAPDH) de cada muestra.

Luego de la exposición a polifenoles durante 2 h, los niveles de NRF2 y SIRT1 duplicaron los valores de cultivos controles. El incremento de SOD2 fue menor pero igualmente significativo. A las 4 horas sólo los cultivos tratados con CAF mantuvieron elevados los valores de NRF2 y SIRT1 con respecto al control, mientras que ambos polifenoles generaron un aumento duradero de SOD2, que continuó incluso luego de 2 horas de remover el tratamiento (Figura 24).

3.6 *Efecto del extracto soluble de YM*

3.6.1 Viabilidad celular

Una vez demostrado que los polifenoles aislados de la YM fueron capaces de proteger a las células ARPE-19 del estrés oxidativo, activando vías de supervivencia y antioxidantes y previniendo el desarrollo del fenotipo senescente prematuro, nos propusimos evaluar si era posible obtener el mismo efecto protector utilizando un extracto soluble de YM.

Los cultivos de células ARPE-19 fueron preincubados durante 2 horas con el extracto a dos concentraciones diferentes, 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (YM125 y YM250 respectivamente) y luego expuestos a estrés oxidativo utilizando H_2O_2 para ser evaluados por MTT como se explicó en la sección 3.1.

La exposición al oxidante redujo la viabilidad celular a niveles similares a los observados previamente: $64 \pm 2\%$ con H300 y $56 \pm 3\%$ con H450, en comparación con cultivos control). El pretratamiento con ambas concentraciones de YM no sólo no afectó la viabilidad celular, sino que además redujo significativamente el efecto tóxico asociado al estrés oxidativo para las dos concentraciones de H_2O_2 .

Como se observa en la figura 25, la supervivencia de los cultivos pretratados con YM125 fue del $86 \pm 2\%$ y $67 \pm 7\%$ luego de H300 y H450 respectivamente. La incubación con YM250 tuvo un efecto aun mayor, manteniendo el $90 \pm 3\%$ de viabilidad luego de exponer a H300 y $85 \pm 4\%$ luego de H450.

Estos resultados coincidieron con los observados al analizar los polifenoles individuales de la YM, permitiendo atribuirle el mismo efecto protector frente al estrés oxidativo al extracto soluble utilizado.

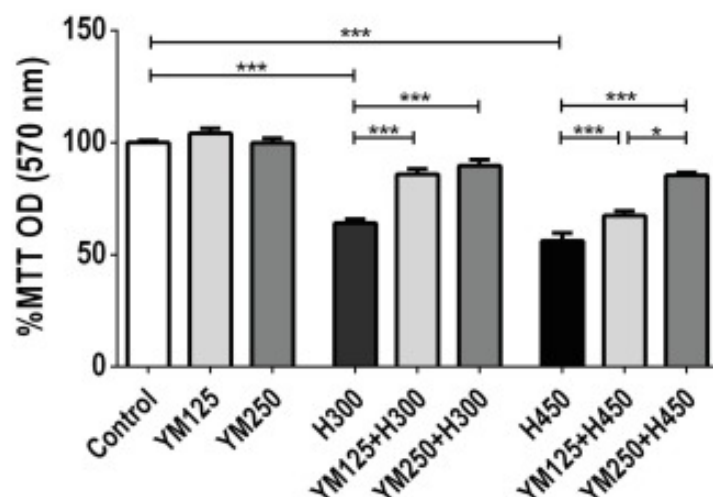


Figura 25: Resultados de viabilidad medida por MTT en cultivos control, tratados con YM125 o YM250, expuestos a 300 o 450 μM de H_2O_2 (H300 o H450), y pretratados previo al daño con YM125 (YM125+H300 o YM125+H450) y YM250 (YM250+H300 o YM250+H450).

3.6.2 Prevención del fenotipo senescente

Como último paso para determinar si el extracto soluble de YM presentaba el mismo efecto *in vitro* que sus polifenoles, evaluamos si la preincubación de cultivos de ARPE-19 con YM125 y YM250 en el esquema de tratamiento y daño explicado en la sección 3.4 prevenía el desarrollo del fenotipo senescente prematuro.

Nuevamente, la exposición al oxidante determinó que alrededor del 80% de las células en cultivo presentaran actividad β -galactosidasa asociada a senescencia. La preincubación con YM redujo el número de células β -GAL+ a valores cercanos al 50% utilizando ambas concentraciones del extracto.

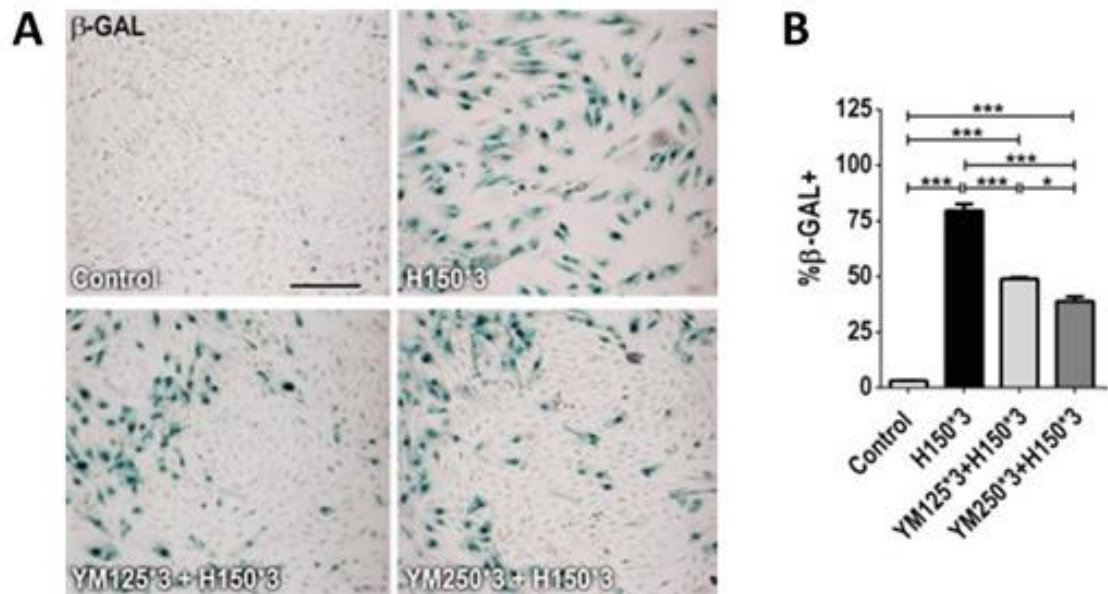


Figura 26: Evaluación de la actividad β -galactosidasa en cultivos control, expuestos a daño oxidativo crónico (H150*3) y tratados con extracto soluble de YM previo a la exposición (YM125*3+H150*3 o YM250*3+H150*3). A, microfotografías de los cultivos donde se puede observar las células β -GAL+ en cada condición. B, cuantificación del número de células β -GAL+ presentes en cada caso.

Estos resultados, junto con la evaluación de la viabilidad celular permitieron concluir que el extracto soluble de YM fue capaz de reducir el daño oxidativo *in vitro*, evitando la muerte celular y el desarrollo del fenotipo senescente.

4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS: EXTRACTOS DE *ILEX*

PARAGUARIENSIS EN LA DEGENERACIÓN DEL EPR *IN VIVO*

En esta parte del trabajo de Tesis examinamos los efectos de YM sobre un modelo experimental *in vivo*, en ratones C57, que simula las alteraciones del EPR y de la retina presentes en la DMAE. Para lograr este objetivo, fue necesario desarrollar algunos métodos que debemos describir aquí.

4.1 *Procedimientos desarrollados para este objetivo*

4.1.1 Extracción del EPR para Western blot y qPCR

Hasta el momento existen muy pocos protocolos de aislamiento de células del EPR que permitan obtener células viables en forma sencilla y reproducible. Además, en la mayoría de esos protocolos las células obtenidas tienden a perder algunas de sus características y no permiten obtener células del EPR cultivables de animales adultos.^{274,275}

Algunos grupos de investigación utilizan medios mecánicos para separar las células del EPR de la coroides.^{276–279} Estos procesos suelen realizarse con ojos de animales de tamaño considerable pero no son simples de utilizar con ojos murinos debido a su tamaño pequeño. Aquí el daño causado por la manipulación genera la muerte de una gran cantidad de células.

Existen protocolos que usan métodos enzimáticos para la separación del EPR. Dos de las enzimas más utilizadas son la dispasa y la hialuronidasa, sin embargo, ninguna de las dos enzimas es eficaz para romper las uniones entre el EPR y la coroides.^{275,277,278,280–284} El uso

de tripsina demostró ser de utilidad en este aspecto permitiendo obtener células, sin dañarlas en el proceso.^{282,284}

Para obtener suspensiones de EPR, se modificaron los protocolos existentes (principalmente el publicado por Fernández-Godino y colaboradores²⁸⁵), generando un nuevo método de extracción que permite obtener células viables de una forma más simple, rápida y eficiente. Nuestro protocolo no sólo sirve para recolectar células de ratones jóvenes, ya que demostramos su utilidad en animales de edades entre 8 semanas hasta 1 año. Además, las células obtenidas pueden cultivarse y mantienen las características típicas del EPR.

Antes de extraer los ojos, los animales son mantenidos en oscuridad durante 24 horas. En esas condiciones la retina neural y el EPR se disocian naturalmente permitiendo su separación sin necesidad de utilizar reacciones enzimáticas ni métodos mecánicos que dañen los procesos apicales celulares y disminuyan la viabilidad del EPR.²⁸⁶

Luego son eutanasiados por dislocación cervical bajo luz roja, los ojos son enucleados y sumergidos en solución salina, permaneciendo en hielo hasta el momento de la disección.

Los ojos son colocados en solución salina y manipulados bajo un microscopio de disección (Figura 27.A), donde se limpian los restos de tejidos muscular y conectivo (Figura 27.B) y se remueve la córnea cortando la esclera en forma circular a la altura de la ora serrata (Figura 27.C-E). Luego se extraen el cristalino y la retina neural dejando intacta la “copa ocular” compuesta por el complejo esclera-coroides-EPR (Figura 27.F,G). Las copas oculares son incubadas en tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) a 37 °C por 45 minutos (en tubos Eppendorf de 1,5 ml, Figura 27.H). Concluido el tratamiento enzimático, las

copas son tomadas desde el nervio óptico y agitadas verticalmente para permitir que las laminillas de EPR desprendidas caigan al fondo del tubo (Figura 27.I). Se centrifugan las células a 1800 r.p.m. por 5 minutos y luego son resuspendidas en medio fresco si van a ser cultivadas o lisadas en trizol para realizar análisis de qPCR o Western blot.

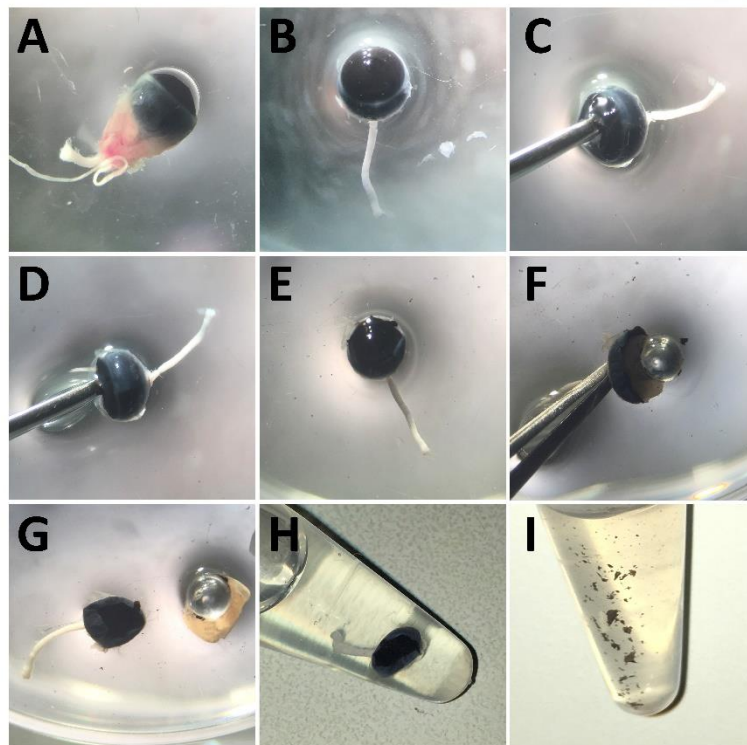


Figura 27: *Procedimiento para la obtención de células de EPR viables*

4.1.2 Puesta a punto del modelo *in vivo* de daño oxidativo del EPR

Como se explicó previamente, la DMAE es una patología multifactorial difícilmente replicable en condiciones experimentales.^{57,58} Una de las estrategias más utilizadas es la generación de daño oxidativo mediante la administración de compuestos oxidantes, siendo el NaIO_3 uno de los mas utilizados, por su capacidad de dañar selectivamente las células del EPR *in vivo*.^{68,69}

Existen diversos reportes que exploran los efectos del NaIO_3 en el EPR utilizando diferentes vías de administración. Entre ellas las más usuales son las inyecciones intravenosas, intraperitoneales y retro orbitales.^{68,69,263,287-292}

Durante el desarrollo de esta tesis se realizó una primera aproximación al modelo de daño *in vivo* utilizando NaIO_3 administrado por vía intravenosa. Se testearon diversos esquemas de daño, en los que se varió el número de dosis y la concentración de oxidante. La inoculación con dosis de 20 y 30 mg/kg de oxidante generó un marcado daño en el EPR de los animales que no pudo ser revertido por el consumo de YM. Partiendo de ese resultado se procedió a realizar el daño utilizando dosis de 5 y 10 mg/kg de oxidante, en administraciones únicas o repetidas durante 2-3 días. Bajo estas condiciones no se produjo daño detectable del EPR. Finalmente se ensayó la vía intraperitoneal con dosis de 20 mg/kg de oxidante, que permitió observar el daño a los 7 días, tanto por evaluación funduscópica, como por observaciones histológicas.

4.2 *Análisis de fondo de ojo*

La exploración del fondo de ojo u oftalmoscopia consiste en la visualización de la retina y del disco óptico a través de la pupila y de los medios transparentes del globo (córnea, humor acuoso, cristalino y humor vítreo). Constituye uno de los procedimientos más sencillos para la evaluación de las enfermedades de la retina. Aunque ha sido superado por las diversas formas de Optical Coherence Tomography (OCT) sigue siendo un valioso auxiliar para el control clínico de las enfermedades de la retina. La evaluación del fondo ocular en el ratón ya fue descrita en el capítulo de Métodos.

Con el fin de evaluar si la YM también presentaba un efecto protector *in vivo* y debido a su consumo, administramos por vía oral el extracto soluble (preparado al 40% como se

explicó anteriormente) a ratones de la cepa C57Bl/6 de forma diaria durante 3 días. El tercer día, 2 horas luego de la administración de YM, los ratones fueron expuestos a daño oxidativo utilizando NaIO_3 (20 mg/kg. IP). La administración de YM por vía oral continuó durante los 7 días subsiguientes.

Transcurridos 7 días luego del daño, se procedió a analizar el fondo de ojo. Los animales que fueron expuestos a daño oxidativo presentaron una pigmentación irregular del fondo, con zonas prácticamente sin pigmentación lo que evidenció una alteración del tejido en esas regiones.

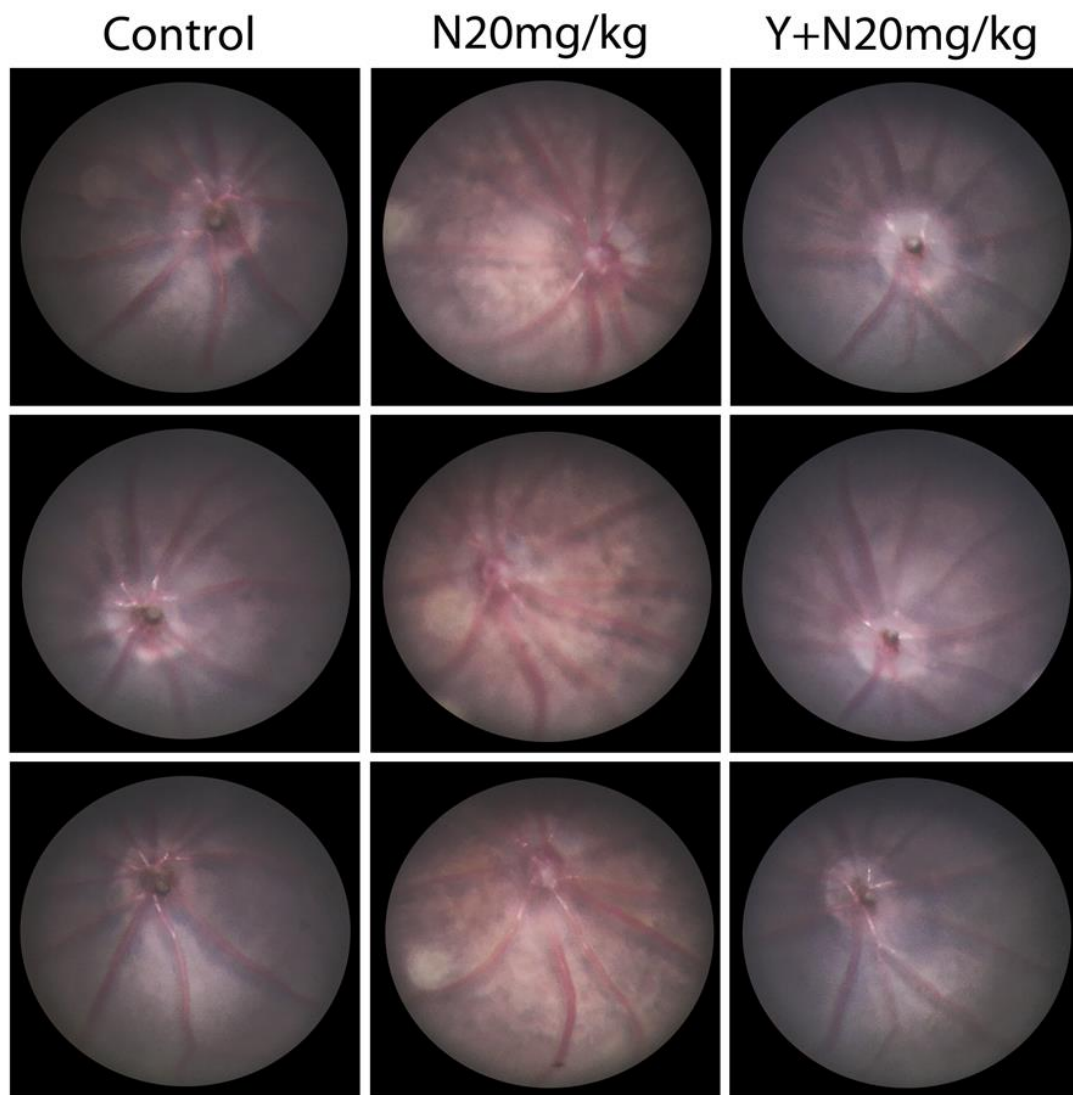


Figura 28: *Evaluación del fondo de ojo en animales control, expuestos a daño (N20 mg/kg) y con tratamiento de YM previo al daño (Y+N20 mg/kg).*

En el caso de los animales que consumieron YM de forma previa al daño, la evaluación del fondo de ojo mostró una imagen de pigmentación homogénea y regular, que no difería de lo observado en animales control que no fueron expuestos a daño oxidativo.

Estos resultados demostraron que, en nuestro modelo, el consumo de YM contrarrestó el efecto tóxico del NaIO_3 en las células del EPR permitiendo mantener las características del fondo de ojo observadas en ratones sanos.

4.3 Análisis de la histoarquitectura de la retina por la técnica de rojo neutro

Partiendo de las observaciones realizadas analizando el fondo de ojo, decidimos evaluar la integridad histológica de la retina en animales expuestos a las mismas condiciones de daño oxidativo con y sin consumo previo de YM.

Como puede verse en la figura 29 el daño del EPR producido por el daño oxidativo también resultó evidente en el análisis histológico. La estructura en monocapa característica de este epitelio desapareció completamente en el área central de la retina de animales expuestos a oxidante, donde además se observaron células de mayor tamaño con acúmulos de pigmento que parecían invadir la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores. La capa nuclear externa disminuyó su grosor si se la compara con retinas de animales control y presentó pliegues hacia las capas adyacentes.

La estructura histológica de las retinas de animales tratados con YM y expuestos a daño oxidativo no presentó diferencias con respecto de las retinas control, mostrando que el tratamiento con YM evitó el daño al EPR y los fotorreceptores.

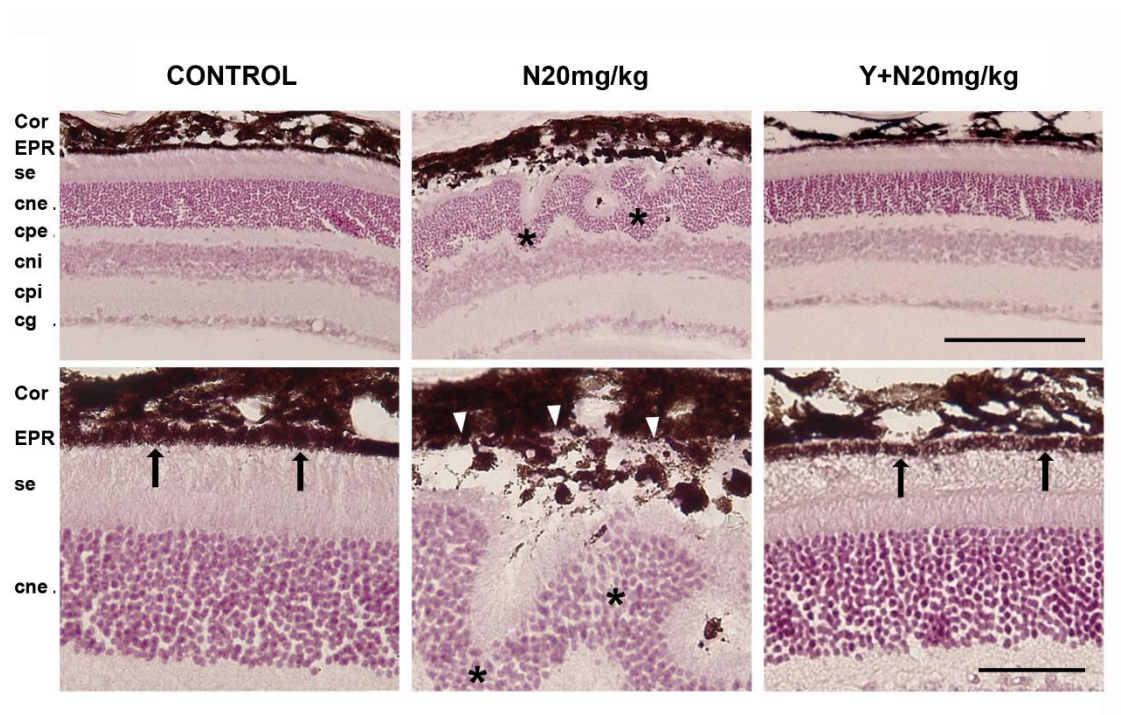


Figura 29: Evaluación histológica de la integridad de la retina en animales control, expuestos a daño oxidativo (N20mg/kg) y con tratamiento de YM previa al daño (Y+N20mg/kg). Barras de calibración: panel superior 200 μ m; panel inferior 50 μ m

Como se observa en la figura 29, el consumo de yerba previno la alteración de la estructura histológica de la retina producida por daño oxidativo. Puede verse que las capas de la retina se mantuvieron organizadas de la misma forma que en animales control. Además, las células del EPR se encontraron en monocapa, sin perder las características morfológicas (tamaño y forma) normales y adheridas a la membrana de Bruch.

4.4 Vías de señalización intracelulares activadas por el consumo de YM

4.4.1 Vías antioxidantes

Como se explicó anteriormente, las principales vías antioxidantes están reguladas por el factor de transcripción NRF2. En la sección 3.5.3, demostramos que CAF y CHL fueron capaces de incrementar la expresión *in vitro* tanto de NRF2 como de SOD2, uno de los principales genes regulados por este factor transcripcional. Debido a esto, luego de haber determinado el efecto protector del consumo de yerba mate *in vivo* por análisis de fondo de ojo e histológicos, nos propusimos evaluar si la protección frente al estrés oxidativo generado por NaIO₃ se debía a la activación de las mismas vías observadas *in vitro*.

En este caso se midieron por qPCR los niveles de expresión genéticos de NRF2, SOD2 y otros dos genes regulados por NRF2, HO-1 y NQO1 en células aisladas del EPR de ratones tratados o no con YM. Los animales recibieron el extracto soluble de YM tres días seguidos. El tercer día fueron inyectados por vía intraperitoneal con NaIO₃ 20 mg/kg dos horas luego de la administración de la YM. Las muestras de EPR fueron tomadas a las 2 y a las 4 horas luego del daño.

El análisis de la expresión de NRF2 demostró que el consumo del extracto soluble de YM incrementó los niveles de ARN mensajero de este factor de transcripción en las células del EPR con respecto a animales que no recibieron YM. Este aumento alcanzó valores similares a los observados como respuesta a daño oxidativo en animales inyectados con NaIO₃.

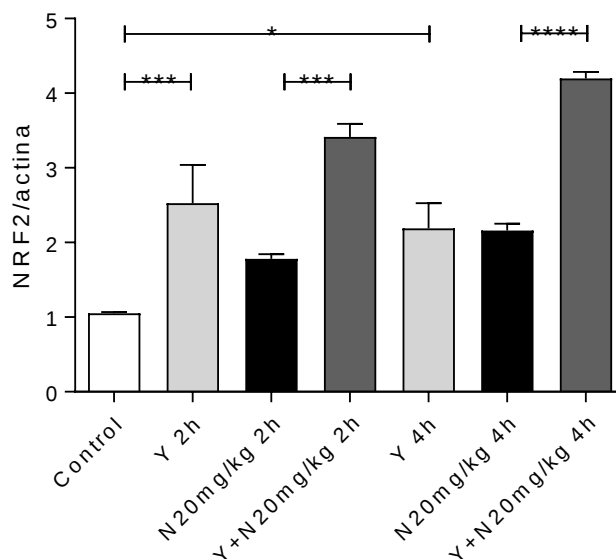


Figura 30: Evaluación de los niveles de expresión del gen de NRF2 en animales control, con administración de YM (YM2h y YM4h), y expuestos a daño oxidativo con y sin administración de YM (YM+ NaIO₃ y NaIO₃, respectivamente). Se grafica la tasa de cambio respecto del gen control (actina) a las 2 y 4 horas luego del daño.

En el caso de los animales que consumieron YM y luego fueron expuestos a daño oxidativo pudo verse que los niveles de NRF2 fueron significativamente superiores a los alcanzados como respuesta al daño, indicando que las células del EPR respondieron de forma más eficiente al NaIO₃ cuando se le administró YM a los animales.

En línea con esta observación, la expresión de SOD2 y HO-1 siguió el mismo patrón observado en NRF2.

Los animales que consumieron YM expresaron mayores niveles de estos genes comparados con los observados en animales control y similares a los alcanzados como respuesta al daño oxidativo en las células del EPR.

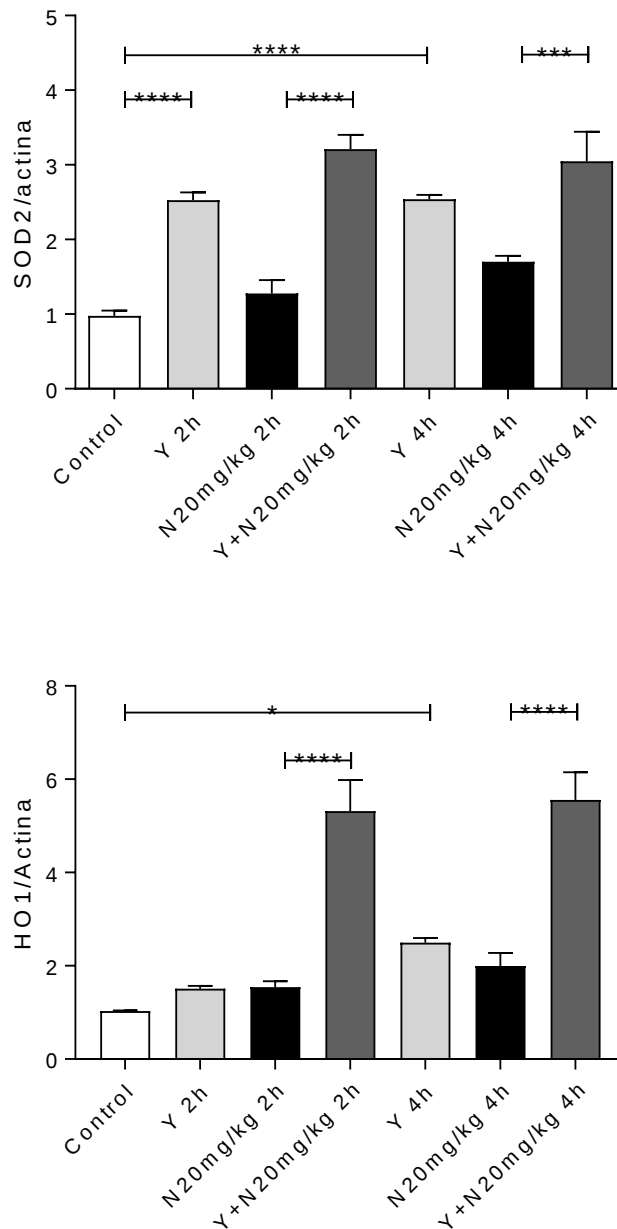


Figura 31: Niveles de ARN mensajero de SOD2 y HO-1 evaluados por qPCR en ratones control, con administración de YM (YM2h y YM4h), y expuestos a daño oxidativo con y sin administración de YM (YM+ NaIO₃ y NaIO₃, respectivamente). Se grafica la tasa de cambio respecto del gen control (actina) a las 2 y 4 horas luego del daño.

Nuevamente, a cada tiempo, los niveles de expresión genética de estas enzimas antioxidantes en animales que consumieron YM y fueron expuestos a daño oxidativo fueron significativamente superiores a los observados en animales que sólo recibieron la inyección de NaIO_3 . Este resultado demostró que las defensas antioxidantes del EPR respondieron con más potencia frente al daño oxidativo cuando los animales consumieron YM.

Contrariamente a estos resultados, la expresión de NQO1 no se vio modulada ni por el consumo de YM ni como respuesta al daño oxidativo.

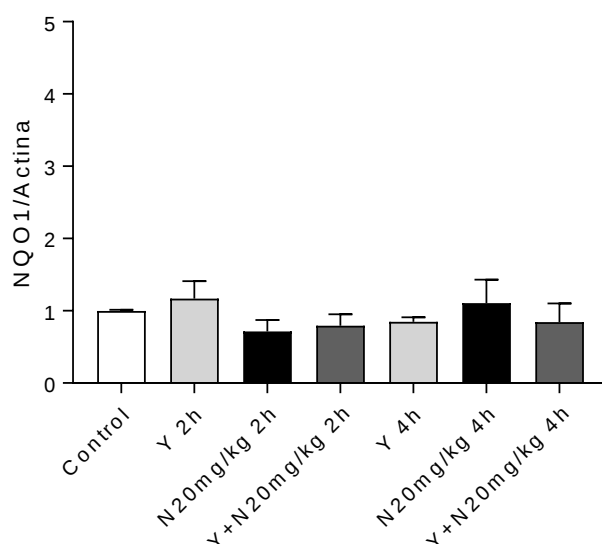


Figura 32: Niveles de ARN mensajero del gen de la enzima antioxidante NQO1 evaluados por qPCR en ratones control, con administración de YM (YM2h y YM4h), y expuestos a daño oxidativo con y sin administración de YM (YM+ NaIO_3 y NaIO_3 , respectivamente). Se grafica la tasa de cambio respecto del gen control (actina) a las 2 y 4 horas luego del daño.

Este resultado parece indicar que la respuesta al daño generado por NaIO_3 en células del EPR ocurrió por la activación de NRF2 y el efecto antioxidante y detoxificante de SOD2 y HO-1 pero no por la acción de la enzima NQO1, aunque posiblemente también intervinieron otros genes que aquí no fueron explorados. Además, los experimentos *in vitro* demostraron que el efecto protector de los polifenoles de la YM se asociaba con un aumento en la activación de CREB (sección 3.5.1). Cabe destacar que tanto SOD2 como HO-1 también están regulados por p-CREB mientras que el gen de la enzima NQO1 no lo está.

4.4.2 Vías involucradas en la función visual

Como se explicó previamente en la sección 1.1.5, la proteína RPE65 cumple un rol vital en el funcionamiento del EPR, participando en el ciclo visual y previniendo la acumulación de componentes oxidantes en el tejido.

Con el fin de evaluar un posible efecto de la YM sobre la funcionalidad del EPR, se evaluó la expresión genética de RPE65 en el EPR de animales que consumieron YM y fueron o no expuestos a daño oxidativo.

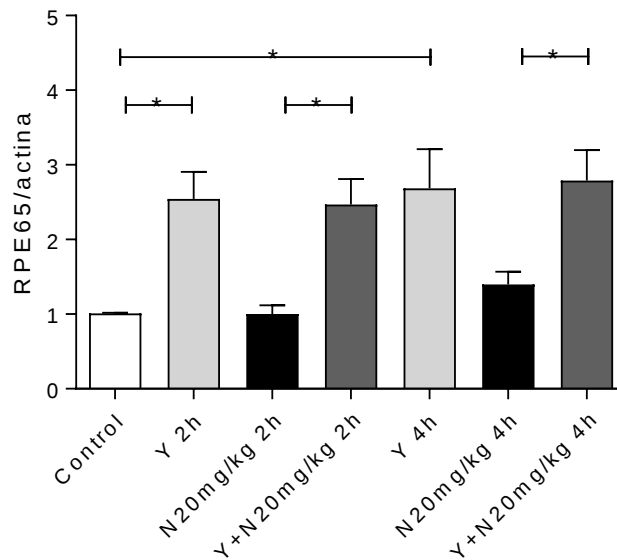
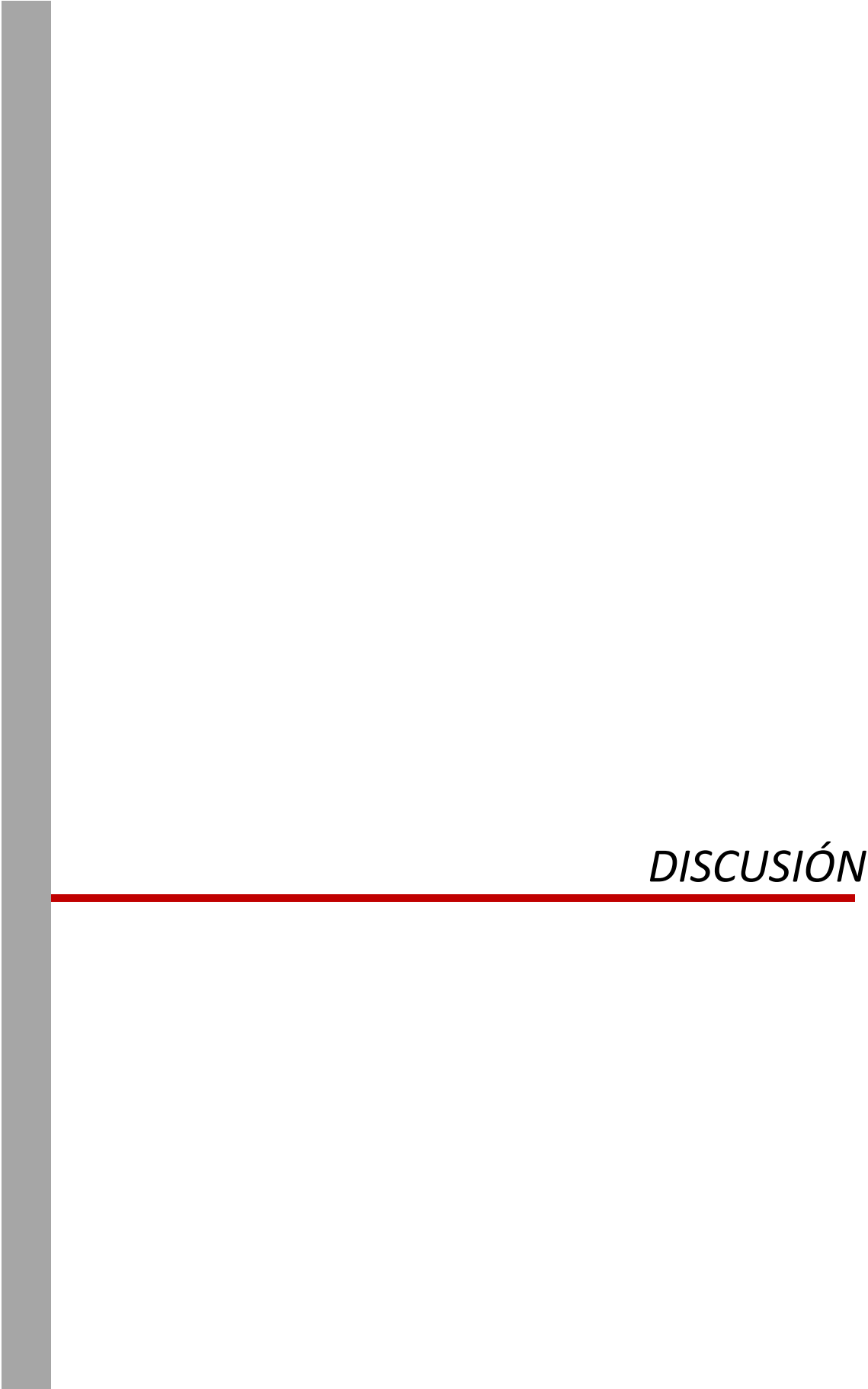


Figura 33: Niveles de ARN mensajero del gen de la proteína RPE65 evaluados por qPCR en ratones control, con administración de YM (YM2h y YM4h), y expuestos a daño oxidativo con y sin administración de YM (YM+ NaIO₃ y NaIO₃, respectivamente). Se grafica la tasa de cambio respecto del gen control (actina) a las 2 y 4 horas luego del daño.

En la figura 33 puede verse que el consumo de YM incrementó los niveles de expresión del gen de RPE65 en el EPR. Un resultado interesante fue que, mientras que el daño oxidativo no pareció afectar la expresión de RPE65, los animales que consumieron YM y fueron inyectados con NaIO₃ si presentaron un aumento. Este aumento fue similar al inducido por el consumo de YM, demostrando que la modulación de la expresión genética se dio únicamente como consecuencia del tratamiento y no como respuesta al daño.



DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Efecto de la YM y sus polifenoles *in vitro*

En este trabajo demostramos que la YM y sus principales polifenoles, CAF y CHL promueven la supervivencia y previenen la senescencia prematura en células ARPE-19 sometidas a estrés oxidativo en un modelo *in vitro* de DMAE.

5.1.1 Mecanismos de protección activados por los polifenoles *in vitro*

La detección fluorescente de especies reactivas de oxígeno demostró que tanto CAF como CHL disminuyeron la acumulación intracelular de EROs, lo que podría explicar la prevención del daño del ADN (evidenciada por una disminución en la expresión de pH2AX), de la muerte celular y de la inducción del fenotipo senescente. La capacidad de ambos polifenoles para capturar radicales libres es mucho más alta que la de Trolox o N-acetilcisteína, lo que sugiere que CAF y CHL podrían proporcionar a los tejidos un control rápido y eficiente de los entornos oxidativos.²⁹³ Sin embargo, los mecanismos indirectos, como la regulación positiva de CREB y NRF2, son posiblemente los más importantes, ya que persisten aun después de ser eliminados los polifenoles.²⁹⁴ Ambas vías de señalización fueron activadas por CHL y CAF. Como se explicó en detalle en la sección 1.3.4.2, la señalización de CREB es uno de los mecanismos celulares pro-supervivencia más importantes.^{295,296} CREB aumenta la respuesta antioxidante y está demostrado que la artemisinina, una lactona sesquiterpénica que promueve la supervivencia de las células del EPR, también activa la fosforilación de CREB.^{161,296} La señalización por p-CREB está involucrada en la expresión nuclear de la histona de

reparación del ADN p-H2AX y la regulación positiva de BCL2, como se ha demostrado en diferentes modelos de daño.^{297–299}

En condiciones de equilibrio redox, NRF2 se une a la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1 del inglés Kelch-like ECH-associated protein 1) y se degrada rápidamente. Los polifenoles modifican Keap1, induciendo la liberación de NRF2 y su translocación al núcleo.²⁹⁴ NRF2 parece estar directamente involucrado en la patogénesis de la AMD, ya que animales que carecen del gen de NRF2 desarrollan una degeneración retiniana progresiva que incluye depósitos similares a los drusen característicos de la DMAE humana.³⁰⁰ Los mecanismos celulares dependientes de NRF2 reducen los niveles intracelulares de EROs a través de la regulación de antioxidantes endógenos, enzimas de detoxificación de fase II y otras enzimas celulares, como las SOD, la catalasa y las involucradas en el metabolismo del glutatión.²⁰

La mayor expresión de SIRT1 inducida por los polifenoles también intervendría en su efecto protector, ya que los niveles de ARNm de SIRT1 se reducen en la retina envejecida y son desregulados por el estrés oxidativo.^{301,302} También es necesaria para los efectos antiapoptóticos de CHL y se ha demostrado que la administración crónica de resveratrol aumenta su expresión.^{301,303} La regulación positiva de SIRT1 y NRF2 también podría estar mediada por CREB y ambas vías promoverían el aumento en la expresión de otros genes antioxidantes como SOD2.^{304–306} En nuestro modelo tanto CAF como CHL también aumentaron la transcripción de SOD2, una de las principales defensas contra el anión superóxido.³⁰⁷

5.1.2 Dosis utilizadas *in vitro*

A las concentraciones elegidas para los experimentos *in vitro*, el extracto soluble de YM y sus polifenoles proporcionaron niveles semejantes de protección. Un estudio sobre la composición de la YM mostró la presencia de 178,32 mg/g de polifenoles totales, $91,40 \pm 1,75$ mg / g de CHL y $1,54 \pm 0,11$ mg / g de CAF.²⁰⁴ Un informe más reciente arrojó resultados comparables: $123,52 \pm 7,87$ mg/g de CHL, $27,75 \pm 1,61$ mg/g de ácido dicafeoilquínico y $2,41 \pm 0,22$ mg/g de CAF.³⁰⁸ Dado que el efecto sobre la supervivencia y prevención de senescencia después de YM250 alcanzó niveles similares a los observados en cultivos tratados con CAF 70 μ M o CHL 100 μ M, la protección que brinda la YM *in vitro* puede atribuirse a los diversos polifenoles presentes en el extracto. Las concentraciones de polifenoles utilizadas en nuestro modelo *in vitro* serían compatibles con el consumo humano típico, ya que el volumen de ingestión diaria promedio de YM (4 tazas o 1 l) contendría 3,2 g de la preparación seca, que proporcionarían aproximadamente 300 mg de CHL y 5 mg de CAF. Este último se absorbe principalmente en el estómago.²¹⁴ La absorción y metabolización del CHL comienzan en el estómago pero continúan en el intestino, donde este polifenol es metabolizado por la microbiota del colon, principalmente a ácidos ferúlico o cafeico libres.²¹⁵ Sin embargo, se pueden obtener cantidades mayores de polifenoles a partir del consumo de YM por la preparación tradicional mediante extracción en caliente de las hojas de YM.^{193,217–219}

5.2 Efecto del consumo de YM en el daño oxidativo del EPR

Con el fin de determinar si el papel protector de la yerba mate observado *in vitro* también podía observarse en modelos *in vivo* de degeneración del EPR inducida por

estrés oxidativo, y sobre todo si el consumo de YM era capaz de generar dicho efecto en el tejido ocular, investigamos el efecto nocivo del agente oxidante NaIO_3 en animales que consumieron YM de forma oral y lo comparamos con animales sin administración de la infusión. Se ha explicado previamente que el NaIO_3 induce la degeneración selectiva del EPR y la consiguiente degeneración de la retina (Sección 1.4.2). Además, los agentes oxidantes selectivos del EPR se han utilizado en múltiples trabajos como modelo de envejecimiento acelerado de la retina, tanto *in vivo* como *in vitro*.^{53,68,69,73–75} En conjunto nuestras observaciones ponen de manifiesto que el consumo de la infusión de YM, a la concentración estudiada, es suficiente para prevenir el daño oxidativo del EPR provocado por NaIO_3 y las consiguientes alteraciones de la estructura retiniana.

5.2.1 Activación de las defensas antioxidantes en el EPR *in vivo*

Uno de los principales mecanismos de daño del NaIO_3 se basa en la generación de EROs intracelulares en el EPR. Esto coincide con lo que ocurre durante el envejecimiento normal, donde la acumulación intracelular de estos radicales genera daño oxidativo en diversas molécula, especialmente del ADN, llevando a la muerte y/o al desarrollo del fenotipo celular senescente. Las células poseen defensas naturales contra este estrés oxidativo pero, como se explicó anteriormente en la sección 1.2.2, cuando estas defensas fallan o son insuficientes es cuando comienza el daño tisular. Entre los principales factores de transcripción que activan enzimas antioxidantes se encuentra NRF2. En nuestros ensayos, el extracto de YM y sus polifenoles aislados fueron capaces de incrementar la expresión de NRF2 tanto *in vitro* como *in vivo*. El mismo aumento fue observado al analizar la expresión de SOD2 y HO-1, dos de las enzimas antioxidantes activadas por NRF2, confirmando el efecto potenciador del consumo de YM en la

activación de esta vía antioxidante. El incremento de estas enzimas detoxificantes puede explicar la ausencia de daño en el EPR en los ratones tratados que recibieron iodato de sodio.

Curiosamente, no observamos modificaciones en los niveles de NQO1, una molécula habitualmente utilizada como marcador de los efectos anti-estrés oxidativo del NRF2. Sin embargo, los datos de la bibliografía indican que las modificaciones de NQO1 en la retina solo han sido observados en períodos tardíos, 7 días *in vivo* y de 6 a 8 horas en experimentos *in vitro*.^{309,310} Por lo tanto, los cambios en la expresión de NQO1 podrían no ser detectables a sólo 4 h de la lesión oxidativa *in vivo*.

Las proteínas estudiadas son una pequeña muestra del total de proteínas capaces de interactuar con los polifenoles. Estos pueden relacionarse con más de 5000 proteínas, incluyendo los receptores acoplados a proteínas G similares a la rodopsina.³¹¹ Los flavonoides como la quercetina, que también se encuentran en los extractos de YM, modulan la conformación de la opsina libre de ligando, controlando su asociación con el cromóforo. Además, los flavonoides mejoran la biosíntesis de la rodopsina y aumentan la presencia en la membrana de la opsina de tipo salvaje y su mutante P23H.³¹²

5.2.2 Efecto del consumo de YM en los niveles de RPE65

La proteína RPE65 es un marcador de EPR maduro y cumple un rol vital en el funcionamiento del EPR por su participación en el ciclo visual de la vitamina A. Por otro lado, diversos estudios demostraron que los niveles de RPE65 se encuentran disminuídos en algunos modelos de DMAE.^{287,290}

En nuestros experimentos *in vivo* se observó un incremento de RPE65 en animales que consumieron yerba mate, independientemente de que recibieran daño oxidativo. Los niveles alcanzados por los animales tratados no fueron significativamente distintos a los alcanzados en animales tratados y expuestos a daño, confirmando que el efecto sobre la expresión de RPE65 es independiente del daño oxidativo y solo se debe al consumo de la infusión. Estos resultados indican que los efectos protectores del consumo de YM no se deben exclusivamente al incremento de las enzimas antioxidantes, ya que también incluirían una mayor expresión de otras moléculas esenciales para la supervivencia del EPR.

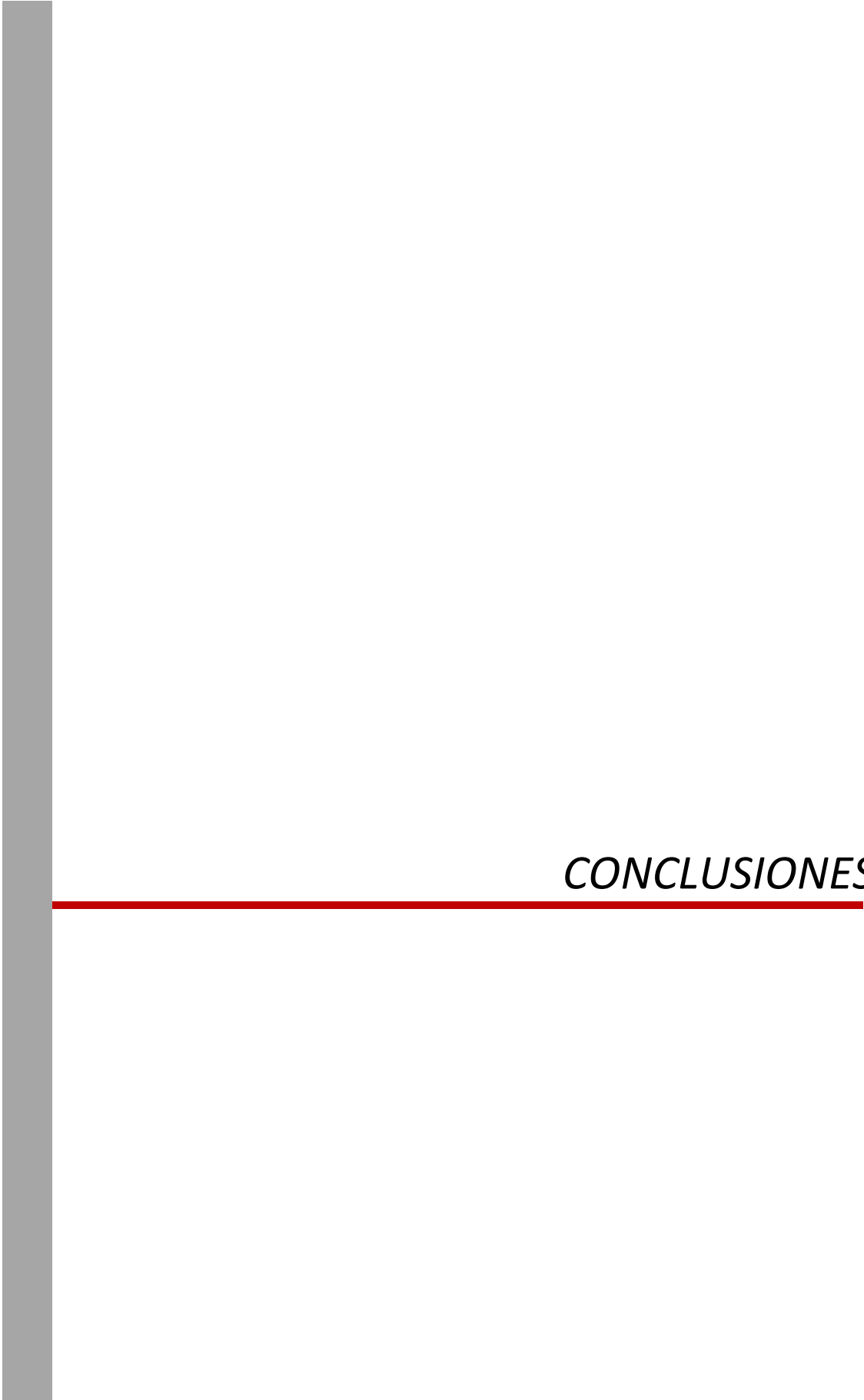
5.3 Posibles beneficios terapéuticos del consumo de YM

La incidencia de las enfermedades degenerativas de la retina incrementa año a año, esperándose que afecten a más de 300 millones de personas para el año 2040.

Nuestros resultados sugieren que la YM, debido a su alto contenido de polifenoles, es capaz de proteger al EPR de enfermedades degenerativas de la retina. La disminución de los niveles de EROs intracelulares, la activación de los procesos antioxidantes y la promoción de la supervivencia, junto con un bloqueo de la senescencia celular prematura, sugieren que la YM podría tener un papel fundamental en la prevención del desarrollo y progresión de la DMAE. Además de los mecanismos patogénicos explorados aquí, se ha demostrado que la expresión de VEGF inducida por TGF β 2 es completamente anulada por la acción del ácido cafeico fenetil éster, lo que también podría contribuir a la prevención de la DMAE neovascular.³¹³ Se han descrito varios efectos beneficiosos de la YM en diversas condiciones de salud (revisados en la introducción) y el uso tradicional

sugiere que esta bebida se puede consumir en grandes cantidades, lo que facilitaría que los niveles de polifenoles en plasma alcancen los valores efectivos para retrasar los daños asociados al envejecimiento.²¹⁹

Un estudio reciente realizado en pacientes sanos a los que se les suministró una cápsula que contenía un extracto soluble de YM similar al utilizado en este trabajo de tesis,³⁰⁸ mostró que los valores de capacidad antioxidante sérica aumentaron significativamente después de 7 y 30 días de ingesta de cápsulas de YM. La actividad de SOD2 se mantuvo significativamente más alta que en los controles durante todo el estudio, inclusive al cabo de 60 días. Este es el primer estudio con individuos sanos que demostró los efectos antioxidantes de cápsulas de extracto seco de YM, poniendo en evidencia el aumento de biomarcadores antioxidantes con una disminución concomitante de biomarcadores de peroxidación lipídica, como consecuencia del consumo del extracto. Estas cápsulas podrían funcionar como una alternativa atractiva para consumir YM en cantidades suficientes para reducir eficientemente el estrés oxidativo.



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Debido a la elevada concentración de polifenoles en la YM y de su amplia distribución y consumo en varios países de América Latina entre los que se encuentra la Argentina, en esta tesis se analizó el efecto de sus polifenoles en modelos *in vitro* de supervivencia y senescencia celular y en un modelo *in vivo* de DMAE basado en el estrés oxidativo del EPR.

Partiendo de la hipótesis de que el consumo de YM sería capaz de activar vías de protección en el EPR frente al estrés oxidativo, evitando en consecuencia el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas de la retina como la DMAE, se pudo llegar a las siguientes conclusiones

6.1 CAF y CHL protegen del daño oxidativo *in vitro*

Nuestros experimentos demostraron que ambos polifenoles son capaces de prevenir el daño al ADN en células expuestas a H₂O₂ y el consecuente desarrollo del fenotipo senescente.

Este efecto pudo ser asociado con una reducción de la generación intracelular de EROs y con la activación de vías de supervivencia y antioxidantes.

Las vías activadas por los polifenoles de la YM son las de p-CREB y NRF2, dos factores de transcripción de vital importancia en el desarrollo y supervivencia celular y en la defensa frente a diversos tipos de estrés, entre los que se encuentra principalmente el estrés oxidativo.

Además, reportamos una modulación de sirtuina 1, una enzima importante en el metabolismo celular que se encuentra involucrada en el control de diversos genes y en la prevención de la senescencia celular.

6.2 In vitro el extracto soluble de YM posee el mismo efecto que los polifenoles puros

Los resultados reportados en esta tesis muestran que el tratamiento con el extracto soluble en células ARPE-19 expuestas a daño oxidativo aumentó la viabilidad celular y redujo el desarrollo del fenotipo senescente de forma comparable a la producida por CAF y CHL.

Debido a esto no solo se puede concluir que el extracto soluble de YM es capaz de brindar protección frente al daño oxidativo, sino además que este efecto puede ser explicado por sus polifenoles.

6.3 El consumo de YM previene la degeneración del EPR in vivo

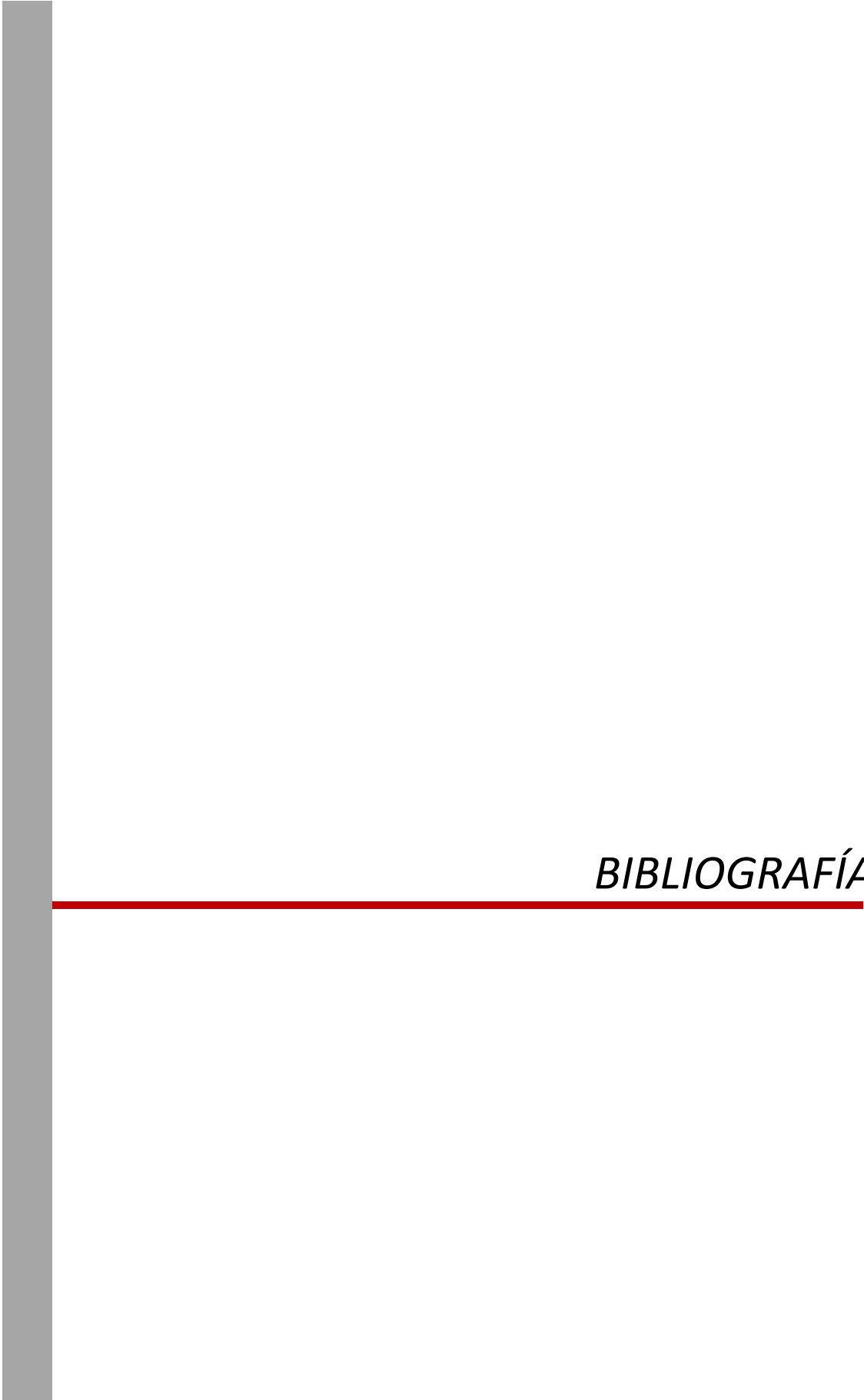
Las imágenes de fondo de ojo mostraron que el consumo de YM impidió el daño del EPR luego de la exposición al NaIO_3 que, como se explicó previamente, es un oxidante que afecta de forma selectiva a esta capa de la retina.

Estos resultados fueron corroborados utilizando técnicas histológicas que demostraron la ausencia de alteraciones estructurales de las células del EPR y los fotorreceptores. De esta manera se puso en evidencia que el consumo de YM permite conservar la estructura normal de la retina y la morfología de sus células a pesar de la exposición a un fuerte agente oxidante. Cabe destacar que la ausencia de desprendimiento entre el EPR y los fotorreceptores sugiere fuertemente la ausencia de lesiones funcionales.

6.4 La YM activa genes importantes para el EPR y de defensa antioxidante *in vivo*

Al igual que los polifenoles aislados utilizados en los experimentos *in vitro*, el consumo de YM incrementó la expresión de vías antioxidantes en el EPR *in vivo*. La activación de NRF2 y por consiguiente de las enzimas de detoxificación moduladas por este factor de transcripción, podrían ser las responsables de la protección del tejido frente al daño generado por NaIO₃. Nuestros resultados demostraron que los niveles de NRF2, HO-1 y SOD2 aumentan en los animales que consumen YM y que este incremento es aún mayor cuando hay exposición a estrés oxidativo. Vale decir que la YM aumenta la eficiencia de las defensas antioxidantes, permitiendo al EPR controlar el efecto nocivo del NaIO₃.

Además, demostramos que el consumo de YM también incrementa los niveles de RPE65, un gen de vital importancia en la funcionalidad de las células del EPR, cuya expresión se encuentra disminuida en la DMAE.



BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Moore KL, Dailey AF, Agur AMR. *MOORE Anatomia Con Orientacion Clinica*. Vol 53.; 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Ross, Michael H.Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*.; 2011.
3. Órganos animales. Órganos de los sentidos. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Accessed February 20, 2020. https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_03sentidos.php
4. Guyton A. C. *Tratado de Fisiología Médica*.; 2011. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
5. Bok D. The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. In: *Journal of Cell Science*. ; 1993. doi:10.1242/jcs.1993.supplement_17.27
6. McBee JK, Palczewski K, Baehr W, Pepperberg DR. Confronting complexity: The interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res*. Published online 2001. doi:10.1016/S1350-9462(01)00002-7
7. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. Published online 2005. doi:10.1152/physrev.00021.2004
8. Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic*. Published online 2001. doi:10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x
9. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology*. 2010;25(1):8-15. doi:10.1152/physiol.00038.2009
10. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res*. Published online 2010. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.004
11. Agbaga MP, Brush RS, Mandal MNA, Henry K, Elliott MH, Anderson RE. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 2008. doi:10.1073/pnas.0802607105
12. Letelier J, Bovolenta P, Martínez-Morales JR. The pigmented epithelium, a bright partner against photoreceptor degeneration. *J Neurogenet*. Published online 2017. doi:10.1080/01677063.2017.1395876
13. Thumann G, Dou G, Wang Y, Hinton DR. Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Retina Fifth Edition*. ; 2012. doi:10.1016/B978-1-4557-0737-9.00016-3
14. Kiser PD, Golczak M, Palczewski K. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chem Rev*. Published online 2014. doi:10.1021/cr400107q
15. Daruwalla A, Choi EH, Palczewski K, Kiser PD. Structural biology of 11-cis-retinaldehyde production in the classical visual cycle. *Biochemical Journal*. Published online 2018. doi:10.1042/BCJ20180193

16. Wang JS, Kefalov VJ. The Cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res*. Published online 2011. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.11.001
17. Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. Published online 2014. doi:10.1016/S2214-109X(13)70145-1
18. Grassmann F, Kiel C, Zimmermann ME, et al. Genetic pleiotropy between age-related macular degeneration and 16 complex diseases and traits. *Genome Med*. Published online 2017. doi:10.1186/s13073-017-0418-0
19. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*. Published online 2018. doi:10.1083/jcb.201708092
20. Bellezza I. Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Nrf2 as Therapeutic Target. *Front Pharmacol*. 2018;9:1280. doi:10.3389/fphar.2018.01280
21. Querques G, Massamba N, Coscas F, Forte R, Souied EH. Choroidal neovascularisation complicating geographic atrophy in age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*. Published online 2012. doi:10.1136/bjophthalmol-2012-302191
22. Chee R ik, Mahrous A, Koenig L, et al. Histopathology of Age-Related Macular Degeneration and Implications for Pathogenesis and Therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1256:67-88. doi:10.1007/978-3-030-66014-7_3/COVER
23. Forest DL, Johnson L V., Clegg DO. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration. *DMM Disease Models and Mechanisms*. Published online 2015. doi:10.1242/dmm.017236
24. Handa JT, Bowes Rickman C, Dick AD, et al. A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11262-1
25. Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(4):844-851. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036
26. Biesemeier A, Taubitz T, Julien S, Yoeruek E, Schraermeyer U. Choriocapillaris breakdown precedes retinal degeneration in age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging*. Published online 2014. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.003
27. Jha BS, Bharti K. Regenerating Retinal Pigment Epithelial Cells to Cure Blindness: A Road Towards Personalized Artificial Tissue. *Curr Stem Cell Rep*. Published online 2015. doi:10.1007/s40778-015-0014-4
28. Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC, Berta A, Kaarniranta K. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. Published online 2012. doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02179.x
29. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology*. Published online 2012. doi:10.1016/j.cub.2012.07.024

30. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today*. Published online 2017. doi:10.1016/j.drudis.2017.01.004
31. Narita M, Núñez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. Published online 2003. doi:10.1016/S0092-8674(03)00401-X
32. Campisi J, D'Adda Di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Published online 2007. doi:10.1038/nrm2233
33. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. Published online 2011. doi:10.1016/j.semcancer.2011.09.001
34. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. Published online 2010. doi:10.1101/gad.1971610
35. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*. Published online 2006. doi:10.1038/ncb1471
36. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 1995. doi:10.1073/pnas.92.20.9363
37. D'Adda Di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. Published online 2003. doi:10.1038/nature02118
38. Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, et al. DNA-SCARS: Distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci*. Published online 2011. doi:10.1242/jcs.071340
39. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: Putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. Published online 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4006
40. Bandyopadhyay D, Timchenko N, Suwa T, Hornsby PJ, Campisi J, Medrano EE. The human melanocyte: A model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Exp Gerontol*. Published online 2001. doi:10.1016/S0531-5565(01)00098-5
41. Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR. Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 1991. doi:10.1073/pnas.88.24.11012
42. Overview of Cellular Senescence and Aging | Cell Signaling Technology. Accessed November 29, 2020. https://www.cellsignal.com/contents/_/cellular-senescence/overview-of-cellular-senescence
43. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.exger.2016.05.010

44. Coppe JP, Boisen M, Chung HS, et al. A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced epithelial cell growth and invasion. *Molecular Cancer Research*. Published online 2008. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0062
45. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Published online 2010. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
46. Blagosklonny M V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep*. Published online 2003. doi:10.1038/sj.embor.embor806
47. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. Published online 2013. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653
48. Martin DF, Klein M, Haller J, et al. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina*. Published online 2002. doi:10.1097/00006982-200204000-00002
49. Meyer CH, Holz FG. Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: Ranibizumab and bevacizumab. *Eye*. Published online 2011. doi:10.1038/eye.2011.66
50. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. Published online 1996. doi:10.1006/exer.1996.0020
51. Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2006. doi:10.1167/iovs.06-0166
52. Marazita MC, Dugour A, Marquioni-Ramella MD, Figueroa JM, Suburo AM. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.redox.2015.11.011
53. Qin S, Lu Y, Rodrigues GA. Resveratrol protects RPE cells from sodium iodate by modulating PPAR α and PPAR δ . *Exp Eye Res*. Published online 2014. doi:10.1016/j.exer.2013.11.010
54. Glotin AL, Debaq-Chainiaux F, Brossas JY, et al. Prematurely senescent ARPE-19 cells display features of age-related macular degeneration. *Free Radic Biol Med*. Published online 2008. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.023
55. Cao L, Wang H, Wang F, Xu D, Liu F, Liu C. A β -induced senescent retinal pigment epithelial cells create a proinflammatory microenvironment in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2013. doi:10.1167/iovs.13-11612
56. Usui H, Nishiwaki A, Landiev L, et al. In vitro drusen model – Three-dimensional spheroid culture of retinal pigment epithelial cells. *J Cell Sci*. Published online 2019. doi:10.1242/jcs.215798

57. Malek G, Lad EM. Emerging roles for nuclear receptors in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Published online 2014. doi:10.1007/s00018-014-1709-x
58. Malek G, Busik J, Grant MB, Choudhary M. Models of retinal diseases and their applicability in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. Published online 2018. doi:10.1080/17460441.2018.1430136
59. Feng L, Wang F. Detecting A-beta deposition and RPE cell senescence in the retinas of SAMP8 mice. *Discov Med*. Published online 2016.
60. Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2007. doi:10.1167/iovs.07-0432
61. Liu C, Cao L, Yang S, et al. Subretinal injection of amyloid- β peptide accelerates RPE cell senescence and retinal degeneration. *Int J Mol Med*. Published online 2015. doi:10.3892/ijmm.2014.1993
62. Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Alexandridou A, Sall J, Dubovy S, Csaky K. The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Exp Eye Res*. Published online 2002. doi:10.1006/exer.2002.2047
63. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, Hernandez EP, Marin-Castano ME, Cousins SW. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2006. doi:10.1167/iovs.05-0719
64. Fujihara M, Nagai N, Sussan TE, Biswal S, Handa JT. Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice. *PLoS One*. Published online 2008. doi:10.1371/journal.pone.0003119
65. Wang AL, Neufeld AH. Smoking mice: A potential model for studying accumulation of drusen-like material on Bruch's membrane. *Vision Res*. Published online 2010. doi:10.1016/j.visres.2009.08.029
66. Kuwabara T, Gorn RA. Retinal Damage by Visible Light: An Electron Microscopic Study. *Archives of Ophthalmology*. Published online 1968. doi:10.1001/archopht.1968.03850040071019
67. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. Published online 2005. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.08.002
68. Enzmann V, Row BW, Yamauchi Y, et al. Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. *Exp Eye Res*. 2006;82(3):441-448. doi:10.1016/j.exer.2005.08.002
69. Dysli C, Dysli M, Zinkernagel MS, Enzmann V. Effect of pharmacologically induced retinal degeneration on retinal autofluorescence lifetimes in mice. *Exp Eye Res*. 2016;153:178-185. doi:10.1016/j.exer.2016.10.018

70. Hanus J, Anderson C, Sarraf D, Ma J, Wang S. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discov.* 2016;2(1). doi:10.1038/CDDISCOVERY.2016.54
71. Wang J, Iacovelli J, Spencer C, Saint-Geniez M. New insights on sodium iodate-induced retinal degeneration. *The FASEB Journal.* 2013;27(S1):873.15-873.15. doi:10.1096/FASEBJ.27.1_SUPPLEMENT.873.15
72. Zhou T, Huang Z, Zhu X, et al. Alpha-1 Antitrypsin Attenuates M1 Microglia-Mediated Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Front Immunol.* 2018;9:1202. doi:10.3389/fimmu.2018.01202
73. Chan CM, Huang DY, Sekar P, Hsu SH, Lin WW. Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death. *J Biomed Sci.* Published online 2019. doi:10.1186/s12929-019-0531-z
74. Zhang XY, Ng TK, Brelén ME, et al. Continuous exposure to non-lethal doses of sodium iodate induces retinal pigment epithelial cell dysfunction. *Sci Rep.* 2016;6(1):1-13. doi:10.1038/srep37279
75. Lin YC, Horng LY, Sung HC, Wu RT. Sodium Iodate Disrupted the Mitochondrial-Lysosomal Axis in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 2018;34(7):500-511. doi:10.1089/jop.2017.0073
76. Ye Q, Georges N, Selomulya C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci Technol.* Published online 2018. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.025
77. Granato D, Nunes DS, Barba FJ. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends Food Sci Technol.* Published online 2017. doi:10.1016/j.tifs.2016.12.010
78. Assmann G, Buono P, Daniele A, et al. Functional foods and cardiometabolic diseases. International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* Published online 2014. doi:10.1016/j.numecd.2014.10.010
79. European Parliament & Council. *Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and the of the Council on Nutrition and Health Claims Made on Foods.;* 2006.
80. Lenssen KGM, Bast A, de Boer A. Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. *J Funct Foods.* Published online 2018. doi:10.1016/j.jff.2018.05.047
81. Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol.* Published online 2020. doi:10.1146/annurev-food-032519-051708

82. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latinoam Nutr*. Published online 2000.
83. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*. Published online 1999. doi:10.1016/S0308-8146(99)00093-X
84. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. Published online 2004. doi:10.1093/ajcn/79.5.727
85. Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: A global perspective. In: *Nutrition*. Vol 15. Elsevier; 1999:523-526. doi:10.1016/S0899-9007(99)00021-0
86. Bhullar KS, Rupasinghe HPV. Polyphenols: Multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/891748
87. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev*. Published online 2012. doi:10.1016/j.arr.2012.01.006
88. Li H, Zhang Y, Cao L, et al. Curcumin could reduce the monomer of TTR with Tyr114Cys mutation via autophagy in cell model of familial amyloid polyneuropathy. *Drug Des Devel Ther*. Published online 2014. doi:10.2147/DDDT.S70866
89. Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Advances in Nutrition*. Published online 2012. doi:10.3945/an.111.001271
90. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. Published online 2013. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.018
91. Fresco P, Borges F, Marques M, Diniz C. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Curr Pharm Des*. Published online 2009. doi:10.2174/138161210789941856
92. Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, et al. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in Bioscience - Scholar*. Published online 2011. doi:10.2741/s229
93. Martin MA, Goya L, Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*. Published online 2013. doi:10.1016/j.fct.2013.02.020
94. Conte E, Fagone E, Fruciano M, Gili E, Iemmolo M, Vancheri C. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of resveratrol in the lung. *Histol Histopathol*. Published online 2015. doi:10.14670/HH-30.523
95. González R, Ballester I, López-Posadas R, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Published online 2011. doi:10.1080/10408390903584094

96. Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Published online 2013. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.06.003
97. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. Published online 2013. doi:10.1097/MOL.0b013e32835c07fd
98. Yao Z, Zhang L, Ji G. Efficacy of polyphenolic ingredients of Chinese herbs in treating dyslipidemia of metabolic syndromes. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. Published online 2014. doi:10.1016/S2095-4964(14)60023-6
99. Islam B, Sharma C, Adem A, Aburawi E, Ojha S. Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. *Drug Des Devel Ther*. Published online 2015. doi:10.2147/DDDT.S86705
100. Chirumbolo S. Dietary Assumption of Plant Polyphenols and Prevention of Allergy. *Curr Pharm Des*. Published online 2014. doi:10.2174/13816128113199990042
101. Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA, Abdalla DSP. Modulation of immune function by polyphenols: Possible contribution of epigenetic factors. *Nutrients*. Published online 2013. doi:10.3390/nu5072314
102. Darvesh AS, Bishayee A. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutr Cancer*. Published online 2013. doi:10.1080/01635581.2013.767367
103. Cimino S, Sortino G, Favilla V, et al. Polyphenols: Key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. *Oxid Med Cell Longev*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/632959
104. Jin H, Leng Q, Li C. Dietary flavonoid for preventing colorectal neoplasms. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Published online 2012. doi:10.1002/14651858.cd009350.pub2
105. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. *Fruit Phenolics*.; 2018. doi:10.1201/9781351072175
106. Häkkinen SH, Törrönen AR. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*. Published online 2000. doi:10.1016/S0963-9969(00)00086-7
107. Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:23-42. doi:10.2147/DDDT.S96936
108. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols - Nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. Published online 2000. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G
109. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. Published online 1997. doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2
110. Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/914273

111. Gutierrez-Merino C, Lopez-Sanchez C, Lagoa R, K. Samhan-Arias A, Bueno C, Garcia-Martinez V. Neuroprotective Actions of Flavonoids. *Curr Med Chem*. Published online 2011. doi:10.2174/092986711795029735
112. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem*. Published online 2012. doi:10.1021/jf204452y
113. Venkatesan R, Ji E, Kim SY. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: A comprehensive review. *Biomed Res Int*. Published online 2015. doi:10.1155/2015/814068
114. Krikorian R, Boespflug EL, Fleck DE, et al. Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem*. Published online 2012. doi:10.1021/jf300277g
115. Veronica Witte A, Kerti L, Margulies DS, Flöel A. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *Journal of Neuroscience*. Published online 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014
116. Kesse-Guyot E, Fezeu L, Andreeva VA, et al. Total and Specific Polyphenol Intakes in Midlife Are Associated with Cognitive Function Measured 13 Years Later. *J Nutr*. Published online 2012. doi:10.3945/jn.111.144428
117. Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol*. Published online 2007. doi:10.1093/aje/kwm036
118. Cimrová B, Budáč S, Melicherová U, Jergelová M, Jagla F. Electrophysiological evidence of the effect of natural polyphenols upon the human higher brain functions. *Neuroendocrinology Letters*. Published online 2011.
119. De la Torre R, De Sola S, Pons M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol Nutr Food Res*. Published online 2014. doi:10.1002/mnfr.201300325
120. Gundimeda U, McNeill TH, Schiffman JE, Hinton DR, Gopalakrishna R. Green tea polyphenols potentiate the action of nerve growth factor to induce neuritogenesis: Possible role of reactive oxygen species. *J Neurosci Res*. Published online 2010. doi:10.1002/jnr.22519
121. Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H. Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*. Published online 1998. doi:10.1093/carcin/19.10.1771
122. Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, et al. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med*. Published online 2002. doi:10.1016/S0891-5849(02)01137-1
123. Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, Rotilio G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. Published online 2008. doi:10.1007/s11064-008-9696-7

124. Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. Published online 2010. doi:10.1074/jbc.M109.060061
125. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*. Published online 2004. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023
126. Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: In vitro studies. *J Neurochem*. Published online 2003. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01652.x
127. Lin CW, Wu MJ, Liu IYC, Su JD, Yen JH. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-Driven HO-1 expression. *J Agric Food Chem*. Published online 2010. doi:10.1021/jf904061x
128. Liao KK, Wu MJ, Chen PY, et al. Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways. *J Agric Food Chem*. Published online 2012. doi:10.1021/jf203290r
129. Reznichenko L, Amit T, Youdim MBH, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Neurochem*. Published online 2005. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03085.x
130. Santos NAG dos, Martins NM, Silva R de B, Ferreira RS, Sisti FM, Santos AC dos. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP+ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. *Neurotoxicology*. Published online 2014. doi:10.1016/j.neuro.2014.09.007
131. Lai HC, Wu MJ, Chen PY, et al. Neurotrophic effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone: Promotion of neurite outgrowth via cAMP/PKA/CREB pathway in PC12 cells. *PLoS One*. Published online 2011. doi:10.1371/journal.pone.0028280
132. Yang SH, Liao CC, Chen Y, Syu JP, Jeng CJ, Wang SM. Daidzein induces neuritogenesis in DRG neuronal cultures. *J Biomed Sci*. Published online 2012. doi:10.1186/1423-0127-19-80
133. Tangsaengvit N, Kitphati W, Tadtong S, Bunyapraphatsara N, Nukoolkarn V. Neurite outgrowth and neuroprotective effects of quercetin from caesalpinia mimosoides lamk. on CULTURED P19-derived neurons. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/838051
134. Yabe T, Hirahara H, Harada N, et al. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Neuroscience*. Published online 2010. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.023
135. Hetman M, Gosdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem*. Published online 2004. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04133.x
136. Hetman M, Xia Z. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. In: *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. ; 2000.

137. Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pagès G, Pouysségur J, Kazama T. Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. Published online 2011. doi:10.1523/JNEUROSCI.2243-10.2011
138. Parmar MS, Jaumotte JD, Wyrostek SL, Zigmond MJ, Cavanaugh JE. The role of ERK1, 2, and 5 in dopamine neuron survival during aging. *Neurobiol Aging*. Published online 2014. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.031
139. Li Z, Theus MH, Wei L. Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*. Published online 2006. doi:10.1111/j.1440-169X.2006.00889.x
140. Li Q, Chen M, Liu H, et al. The dual role of ERK signaling in the apoptosis of neurons. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. Published online 2014. doi:10.2741/4291
141. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes Cancer*. Published online 2013. doi:10.1177/1947601913485414
142. Yang Y, Bian GX, Lu QJ. Neuroprotection and neurotrophism effects of liquiritin on primary cultured hippocampal cells. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. Published online 2008.
143. Wang Z, Zhang X, Wang H, Qi L, Lou Y. Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway. *Neuroscience*. Published online 2007. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.059
144. Moghbelinejad S, Nassiri-Asl M, Naserpour Farivar T, et al. Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats. *Toxicol Lett*. Published online 2014. doi:10.1016/j.toxlet.2013.10.010
145. Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem*. Published online 2004. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02563.x
146. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. Published online 2002. doi:10.1016/S0896-6273(02)00828-0
147. Boss V, Roback JD, Young AN, et al. Nerve growth factor, but not epidermal growth factor, increases Fra-2 expression and alters Fra-2/JunD binding to AP-1 and CREB binding elements in pheochromocytoma (PC12) cells. *Journal of Neuroscience*. Published online 2001. doi:10.1523/jneurosci.21-01-00018.2001
148. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet*. Published online 2002. doi:10.1038/ng882
149. Lin LF, Chiu SP, Wu MJ, Chen PY, Yen JH. Luteolin induces microRNA-132 expression and modulates neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One*. Published online 2012. doi:10.1371/journal.pone.0043304
150. Furukawa Y, Watanabe S, Okuyama S, Nakajima M. Neurotrophic effect of Citrus auraptene: Neuritogenic activity in PC12 cells. *Int J Mol Sci*. Published online 2012. doi:10.3390/ijms13055338

151. Nagase H, Omae N, Omori A, et al. Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem Biophys Res Commun*. Published online 2005. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.001
152. Hwang SL, Lin JA, Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Pro-cellular survival and neuroprotection of citrus flavonoid: The actions of hesperetin in PC12 cells. *Food Funct*. Published online 2012. doi:10.1039/c2fo30100h
153. Zhang F, Wang YY, Liu H, et al. Resveratrol produces neurotrophic effects on cultured dopaminergic neurons through prompting astroglial BDNF and GDNF release. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/937605
154. Liu D, Xie K, Yang X, et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behavioural Brain Research*. Published online 2014. doi:10.1016/j.bbr.2014.01.039
155. Kumar V, Pandey A, Jahan S, et al. Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. Published online 2016. doi:10.1038/srep28142
156. Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, et al. Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience*. Published online 2009. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.008
157. Park SJ, Kim DH, Kim JM, et al. Mismatch between changes in baicalein-induced memory-related biochemical parameters and behavioral consequences in mouse. *Brain Res*. Published online 2010. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.098
158. Lee B, Sur B, Shim I, Lee H, Hahm DH. Baicalin improves chronic corticosterone-induced learning and memory deficits via the enhancement of impaired hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression in the rat. *J Nat Med*. Published online 2014. doi:10.1007/s11418-013-0782-z
159. Zhao L, Wang JL, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules*. Published online 2013. doi:10.3390/molecules18089949
160. Liu R, Li J ze, Song J ke, et al. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol Aging*. Published online 2014. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.031
161. Chong CM, Zheng W. Artemisinin protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage through activation of ERK/CREB signaling. *Redox Biol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.redox.2016.06.002
162. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Published online 2007. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046

163. Su WC, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Published online 2008. doi:10.1172/JCI32730
164. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. In: *Drug Metabolism Reviews*. ; 2006. doi:10.1080/03602530600971974
165. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol*. Published online 2013. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.09.003
166. Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SPM, et al. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Published online 2002. doi:10.1165/ajrcmb.26.2.4501
167. Zhao J, Cheng YY, Fan W, et al. Botanical Drug Puerarin Coordinates with Nerve Growth Factor in the Regulation of Neuronal Survival and Neuriteogenesis via Activating ERK1/2 and PI3K/Akt Signaling Pathways in the Neurite Extension Process. *CNS Neurosci Ther*. Published online 2015. doi:10.1111/cns.12334
168. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Mishima S, Katsuki H. Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Br J Pharmacol*. Published online 2012. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01833.x
169. Romeo L, Intrieri M, D'Agata V, et al. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces heme oxygenase in rat neurons and acts as an effective neuroprotective agent against oxidative stress. *J Am Coll Nutr*. Published online 2009. doi:10.1080/07315724.2009.10718116
170. Fang Y, Su T, Qiu X, et al. Protective effect of alpha-mangostin against oxidative stress induced-retinal cell death. *Sci Rep*. Published online 2016. doi:10.1038/srep21018
171. Li Z, Dong X, Liu H, et al. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol Vis*. Published online 2013.
172. Rezaie T, McKercher SR, Kosaka K, et al. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2012. doi:10.1167/iovs.12-10793
173. Zhou Y, Zhou L, Zhou K, Zhang J, Shang F, Zhang X. Celastrol Protects RPE Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death via Activation of Nrf2 Signaling Pathway. *Curr Mol Med*. Published online 2019. doi:10.2174/1566524019666190424131704
174. Mandal MNA, Patlolla JMR, Zheng L, et al. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radic Biol Med*. Published online 2009. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.006
175. Ni T, Yang W, Xing Y. Protective effects of delphinidin against H₂O₂-induced oxidative injuries in human retinal pigment epithelial cells. *Biosci Rep*. Published online 2019. doi:10.1042/BSR20190689

176. Zhao H, Wang R, Ye M, Zhang L. Genipin protects against H₂O₂-induced oxidative damage in retinal pigment epithelial cells by promoting Nrf2 signaling. *Int J Mol Med*. Published online 2019. doi:10.3892/ijmm.2018.4027
177. He H, Wei D, Liu H, et al. Glycyrrhizin protects against sodium iodate-induced RPE and retinal injury through activation of AKT and Nrf2/HO-1 pathway. *J Cell Mol Med*. Published online 2019. doi:10.1111/jcmm.14246
178. Frede K, Ebert F, Kipp AP, Schwerdtle T, Baldermann S. Lutein Activates the Transcription Factor Nrf2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Agric Food Chem*. Published online 2017. doi:10.1021/acs.jafc.7b01929
179. Kamoshita M, Toda E, Osada H, et al. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. *Sci Rep*. Published online 2016. doi:10.1038/srep30226
180. Yang PM, Wu ZZ, Zhang YQ, Wung BS. Lycopene inhibits ICAM-1 expression and NF- κ B activation by Nrf2-regulated cell redox state in human retinal pigment epithelial cells. *Life Sci*. Published online 2016. doi:10.1016/j.lfs.2016.05.006
181. Kim SH, Park JW. Morin hydrate attenuates CSE-induced lipid accumulation, ER stress, and oxidative stress in RPE cells: implications for age-related macular degeneration. *Free Radic Res*. Published online 2019. doi:10.1080/10715762.2019.1637862
182. Zhu Q, Liu M, He Y, Yang B. Quercetin protect cigarette smoke extracts induced inflammation and apoptosis in RPE cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. Published online 2019. doi:10.1080/21691401.2019.1608217
183. Shao Y, Yu H, Yang Y, Li M, Hang L, Xu X. A Solid Dispersion of Quercetin Shows Enhanced Nrf2 Activation and Protective Effects against Oxidative Injury in a Mouse Model of Dry Age-Related Macular Degeneration. *Oxid Med Cell Longev*. Published online 2019. doi:10.1155/2019/1479571
184. Zhang H, Liu YY, Jiang Q, et al. Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Free Radic Biol Med*. Published online 2014. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.025
185. Xie X, Feng J, Kang Z, et al. Taxifolin protects RPE cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Mol Vis*. Published online 2017.
186. Zou X, Gao J, Zheng Y, et al. Zeaxanthin induces Nrf2-mediated phase II enzymes in protection of cell death. *Cell Death Dis*. Published online 2014. doi:10.1038/cddis.2014.190
187. Parra P. Yerba mate - Alimentos Argentinos. Published 2005. Accessed July 22, 2020. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=444>
188. Croce DM Da. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. *Ciência Florestal*. Published online 2005. doi:10.5902/198050981685
189. Nuevos valores para la hoja verde y la canchada de yerba mate | Noticias del Norte. Accessed November 30, 2020. <https://noticiasdelnorte.com/nuevos-valores-para-la-hoja-verde-y-la-canchada-de-yerba-mate/>

190. Cómo es el proceso para producir yerba mate orgánica en Argentina | Infocampo. Accessed November 30, 2020. <https://www.infocampo.com.ar/como-es-el-proceso-para-producir-yerba-mate-organica-en-argentina/>
191. De Misiones a Corrientes: así es la ruta de la Yerba Mate - DestinoNea. Accessed November 30, 2020. <https://www.destinonea.com/de-misiones-a-corrientes-asi-es-la-ruta-de-la-yerba-mate/>
192. Pagliosa CM, Vieira MA, Podestá R, et al. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chem.* Published online 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.040
193. Brumovsky LAHVGFMR; NPS. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN DISTINTAS FORMAS DE CONSUMO DE YERBA MATE PRODUCIDAS EN ARGENTINA. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). Argentina. Published 2008. Accessed July 22, 2020. http://yerbamate.bg/media/sites/89/2014/11/Research_on_poliphenoles_INYM_spanish_La_yerba_mate_posee_alto_nivel_de_antioxidantes-PDF-92KB.pdf
194. Mesquita M, Santos E, Kassuya CA, Salvador MJ. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *J Ethnopharmacol.* 2021;279:114401. doi:10.1016/J.JEP.2021.114401
195. Bravo L, Goya L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International.* Published online 2007. doi:10.1016/j.foodres.2006.10.016
196. Cardozo EL, Ferrarese-Filho O, Filho LC, Ferrarese M de LL, Donaduzzi CM, Sturion JA. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis.* Published online 2007. doi:10.1016/j.jfca.2007.04.007
197. Carini M, Maffei Facino R, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* Published online 1998. doi:10.1002/(sici)1097-0231(19981130)12:22<1813::aid-rcm379>3.0.co;2-%23
198. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia.* Published online 2001. doi:10.1016/S0367-326X(01)00331-8
199. Heck CI, De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* Published online 2007. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
200. Mateos R, Baeza G, Sarriá B, Bravo L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and

- antioxidant activity. *Food Chem.* 2018;241(October 2016):232-241. doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.085
201. Tajik N, Tajik M, Mack I, Enck P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr.* 2017;56(7):2215-2244. doi:10.1007/s00394-017-1379-1
 202. Liu L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H, Zeng X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chem.* Published online 2009. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.038
 203. Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci.* 2010;99(2):575-586. doi:10.1002/jps.21886
 204. Berté KAS, Beux MR, Spada PKWDS, Salvador M, Hoffmann-Ribani R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J Agric Food Chem.* Published online 2011. doi:10.1021/jf2008343
 205. Stalmach A, Williamson G, Crozier A. Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food Funct.* Published online 2014. doi:10.1039/c4fo00316k
 206. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem.* Published online 2001. doi:10.1021/jf010668c
 207. Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT. Characterization of Metabolites of Hydroxycinnamates in the in Vitro Model of Human Small Intestinal Epithelium Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem.* Published online 2003. doi:10.1021/jf030470n
 208. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med.* Published online 2002. doi:10.1016/S0891-5849(02)00877-8
 209. Stalmach A, Mullen W, Barron D, et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism and Disposition.* Published online 2009. doi:10.1124/dmd.109.028019
 210. Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch Biochem Biophys.* Published online 2010. doi:10.1016/j.abb.2010.03.005
 211. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *J Nutr.* Published online 2007. doi:10.1093/jn/137.10.2196
 212. Duarte GS, Farah A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* ; 2011. doi:10.1021/jf201906p

213. Renouf M, Guy PA, Marmet C, et al. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: Small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Mol Nutr Food Res*. Published online 2010. doi:10.1002/mnfr.200900056
214. Vitaglione P, Fogliano V, Pellegrini N. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food Funct*. 2012;3(9):916. doi:10.1039/c2fo30037k
215. De Oliveira DM, Sampaio GR, Pinto GB, Catharino RR, Bastos DHM. Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of maté tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. *Eur J Nutr*. 2017;58(8):2541-2556. doi:10.1007/s00394-016-1290-1
216. Lopez Tricas JM. El café, origen, química y efectos . 2015. Accessed July 24, 2020. <https://sites.google.com/a/info-farmacia.com/info-farmacia/historia/el-cafe-origen-quimica-y-efectos>
217. Colpo AC, Rosa H, Lima ME, et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem*. Published online 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.059
218. da Silveira TFF, Meinhart AD, de Souza TCL, Cunha ECE, de Moraes MR, Godoy HT. Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. *Food Research International*. Published online 2017. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.098
219. Gebara KS, Gasparotto-Junior A, Santiago PG, et al. Daily Intake of Chlorogenic Acids from Consumption of Maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Traditional Beverages. *J Agric Food Chem*. 2017;65(46):10093-10100. doi:10.1021/acs.jafc.7b04093
220. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):378-384. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032
221. Gao H, Liu Z, Qu X, Zhao Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia*. Published online 2013. doi:10.1016/j.fitote.2012.12.024
222. Boaventura BCB, Di Pietro PF, Stefanuto A, et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*. Published online 2012. doi:10.1016/j.nut.2011.10.017
223. Bravo L, Mateos R, Sarriá B, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia*. Published online 2014. doi:10.1016/j.fitote.2013.11.007
224. De Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem*. Published online 2009. doi:10.1021/jf901660g

225. Messina D, Soto C, Méndez A, et al. Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidémicos. *Nutr Hosp.* 2015;31(5):2131-2139. doi:10.3305/nh.2015.31.5.8386
226. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, et al. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *British Journal of Nutrition.* Published online 2009. doi:10.1017/S000711450802504X
227. Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, et al. Effects of Maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem.* Published online 2009. doi:10.1021/jf803096g
228. Kim SY, Oh MR, Kim MG, Chae HJ, Chae SW. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):1-8. doi:10.1186/s12906-015-0859-1
229. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* Published online 2013. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.016
230. González Arbeláez LF, Fantinelli JC, Ciocchi Pardo A, et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: The mechanisms involved. *Food Funct.* Published online 2016. doi:10.1039/c5fo01255d
231. Bernardi A, Ballesteros P, Schenk M, et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) favors survival and growth of dopaminergic neurons in culture. *Movement Disorders.* Published online 2019. doi:10.1002/mds.27667
232. Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher MC, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Histomorphometry, Biomechanics, and Densitometry on Bones in the Rat. *Calcif Tissue Int.* Published online 2015. doi:10.1007/s00223-015-0043-0
233. Pereira CS, Stringhetta-Garcia CT, da Silva Xavier L, et al. *Ilex paraguariensis* decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. *Exp Gerontol.* Published online 2017. doi:10.1016/j.exger.2017.07.006
234. Cittadini MC, Repossi G, Albrecht C, et al. Effects of bioavailable phenolic compounds from *Ilex paraguariensis* on the brain of mice with lung adenocarcinoma. *Phytotherapy Research.* Published online 2019. doi:10.1002/ptr.6308
235. Xu GH, Kim YH, Choo SJ, et al. Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. *Arch Pharm Res.* Published online 2009. doi:10.1007/s12272-009-1905-7
236. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition.* Published online 2008. doi:10.1016/j.nut.2008.01.002
237. Strassmann BB, Vieira AR, Pedrotti EL, Morais HNF, Dias PF, Maraschin M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and

- their effects on blood vessel formation in chick embryos. *J Agric Food Chem*. Published online 2008. doi:10.1021/jf801041f
238. Garcia-Lazaro RS, Lamdan H, Caligiuri LG, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of Yerba Mate extract in colon cancer models. *J Food Sci*. 2020;85(7):2186-2197. doi:10.1111/1750-3841.15169
 239. Rocio Soledad GL, Lorena Gisel C, Norailys L, Humberto L, Daniel Fernando A, Hernan Gabriel F. Yerba Mate Modulates Tumor Cells Functions Involved in Metastasis in Breast Cancer Models. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/FPHAR.2021.750197
 240. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/801457
 241. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*. Published online 2010. doi:10.1016/j.fct.2010.01.003
 242. Huang K, Liang X ci, Zhong Y li, He W yan, Wang Z. 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXR α transcription. *J Sci Food Agric*. Published online 2015. doi:10.1002/jsfa.6896
 243. Yukawa GS, Mune M, Otani H, et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. In: *Biochemistry (Moscow)*. ; 2004. doi:10.1023/B:BIRY.0000016354.05438.0f
 244. Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two Cecropia species. *Phytotherapy Research*. Published online 2005. doi:10.1002/ptr.1722
 245. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*. Published online 2003. doi:10.1093/ajcn/78.4.728
 246. Wan CW, Wong CNY, Pin WK, et al. Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research*. Published online 2013. doi:10.1002/ptr.4751
 247. Onakpoya IJ, Spencer EA, Thompson MJ, Heneghan CJ. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Hum Hypertens*. Published online 2015. doi:10.1038/jhh.2014.46
 248. Suzuki A, Kagawa D, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*. Published online 2002. doi:10.1291/hypres.25.99
 249. Kozuma K, Tsuchiya S, Kohori J, Hase T, Tokimitsu I. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertension Research*. Published online 2005. doi:10.1291/hypres.28.711

250. Hakkou Z, Maciuk A, Leblais V, et al. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic extract of *Inula viscosa*: Biological evaluation and POM analysis of cynarin, chlorogenic acid as potential hypertensive. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Published online 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.06.015
251. Tom ENL, Girard-Thernier C, Demougeot C. The Janus face of chlorogenic acid on vascular reactivity: A study on rat isolated vessels. *Phytomedicine*. Published online 2016. doi:10.1016/j.phymed.2016.06.012
252. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*. Published online 2017. doi:10.3390/molecules22030358
253. Liu CC, Zhang Y, Dai BL, et al. Chlorogenic acid prevents inflammatory responses in IL-1 β -stimulated human SW-1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis. *Mol Med Rep*. Published online 2017. doi:10.3892/mmr.2017.6698
254. Fernández MA, Sáenz MT, García MD. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Published online 1998. doi:10.1111/j.2042-7158.1998.tb03332.x
255. Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation. Concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *Biochem Pharmacol*. Published online 1998. doi:10.1016/S0006-2952(97)00470-X
256. Zhao Z, Hee SS, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF- α -induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*. Published online 2008. doi:10.1021/jf073168d
257. Shin HS, Satsu H, Bae MJ, et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem*. Published online 2015. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.100
258. Choi MS, Park HJ, Kim SR, Kim DY, Jung UJ. Long-Term Dietary Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. <https://home.liebertpub.com/jmf>. 2017;20(12):1168-1175. doi:10.1089/JMF.2017.3995
259. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):469-471. doi:10.1101/pdb.prot095505
260. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798-1806. doi:10.1038/nprot.2009.191
261. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. Published online 1976. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

262. Cantó Soler MV, Gallo JE, Dodds RA, Suburo AM. A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. *Exp Eye Res.* 2002;75(5):491-504. doi:10.1006/exer.2002.2031
263. Wang J, Iacovelli J, Spencer C, Saint-Geniez M. Direct effect of sodium iodate on neurosensory retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1941-1952. doi:10.1167/iovs.13-13075
264. Chidlow G, Daymon M, Wood JPM, Casson RJ. Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: Comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2011;59(10):884-898. doi:10.1369/0022155411418115
265. Barthel LK, Raymond PA. Improved method for obtaining 3- μ m cryosections for immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1990;38(9):1383-1388. doi:10.1177/38.9.2201738
266. Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Anderson RE. Topography of retinal damage in light-exposed albino rats. *Exp Eye Res.* 2008;87(3):292-295. doi:10.1016/j.exer.2008.06.002
267. Jang H, Choi Y, Ahn HR, Jung SH, Lee CY. Effects of phenolic acid metabolites formed after chlorogenic acid consumption on retinal degeneration in vivo. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(10):1918-1929. doi:10.1002/mnfr.201400897
268. Jeon YD, Kee JY, Kim DS, et al. Effects of Ixeris dentata water extract and caffeic acid on allergic inflammation in vivo and in vitro. *BMC Complement Altern Med.* Published online 2015. doi:10.1186/s12906-015-0700-x
269. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Brooklyn).* Published online 2008.
270. Wilson BE, Mochon E, Boxer LM. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol.* Published online 1996. doi:10.1128/mcb.16.10.5546
271. Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Part B):314-336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036
272. Mimura T, Kaji Y, Noma H, Funatsu H, Okamoto S. The role of SIRT1 in ocular aging. *Exp Eye Res.* Published online 2013. doi:10.1016/j.exer.2013.07.017
273. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab.* Published online 2012. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.003
274. Geisen P, McColm JR, King BM, Hartnett ME. Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Curr Eye Res.* Published online 2006. doi:10.1080/02713680600837408
275. Gibbs D, Williams DS. Isolation and culture of primary mouse retinal pigmented epithelial cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* ; 2003. doi:10.1007/978-1-4615-0067-4_44

276. Mayerson PL, Hall MO, Clark V, Abrams T. An improved method for isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 1985.
277. Maminishkis A, Chen S, Jalickee S, et al. Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2006. doi:10.1167/iovs.05-1622
278. Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc*. Published online 2009. doi:10.1038/nprot.2009.33
279. Wang N, Koutz CA, Anderson RE. A method for the isolation of retinal pigment epithelial cells from adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 1993.
280. Farkas MH, Lew DS, Sousa ME, et al. Mutations in Pre-mRNA processing factors 3, 8, and 31 cause dysfunction of the retinal pigment epithelium. *American Journal of Pathology*. Published online 2014. doi:10.1016/j.ajpath.2014.06.026
281. Bonilha VL, Finnemann SC, Rodriguez-Boulan E. Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Biology*. Published online 1999. doi:10.1083/jcb.147.7.1533
282. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking $\alpha\beta 5$ integrin. *Journal of Experimental Medicine*. Published online 2004. doi:10.1084/jem.20041447
283. Blenkinsop TA, Salero E, Stern JH, Temple S. The culture and maintenance of functional retinal pigment epithelial monolayers from adult human eye. *Methods in Molecular Biology*. Published online 2013. doi:10.1007/978-1-62703-125-7_4
284. Chen M, Muckersie E, Robertson M, Fraczek M, Forrester J V., Xu H. Characterization of a spontaneous mouse retinal pigment epithelial cell line B6-RPE07. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2008. doi:10.1167/iovs.07-1522
285. Fernandez-Godino R, Garland DL, Pierce EA. Isolation, culture and characterization of primary mouse RPE cells. *Nat Protoc*. 2016;11(7):1206-1218. doi:10.1038/nprot.2016.065
286. Iribarne M, Canto-Soler MV, Torbidoni V, Suburo AM. Controlling retinal pigment epithelium injury after experimental detachment of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(3):1348-1354. doi:10.1167/iovs.06-0964
287. Zhou P, Kannan R, Spee C, Sreekumar PG, Dou G, Hinton DR. Protection of retina by αB crystallin in sodium iodate induced retinal degeneration. *PLoS One*. Published online 2014. doi:10.1371/journal.pone.0098275
288. Moriguchi M, Nakamura S, Inoue Y, et al. Irreversible photoreceptors and RPE cells damage by intravenous sodium iodate in mice is related to macrophage accumulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2018. doi:10.1167/iovs.17-23532

289. Gong L, Wu Q, Song B, Lu B, Zhang Y. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clin Exp Ophthalmol*. Published online 2008. doi:10.1111/j.1442-9071.2008.01857.x
290. Zhao C, Yasumura D, Li X, et al. mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Published online 2011. doi:10.1172/JCI44303
291. Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Moriguchi K, Tsubura A. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr Eye Res*. Published online 2002. doi:10.1076/ceyr.25.6.373.14227
292. Zhao J, Kim HJ, Sparrow JR. Multimodal fundus imaging of sodium iodate-treated mice informs RPE susceptibility and origins of increased fundus autofluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2017. doi:10.1167/iovs.17-21557
293. Sueishi Y, Hori M, Ishikawa M, et al. Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *J Clin Biochem Nutr*. Published online 2014. doi:10.3164/jcbrn.13-53
294. Christensen LP, Christensen KB. The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress. In: *Polyphenols in Human Health and Disease*. ; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00023-2
295. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. Published online 2014. doi:10.1016/j.redox.2014.02.006
296. Pregi N, Belluscio LM, Berardino BG, Castillo DS, Cánepa ET. Oxidative stress-induced CREB upregulation promotes DNA damage repair prior to neuronal cell death protection. *Mol Cell Biochem*. Published online 2017. doi:10.1007/s11010-016-2858-z
297. Barcia JM, Flores-Bellver M, Muriach M, et al. Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:624287. doi:10.1155/2015/624287
298. O'Driscoll C, Wallace D, Cotter TG. bFGF promotes photoreceptor cell survival in vitro by PKA-mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3 β and CREB-dependent Bcl-2 up-regulation. *J Neurochem*. Published online 2007. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04827.x
299. Ye D, Shi Y, Xu Y, Huang J. PACAP Attenuates Optic Nerve Crush-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis Via Activation of the CREB-Bcl-2 Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*. Published online 2019. doi:10.1007/s12031-019-01309-9
300. Zhao Z, Chen Y, Wang J, et al. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One*. 2011;6(4). doi:10.1371/journal.pone.0019456
301. Zeng Y, Yang K. Sirtuin 1 participates in the process of age-related retinal degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. Published online 2015. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.139
302. Li L, Wei W, Zhang Y, et al. SirT1 and STAT3 protect retinal pigmented epithelium cells against oxidative stress. *Mol Med Rep*. Published online 2015. doi:10.3892/mmr.2015.3570

303. Kong D, Ding Y, Liu J, et al. Chlorogenic acid prevents paraquat-induced apoptosis via Sirt1-mediated regulation of redox and mitochondrial function. *Free Radic Res*. Published online 2019. doi:10.1080/10715762.2019.1621308
304. Ding YW, Zhao GJ, Li XL, et al. SIRT1 exerts protective effects against paraquat-induced injury in mouse type II alveolar epithelial cells by deacetylating NRF2 in vitro. *Int J Mol Med*. 2016;37(4):1049-1058. doi:10.3892/ijmm.2016.2503
305. Li J, Dou X, Li S, Zhang X, Zeng Y, Song Z. Nicotinamide ameliorates palmitate-induced ER stress in hepatocytes via cAMP/PKA/CREB pathway-dependent Sirt1 upregulation. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(11 Pt A):2929-2936. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.003
306. Xia X, Qu B, Li YM, et al. NFAT5 protects astrocytes against oxygen–glucose–serum deprivation/restoration damage via the SIRT1/Nrf2 pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017;61(1):96-104. doi:10.1007/s12031-016-0849-x
307. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. Published online 2011. doi:10.1089/ars.2011.3999
308. Becker AM, Cunha HP, Lindenberg AC, et al. Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals. *Plant Foods for Human Nutrition*. Published online 2019. doi:10.1007/s11130-019-00764-4
309. Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res*. 2014;119:111-114. doi:10.1016/j.exer.2013.10.024
310. Johnson J, Maher P, Hanneken A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in arpe-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2398-2406. doi:10.1167/iovs.08-2088
311. Lacroix S, Klicic Badoux J, Scott-Boyer MP, et al. A computationally driven analysis of the polyphenol-protein interactome. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-20625-5
312. Ortega JT, Parmar T, Jastrzebska B. Flavonoids enhance rod opsin stability, folding, and self-association by directly binding to ligand-free opsin and modulating its conformation. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(20):8101-8122. doi:10.1074/jbc.RA119.007808
313. Bian ZM, Elner SG, Elner VM. Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):812-822. doi:10.1016/j.exer.2006.12.016