

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**



**“INTERNALIZACIÓN NUCLEAR DE NRF2 SECUNDARIO AL USO DE
EPIGALOCATEQUINA 3 GALATO COMO ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA EN
RETINAS DE CONEJOS DAÑADAS BAJO EL ESTÍMULO DE
ISQUEMIA/REPERFUSIÓN”**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGIA

PRESENTA:

DR. CÉSAR AUGUSTO CONDE CASTAÑÓN

ASESOR DE TESIS

DR. EN C. JOSÉ JAVIER FLORES ESTRADA

MÉXICO, CDMX

JULIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS
REGISTRO HJM 0118/16-R

DR. CARLOS VIVEROS CONTRERAS
TITULAR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

DR. MARIO ENRIQUE LEONARDO DUARTE TORTORIELLO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

DR. EN C. JOSÉ JAVIER FLORES ESTRADA
ASESOR DE TESIS
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

“Por lejos el mejor premio que ofrece la vida es la oportunidad de trabajar duro en lo que vale la pena hacer”

Theodore Roosevelt

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la capacidad y fuerza para seguir adelante en este largo camino de vida.

A mis padres Jorge Conde Hernández y Nedy Castañón Domínguez, quienes han estado a mi lado para cumplir este proyecto, gracias por su apoyo incondicional, paciencia y amor.

A mi hermanos Jorge Conde Castañón y Andrea Conde Castañón, porque que siempre estuvieron cuando los necesité, nunca dejándome solo.

Agradezco al Dr. Mario Duarte Tortoriello, por darme la oportunidad de poder lograr uno de mis grandes objetivos de vida.

Mi asesor de tesis Dr. José Javier Flores Estrada, por la inmensa paciencia, por todas sus enseñanzas y además de ser mi maestro un gran amigo.

Agradezco al Ing. Raúl Josué Rivera Pérez, por todo su apoyo, sin ti quizás gran parte de mi proyecto no hubiera sido completado.

Dra. Malena Arroyo Mendoza, amiga patóloga, quien me enseñó y aportó una parte primordial en este proyecto.

C. Francisco Jiménez y colaboradores, por permitirme trabajar en el bioterio y ayudarme en todo lo posible.

“En las buenas y en las malas juntos, toma mi mano si me escuchas”

ÍNDICE

I.- RESUMEN	6
II.- INTRODUCCIÓN	7
III.- JUSTIFICACIÓN	13
IV.- OBJETIVOS	15
V.- METODOLOGÍA	15
- DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE ESTUDIO	15
- DEFINICIÓN DE POBLACIÓN	15
- CONSIDERACIONES ÉTICAS	16
- MODELO DAÑO ISQUEMIA REPERFUSIÓN EN RETINA	17
- ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	20
- ASPECTOS BIOSEGURIDAD	20
VI.- RESULTADOS	21
VII.- DISCUSIÓN	32
VIII.- CONCLUSIÓN	34
IX.- BIBLIOGRAFÍA	35
X.- ANEXO	43

I.- RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El síndrome de isquemia reperfusión (I/R) se asocia a una falta de suministro sanguíneo, generando hipoxia, que posterior se asocia a del flujo sanguíneo, lo que produce un estado de reperfusión, generando liberación y activación de procesos metabólicos, radicales libres y citoquinas inflamatorias, que van a generar un daño específico al tejido. El síndrome I/R a nivel ocular se asocia a patologías como episodios de glaucoma agudo, retinopatía diabética, oclusiones vasculares y retinopatía del prematuro, todas ellas, generan un daño oxidativo a nivel retiniano teniendo como resultado destrucción celular, lo cual se verá reflejado clínicamente como una pérdida visual irreversible. Sin embargo existen algunas vías que se activan en respuesta a la I/R, vías antioxidantes capaces de prevenir el daño oxidativo inducido. El NRF2 es un factor de transcripción que regula la expresión de elementos antioxidantes, considerado como un factor de protección celular contra estrés oxidativo y procesos inflamatorios, secundario a una serie de eventos que genera internalización nuclear, sin embargo su comportamiento a nivel retiniano no está del todo estudiado. El objetivo del estudio se basa en el uso de un flavonoide natural, la Epigallocatequina 3- galato (EGCG) secundario del metabolismo de la planta *camelia sinensis*, pueda determinar la capacidad antioxidante para estimular la internalización nuclear de NRF2 asociado a un proceso de I/R previo en tejido retiniano.

METODOLOGÍA. Se realizó un estudio experimental pre – clínico con medición transversal y direccionalidad prolectiva, utilizando conejos machos de raza Nueva Zelanda con peso estandarizado y sin patología oculares previa. Se indujo isquemia por aumento de presión

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

intraocular monocular por arriba de 85 mmHg durante 60 minutos, y valoración de la reperfusión a las 3, 6, 24 y 48 hrs posteriores, obteniendo el tejido vía enucleación. Para la administración de EGCG y grupo de estudios la dosis establecida será de 0.2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg y un grupo vehículo, el cual será disuelto en solución salina estéril aplicado en vena marginal de la oreja del conejo 30 mins durante la isquemia. Las muestras serán analizadas mediante tinción hematoxilina y eosina evaluando cambios estructurales, cambios por infiltración de células inflamatorias y grado de necrosis, por Inmunofluorecencia se determinará el nivel de expresión e inmunolocalización de NRF2 OH-1. **RESULTADOS.** En base los resultados histológicos de decide la dosis de EGCG E500, en comparación con el vehículo (IR-SS-Xhrs), existe mayor translocación internuclear de NRF2 y expresión citoplasmática de OH-1 en dosis única. **CONCLUSIONES.** En este estudio se sugiere que el uso de EGCG en dosis única postratamiento en retinas con I/R la expresión de NRF2/OH1, puede ser un factor neuroprotector

II.- INTRODUCCIÓN

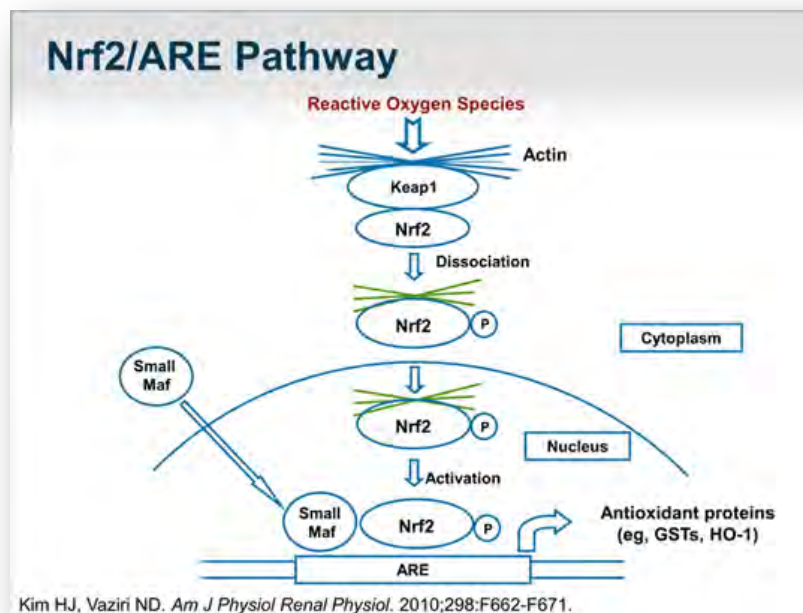
El síndrome de isquemia reperfusión (I/R) se define como un proceso de falta de suministro sanguíneo en un periodo determinado a cierto tejidos generando un estado de hipoxia con posterior restablecimiento del flujo, conocido como reperfusión; cuando existe la interrupción del flujo sanguíneo da como resultado alteraciones metabólicas, que ocasionan daño celular debido a la generación de radicales libres y liberación de citoquinas inflamatorias (1).

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

En retina, el proceso de I/R se asocia a múltiples patologías como episodios de glaucoma agudo, retinopatía diabética, oclusiones vasculares y retinopatía del prematuro (2,3), produciendo un daño oxidativo generado edema neural, destrucción celular y activación de células gliales (4-6). Las principales alteraciones por isquemia se reflejan como edema de tejido y muerte de células ganglionares. Las células de Müller participan en la regulación de proteínas ácida fibrilar de tipo glial (GFAP) caracterizada por un incremento del aumento de las células gliales, la expresión de esta proteína es directamente proporcional al daño establecido por la isquemia (30). Los mecanismos subyacentes del daño a la retina inducidos por la IR inician con una depleción de oxígeno y reservas de energía permitiendo alteración en la homeostasis, además de este daño isquémico, se produce reperfusión, en el cual existe una mayor producción de radicales libres como especies reactivas a nitrógeno y oxígeno (RNS y ROS), estos radicales contribuyen de manera directa al daño celular modulando las vías de procesos apoptóticos (31). En las células ganglionares con I/R son más susceptibles a la degeneración celular reflejándose como una baja en la agudeza visual (7,15). El estrés oxidativo a nivel histológico produce cambios tempranos como necrosis coagulativa de capas internas, las células neuronales sufren edema durante las primeras horas asociado a opacidad de la materia gris neuronal, las zonas de necrosis coagulativa pueden observarse de manera localizada como resultado de microinfartos de la capa de fibras nerviosas; en fases tardías, la capa neuronal externa aún conserva su estructura, y la interna ya presenta un daño generalizado, considerado como una zona acelular por la gran actividad apoptótica que se ha producido (15).

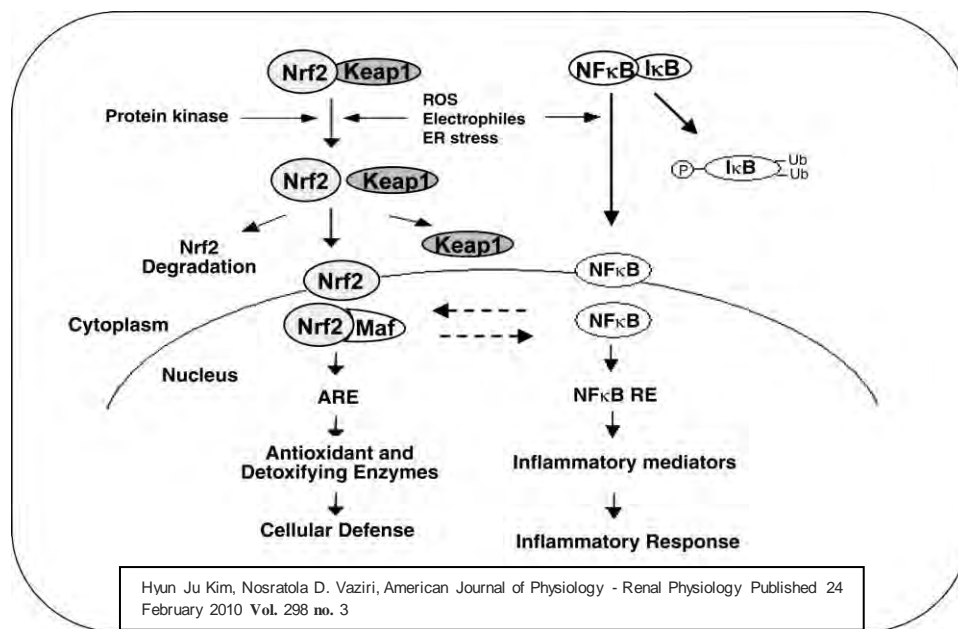
“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

Sin embargo las células neuronales de la retina son capaces de presentar un sistema homeostático antioxidante endógeno con capacidad de regular la respuesta al estrés oxidativo (7), como la expresión de los antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión (12), son sustancias reactivas de oxígeno de diferentes compartimientos celulares; SOD convierte radicales de O₂ en moléculas de H₂O₂ dentro de la mitocondria, la catalasa remueve H₂O₂ generado por la ruptura lipídica de los peroxisomas, es así como estas enzimas son expresadas como un proceso de regulación al daño isquémico. Recientemente se ha demostrado que los antioxidante endógenos están regulados por un elemento respuesta antioxidante (ARE). El factor transcripcional NRF2 (factor eritroide de transcripción derivado 2) se une a ARE para inducir la expresión de genes blanco NQO1 (NADPH quinona deshidrogenasa 1), HO-1 (hemo – oxigenasa 1) y GST (Glutatión S-Transferasa) en respuesta a antioxidantes y xenobióticos, así como la regulación de elementos de respuesta antioxidante (8).



“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

NRF2 es una proteína de 373 aminoácidos, de masa molecular 95 a 110 kDa (a veces denominado p45), se expresa en células de tipo eritroide o megacariocitos, induciendo la expresión de genes de globina en tejidos específicos (32). NRF2 tuvo su primera evidencia cuando se estudió como factor protector contra el estrés oxidativo (9). Su regulación es un evento constitutivo que no requiere modificación post-transcripcional del sustrato debido a su asociación con Keap1 funcionando como un adaptador de sustrato al proteosoma (10). En condiciones fisiológicas el NRF2 reside en el citoplasma unido a Keap1, proteína inhibidora de la liberación, además de ser un marcaje de degradación proteosómica. Existen inductores de la vía mediada por ARE que tienen la capacidad química para interactuar con las cisteínas de Keap1 ya se por oxidación o alquilación para poder llevar a cabo esta disociación entre NRF2 y Keap1 (25), sin embargo aún no se han determinado cuales son las cisteínas que se modifican como respuesta a los inductores de estrés oxidativo.



“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

Una vez que NRF2 logra el proceso de internalización nuclear actúa como un sistema de transcripción activando genes antioxidantes como NADPH, Hemoxigenasa 1, catalasa, generando mecanismo citoprotector, en hígado, pulmones y cerebro (11).

Estudios en retina muestra que NRF2 es un factor de modulación de respuesta inflamatoria asociado a estrés oxidativo (13), y la deficiencia de NRF2 incrementa la susceptibilidad al estrés oxidativo incluyendo el daño en el epitelio pigmentario. (14), es por estas cualidades, que la regulación de NRF2 con agentes terapéuticos podría ser una alternativa para evitar el daño producido por estrés oxidativo en patologías oftálmicas de tipo isquémicas. Los flavonoides entre ellos se han contemplado en la búsqueda de dichos tratamientos son compuestos polifenólicos naturales que han evolucionado para proteger las plantas contra el daño oxidativo inducido por la exposición crónica a la luz ultravioleta. Estos compuestos que están presentes en altas concentraciones en muchos alimentos de origen vegetal (frutas, verduras y té) son regularmente consumidos en la dieta humana. Los flavonoides tienen muchos beneficios para la salud, asociados a un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas, tales como enfermedades cardiovasculares y el cáncer al afectar los mecanismos moleculares implicados en la iniciación y progresión de estas enfermedades [53]. Debido a una potente actividad antioxidante depurando los radicales libres tóxicos (ROS) mediante la donación de iones de hidrógeno. Además, también pueden modular vías de señalización celular (15). En particular, se puede inducir la expresión de fase-2 proteínas que funcionan para mejorar las defensas naturales de las células contra el estrés oxidativo. Las proteínas de fase-2 catalizan varias reacciones que

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

neutralizan las especies reactivas de oxígeno y aumentan las concentraciones intracelulares de antioxidantes endógenos, como el glutatión (16). Entre las proteínas de fase-2 algunas de las enzimas están implicadas en el metabolismo de glutatión (glutatión S-Transferasa [GSH], glutamato cisteína ligasa) y otras enzimas con propiedades antioxidantes, como la hemo-oxigenasa 1 (HO-1). (16). El té verde (de la planta *Camellia sinensis*) es una de las bebidas más populares en el mundo y el impacto de su consumo en diversas enfermedades y poblaciones han sido reportados en estudios clínicos y en animales de laboratorio (54). Los efectos sobre la salud se atribuyen al alto contenido de flavonoides polifenólicos, en particular las catequinas. Las catequinas ha mostrado que ayudan a suprimir la inflamación crónica y daño por estrés oxidativo, aumentar la capacidad antioxidante y poseer propiedades anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatorios, anti-obesidad y antidiabéticos (55). Las principales catequinas que se encuentran en el té verde son epigallocatequina-3-galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), la epigallocatequina (EGC) y epicatequina (EC). EGCG es la catequina más abundante que representa el 50-80% del contenido total de las catequinas, que se traduce en 200 a 300 mg / taza de preparado de té verde (56). El conocimiento in vitro de la propiedades antioxidantes de EGCG se deben a la presencia de los grupos hidroxilo fenólicos en el anillo B y D. EGCG puede modular varias funciones de las células inmunes (57).

Varios estudios muestran evidencias que EGCG ejerce una protección en varios líneas celulares inducida por estrés oxidativo a través de la activación de las p38 MAPK y ERK1/2 las cuales incrementan la expresión de Nrf2/HO-1. O bien se ha propuesto que

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

EGCG puede activar a Nrf2 por la disociación con Keap1. Entonces, Nrf2 activado entra al núcleo y se une a ARE para estimular la expresión de genes blanco como HO-1. HO1 desintoxica ROS (58). Otros estudios muestran la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B and Nrf2-Keap1 por EGCG contribuye al efecto neuroprotector en un modelo de nefropatía obstructivas, así como efectos neuroprotectores de isquemia cerebral focal, sugiriendo que se a través de la activación de la vía de señalización NRF2/ARE.

Nuestra propuesta es el uso de un flavonoide de origen natural conocido como Epigallocatequina 3- galato (EGCG). Se ha estudiado que presenta actividad antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria, anticarcinogénica, efecto sobre alteraciones cardiovasculares (16-24). EGCG ha sido estudiado por sus propiedades y vías regulatorias, capaces de neutralizar actividad de los radicales libres (26), modular productos de la fosforilación de citoquinas (27), afectar la expresión de apoptosis por medio de la regulación de diversas caspasas (28), disminuir factores inflamatorios por medios de la inhibición de factor de degradación nuclear NF κ B (29). En este estudio se determinara la dosis única de EGCG intravenoso que no manifiesten severos cambios estructurales de la retina dañadas por I/R y su asociación con la inmunolocalización de NRF2 en las células neuronales de la retina.

III.- JUSTIFICACIÓN

Las principales causas de morbi – mortalidad en México son relacionadas a enfermedades crónicas degenerativas como la DM2, Hipertensión arterial sistémica y síndrome metabólico. Estas enfermedades presentan alteraciones oftálmicas, siendo una de las

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

causas principales de ceguera irreversible, generado por un proceso de isquemia progresiva a nivel de la retina como la retinopatía diabética y las oclusiones vasculares. En base a la fisiopatología de dichas enfermedades es de gran importancia poder establecer regulación de los factores inflamatorios para disminuir el daño isquémico sobre la retina y así tener mejor pronóstico visual.

El EGCG por sus cualidades antioxidantes puede ser una medida preventiva para disminuir la pérdida visual en patologías oftálmicas con daño isquémico, previniendo o retrasando la muerte de células neuronales de la retina, generando un mejor pronóstico. Pretendiendo demostrar en un modelo de prueba experimental de I/R ya estudiado, los factores que participan en el estrés oxidativo y proteínas que participan en el proceso de defensa de dicho daño para evitar mayor lesión al tejido neuronal. Los cambios histológicos y bioquímicos que se presentan en el daño de I/R en modelos experimentales animales pueden presentar similitud a los de patologías isquémicas e inflamatorias que se presentan en humanos. El resultado favorable de este estudio puede dar pauta para determinar nuevas investigaciones sobre la cualidad de EGCG como una sustancia neuroprotectora a nivel retiniano y poder ser una terapia alternativa para el manejo de patologías neurodegenerativas.

Al no haber estudios que demuestren el efecto de EGCG sobre NRF2 como un regulador de la capacidad antioxidante endógena es de gran relevancia aportar este conocimiento a la comunidad científica

IV.- OBJETIVOS

Objetivos General:

Demostrar el efecto neuroprotector de EGCG en retinas dañadas por I/R asociado a la internalización nuclear de NRF2

Objetivos Específicos:

- ❖ Evaluar los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos del proceso inflamatorio y muerte celular en la retina de los grupos de estudio.
- ❖ Determinar los niveles de expresión de NRF2 y su inmunolocalización en las retinas estudiadas.
- ❖ Asociar la actividad de EGCG con los niveles de expresión de Hemoxigenasa y NF-KB en retinas dañadas.

V.- METODOLOGIA

- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN Y TIPO DE ESTUDIO.

Se trató de un estudio experimental pre-clínico con una medición transversal y con direccionalidad prolectiva .

- DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN.

El trabajo se realizó en el laboratorio 5 de la división de investigación y en el bioterio (Anexo 1) del Hospital Juárez de México desde el 01 de abril al 31 de junio de 2016

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

realizando la metodología establecida, recopilación de muestra, procedimientos experimentales y análisis de resultados.

Además, se consideraron los siguientes criterios para el desarrollo del proyecto:

- Criterios de inclusión
 - ❖ Conejos machos de la raza Nueva Zelanda (Anexo 2) con un peso de 2.5 a 3.0 Kg sin aparente traumas oculares.

- Criterios de eliminación
 - ❖ Conejos con trauma ocular pre-quirúrgico.
 - ❖ Conejos con trauma en cristalino durante el manejo quirúrgico.
 - ❖ Hallazgos fibróticos causados durante la maniobra o vigilancia.
 - ❖ Muerte del animal durante el estudio previo al sacrificio.

- Eventos adversos.
 - ❖ En caso de presentar efectos graves a nivel sistémico que afecte la calidad de vida (inanición, bradicardia o adinamia) los animales serán sacrificados inmediatamente.

-CONSIDERACIONES ETICAS.

Para el cuidado y manejo de los animales se siguieron la normas descritas por los estatutos de ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) y las especificaciones

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

técnicas para el cuidado de la producción y usos de animales de laboratorio por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, incluyendo las descritas en el Hospital Juárez de México. El proyecto fue evaluado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (CICUAE-FMVZ-UMAM).

Durante cada proceso quirúrgico los animales de prueba se mantuvieron anestesiados vía intramuscular con Ketamina y Xilacina (200 y 2 mg/ml respectivamente), aplicándose además por vía tópica una gota de solución de tetracaína oftálmica (5mg/ml) y durante todo el procedimiento los animales permanecieron anestesiados con zolepam (Zoletil-100; 250 mg/5ml), Al finalizar el estudio los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (0.36 mg/kg) vía intramuscular, corroborando su muerte a través del latido cardiaco, frecuencia respiratoria y estimulaciones palpebrales concluyendo con el proceso de enucleación. Los procedimientos experimentales fueron realizados en condiciones asépticas utilizando material quirúrgico estéril y de protección.

-MODELOS DE DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN RETINA.

Se usaron conejos machos Nueva Zelanda de 2.0 a 2.5 Kg con un periodo de adaptación de 7 días y 3 tres conejos por jaula acondicionados a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un ciclo de iluminación alternante de 12 horas día/noche sin restricción de agua y alimento. El daño de la retina por I/R se realizará elevando la presión intraocular (PIO) a 85 mmHg (Anexo 3) durante 60 min en el ojo derecho del conejo a través de la inserción de una aguja calibre 30G en cámara anterior, adherida a una línea de infusión de Solución Salina

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

(SS; NaCl 0.9%)⁽²⁸⁾ (Anexo 4). Inmediatamente, la reperfusión iniciará con la extracción de la aguja y a las 48, 24, 6 y 3 horas los animales serán sacrificados con una sobredosis de anestesia e inmediatamente se enuclearan ambos ojos y fijados en formalina neutra (Anexo 5).

Administración intravenosa de EGCG y grupos de estudio.

Para determinar la concentración de EGCG intravenosa con efectos neuroprotectores en la retinas I/R y observados por los cambios histológicos se utilizaron 3 conejos por grupo:

EGCG fue disuelto en solución salina estéril libre de endotoxinas y esterilizado por filtración en membrana de celulosa de 0.22 mm de diámetro. Un volumen de 5 ml fue inyectado en la vena marginal de la oreja 30 minutos durante la isquemia.

Se utilizaron 3 conejos por grupo. En el Grupos 1 incluye a los conejos con daño en retina por I/R con solución salina iv (Vehículo); en el grupo 2 al 7 se administraron 250 μ M (8 mg), 500 μ M (16 mg) y 1000 μ M (32.06 mg) por Kg de peso y el grupo 8 fue el control de simulación técnica (Sham). A las 48 horas los animales fueron sacrificados y enucleados. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de la retina y observados con Hematoxilina – Eosina (H&E).

La dosis no tóxica con menores cambios en la arquitectura de la retina fue seleccionada para estudios de la eficacia de EGCG a las 3, 6, 24 y 48 horas.

Análisis histológico e inmunolocalización

Después del sacrificio ambos ojos fueron enucleados y fijados en formalina neutra al 10%. A las 48 horas de fijación se cortaron secciones de 8-10 mm de grosor de manera antero-posterior y en sentido vertical que incluye el nervio óptico. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados en alcoholes graduales e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 3 μm de espesor y montados en laminillas electrocargadas (Micro Slide, Cristal Cruz Santa Cruz, biotechnology, Inc.). Bajo la tinción de hematoxilina-eosina (H&E), se evaluaron los cambios estructurales de la retina como infiltración de células inflamatorias y grado de necrosis.

Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de expresión e inmunolocalización de NRF2 y OH-1 (Santa Cruz Biotechnology, California, E.U.A.). Los tejidos seccionados fueron desparafinados y permeabilizados en olla de presión a 115°C por 10 minutos con amortiguador de citrato de sodio 10 μM (pH 6,0). Posteriormente fueron tratados con suero normal durante 35 min a TA, incubados a 37°C por una hora con el anticuerpo primario. La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada con el anticuerpo secundario (Donkey anti goat IgG Tritc, Goat anti rabbit IgG Tritc) acoplado con FITC (Fluorescein isothiocyanate; Santa Cruz Biotechnology, California, E.U.A.) y los núcleos se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) en el medio de montaje (Ultra Cruz Mounting Medium). Los cortes histológicos se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y las imágenes representativas fueron capturadas (ZEISS ZEN 2012). El nivel de expresión se

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

evalúo por la intensidad en pixeles usando analizador de imagen Image-Pro plus versión 6.0 (Anexo 6).

- ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos de dichos experimentos se analizaron de forma multivariada de acuerdo a la normalidad de los datos y se agruparan en medidas de tendencia central y de dispersión (media y desviación estándar). Para establecer asociación directa e indirecta de las variables estudiadas la prueba T-Student para determinar diferencias entre variables numéricas continuas.

Los grupos serán comparados buscando diferencias en base a ANOVA para mediciones no repetidas de una vía en relación a la variable dosis-respuesta. Para el variable tiempo, se utilizará ANOVA para mediciones repetidas. El valor de significancia estadístico en todos los casos será de $P < 0.05$.

- ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.

Los desechos biológicos, materiales punzo cortantes, entre otros, serán manejados y eliminados de acuerdo con la Norma NOM-087-ECOL-94, así como a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Durante el cuidado y manejo del animal se utilizará equipo de protección como batas, cubrebocas, guantes, lentes de protección. En caso de mordida o heridas causadas por el animal se administrará antibiótico de amplio

espectro que determine el médico tratante. El cuidado y manejo de los animales estará bajo la responsabilidad del encargado del bioterio.

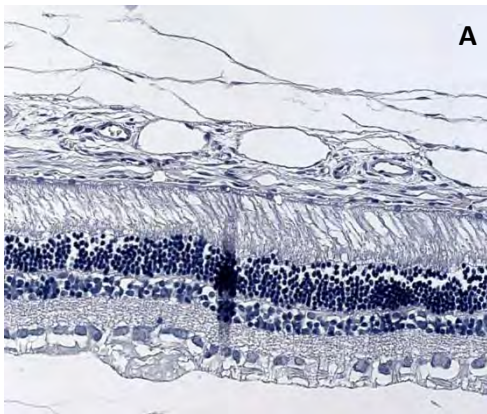
VI.- RESULTADOS

Para determinar la concentración de EGCG intravenoso con menores alteraciones histológicas en retinas dañadas por I/R, se utilizó un conejo por dosis y posterior análisis de los cortes histológicos. En la figura 1 se observan las estructuras histológicas de la retinas dañadas por I/R y tratadas con EGCG. En 1a y 1b muestra claramente las diferencias de daño entre el Sham con el grupo vehículo, respectivamente. Se observa que una sola dosis de EGCG; el tejido retiniano presenta mayor conservación de estructuras a manera de dosis dependiente de la concentración (Figura 1 C-E).

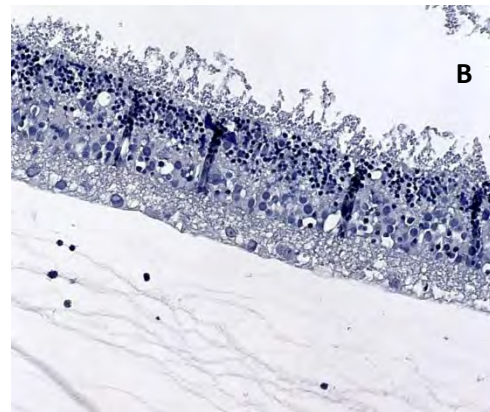
Histológicamente, las concentraciones de I/R E500 – E1000 los núcleos presentan mal distribución de cromatina, un número de células ganglionares leves, con pseudoestratificación de núcleos, así como aumento de tamaño nuclear con irregularidad en su contorno, la capa nuclear interna presenta desorganización con pérdida de cohesividad capa de conos y bastones sin alteraciones y coroides con edema leve. En concentraciones posteriores E250, el epitelio presenta mayor pérdida de núcleos de aspecto fusiforme, las células ganglionares presentan pleomorfismo, hiper cromasia, en la capa nuclear interna se aprecia mayor pérdida de cohesividad con aspecto vacuolado y de vidrio despolido, la capa nuclear externa con ligera pérdida cohesividad, conos y bastones, pseudoestratificación nuclear leve, con mayor pérdida de bastones, coroides con edema leve.

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de ischemia/reperfusión”

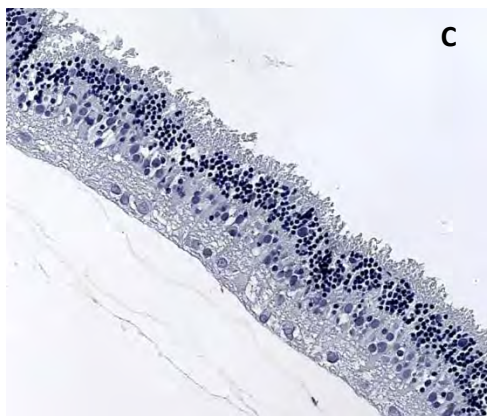
Finalmente en la muestra vehículo, las células ganglionares son escasas, perdida cohesividad, aspecto vacuolado y nucleomegalia, en capa nuclear interna escasas células visibles, escasa mitosis, no existe una relación precisa en capas nuclear intermedias, los conos y bastones se aprecian compactados marcada eosinofilia, con escasos núcleos, coroides congestiva. En base a lo anterior por resultados de cambios estructurales histológicos, la dosis con menor daño a la arquitectura retiniana fue de E-500.



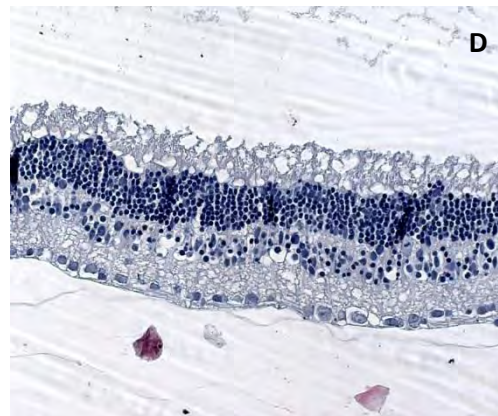
Sham



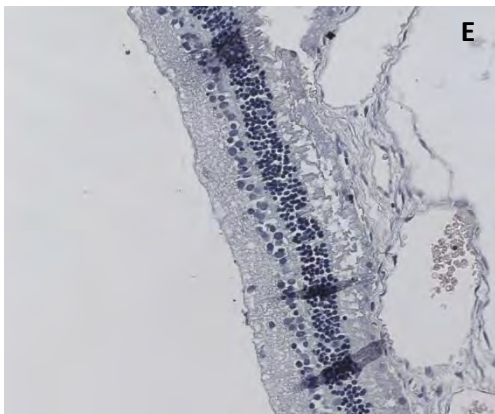
Vehículo



I/R – E250



I/R E-500



I/R E-1000

Figura 1. Concentración de EGCG intravenoso con eficacia en la protección de las células neuronales de la retina sin efectos tóxicos (Datos Histológicos). La fig. A y b muestran controles tipo Sham y vehículo donde se aprecia marcados cambios estructurales, fig. c-e, se aprecian cambios estructurales, inversamente proporcional a la dosis

Translocación y nivel de expresión de NRF2 nuclear en retina.

La inmunolocalización y el nivel de expresión de NRF2 nuclear en retina fueron determinados en base al análisis histológico de las diferentes muestras y si presentaron células positivas a internalización nuclear. En el Sham (fig. 2 a y b) una leve expresión de NRF2 nuclear fue observado comparado con el vehículo (fig. 2 c y d).

En el vehículo, la capa de células ganglionares y en la capa limitante interna la expresión de NRF2 fue observado en núcleo y en el compartimiento citoplasmático (Fig. 2 d).

El porcentaje de expresión de NRF2 fue evaluado en pixeles; Sham presento una internalización nuclear de NRF2 del 10.79%, mientras que con vehículo la expresión fue de 26.48% (Figura 3).

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de ischemia/reperfusión”

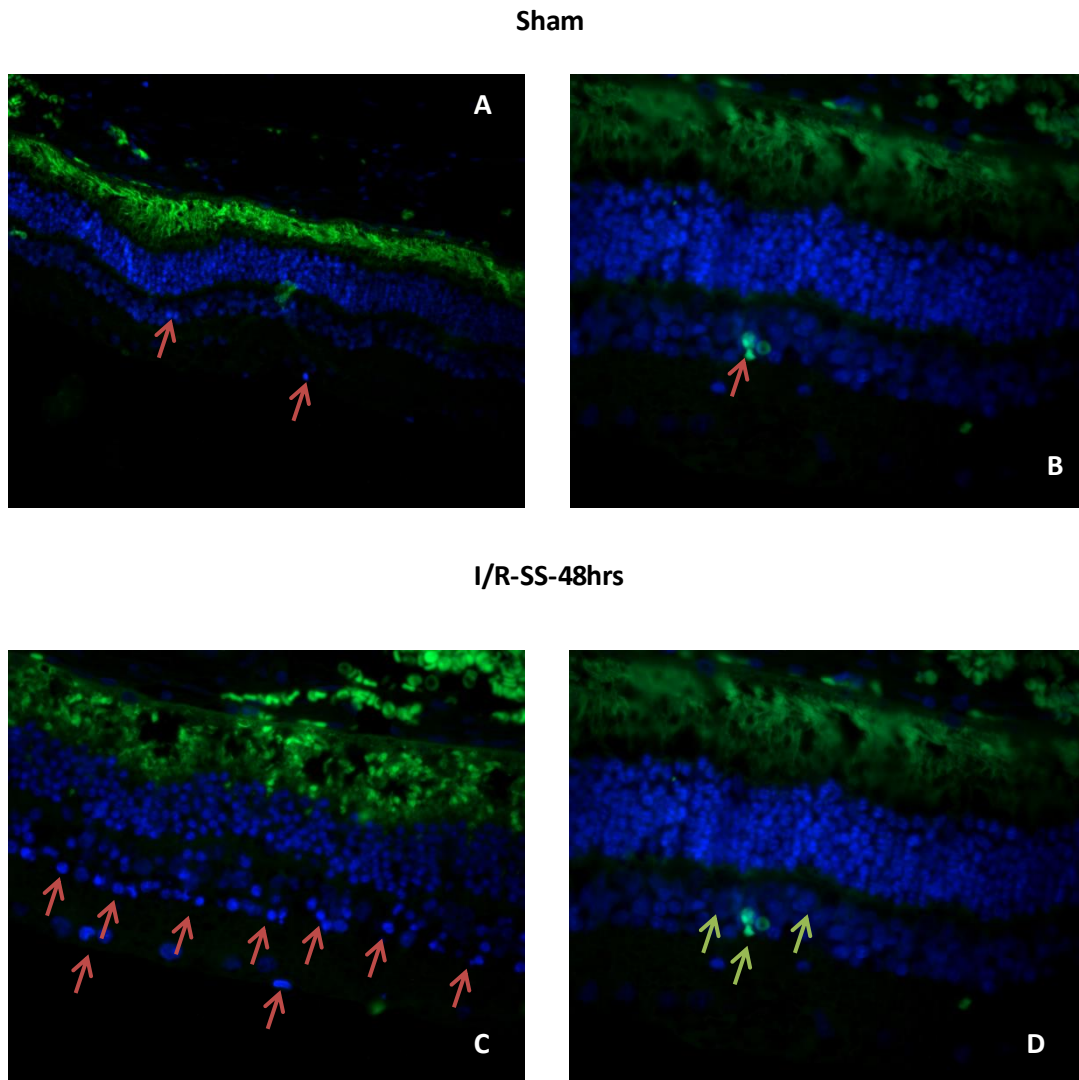


Figura 2: Translocación y nivel de expresión de NRF2 nuclear en retina en pruebas Sham vs Vehículo a las 48 hrs. A) Sham 20x, con leve expresión de translocación nuclear de NRF2 (flechas rojas) a nivel de células ganglionares y capas nuclear interna. B) Sham 40x. C) I/R de 48 hrs vehículo, donde se aprecia mayor número de translocación nuclear de NRF2. D) Vehículo 40x, expresión NRF2 citoplasmático (flecha verde).

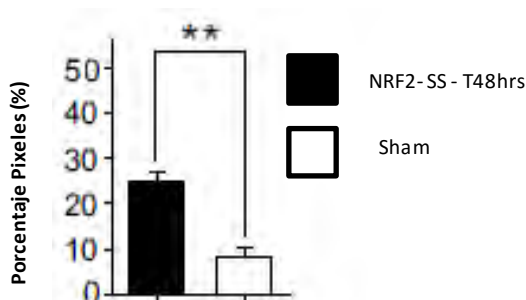


Figura 3: Porcentaje de pixeles expresión de NRF2 nuclear en retina con I/R vs SHAM

Efecto de EGCG en la internalización nuclear de NRF2 en células nucleares de retinas dañadas por I/R

Como en los cortes histológicos de retinas con H&E muestra que en el grupo I/R-E500-48 presenta menores cambios de daño comparado a concentraciones mínimas; se seleccionó la muestra I/R-E500-48 para determinar la eficacia en horas, del efecto neuroprotector de EGCG, asociado a la internalización nuclear de NRF2.

En la tabla 5B se muestran los diferentes horarios de estudio (3, 6, 24 y 48 hrs) de acuerdo a la muestra tratado y no tratado con EGCG, de acuerdo a la expresión de internalización nuclear de acuerdo a porcentaje de pixeles, la figura 5A muestra de manera gráfica la relación entre ambos grupos.

La figura 4, muestran las diferentes muestras con H&E tratados y no tratados con EGCG en los diferentes horarios; en comparación a las 3 hrs se observa mayor actividad nuclear de NRF2 en muestra tratada (Fig. 4a-b). Seguimos viendo mayor actividad nuclear en el horario de 6 hrs en muestra tratada (Fig. 4c-d). A partir de las 24 y 48 hrs restantes las muestras tratadas no se aprecian mayores diferencias entre la muestra no tratada (Fig. e-h).

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de ischemia/reperfusión”

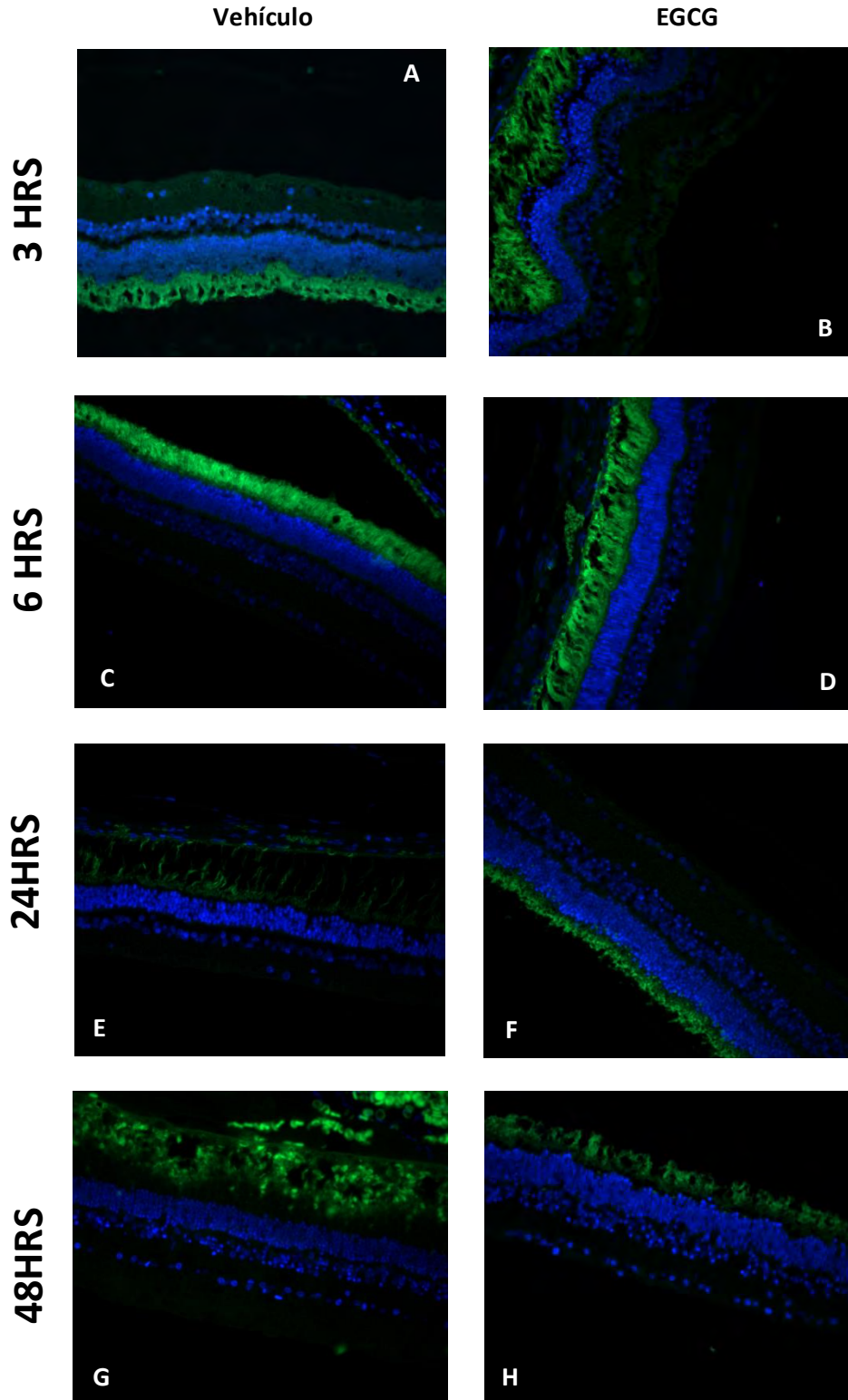
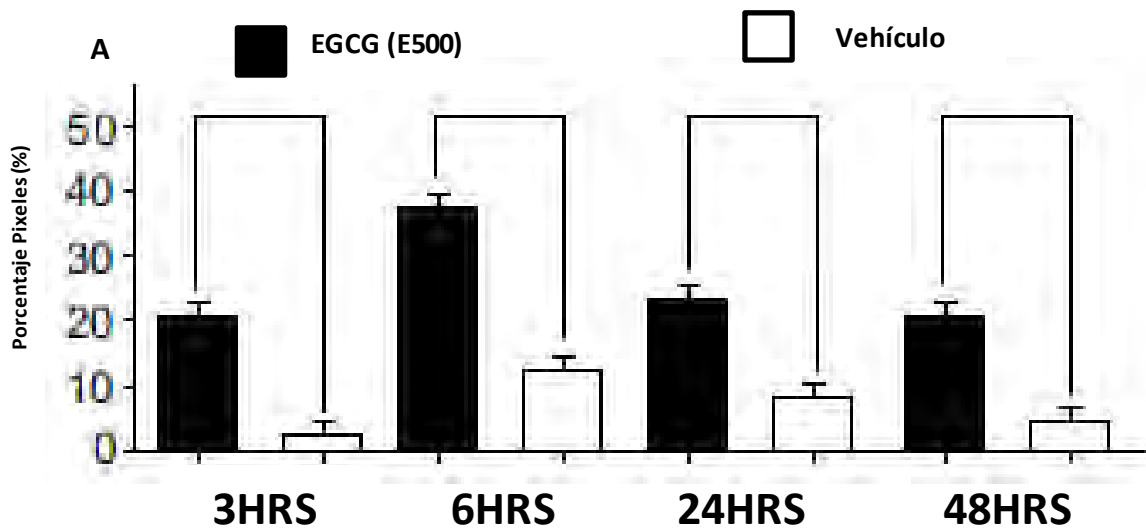


Figura 4: Expresión NRF2 nuclear en retinas dañadas por I/R tratadas y no tratadas con con EGCG a las 3, 6, 24 y 48 hrs. A y B) En comparación de ambas se aprecia mayor actividad nuclear de NRF2 en grupo tratado. C y D) continua la mayor expresión nuclear en grupo tratado. E-H) Los cambios entre el grupo tratado y no tratado de acuerdo a la actividad nuclear de NRF2 no muestran grandes diferencias.



TIEMPO	3 hrs	6 hrs	24 hrs	48 hrs
VEHICULO	2.64 %	16.89 %	26.16 %	26.48 %
EGCG (E500)	22.32 %	39.49 %	10.09 %	5.61 %

B: Tabla de expresión en porcentaje de pixeles de NRF2 retina I/R con EGCG vs Vehículo

Figura 5: Porcentaje de expresión de NRF2 nuclear en retina I/R tratadas y no tratadas con EGCG- E500 expresada en horas. A) grafica del porcentaje. B) resumen en tabla

Expresión de OH-1 en retina con I/R comparado con SHAM

Como el sistema antioxidante de fase II es regulado por el complejo NRF2-ARE, hemos estudiado en particular la expresión e inmunolocalización citoplasmática la OH-1 en las células neuronales de la retina y como las concentraciones de EGCG intravenoso afecta su expresión.

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

En la figura 6 se aprecia a la OH-1 localizada a nivel citoplasmática en capas nucleares y plexiformes intermedias, con ligera expresión en células ganglionares. Sin embargo, el análisis de las diferencias de expresión de la proteína en el vehículo fue mayor (665.81 de pixel/área) comparado con el grupo sham (312.56 pixel/área).

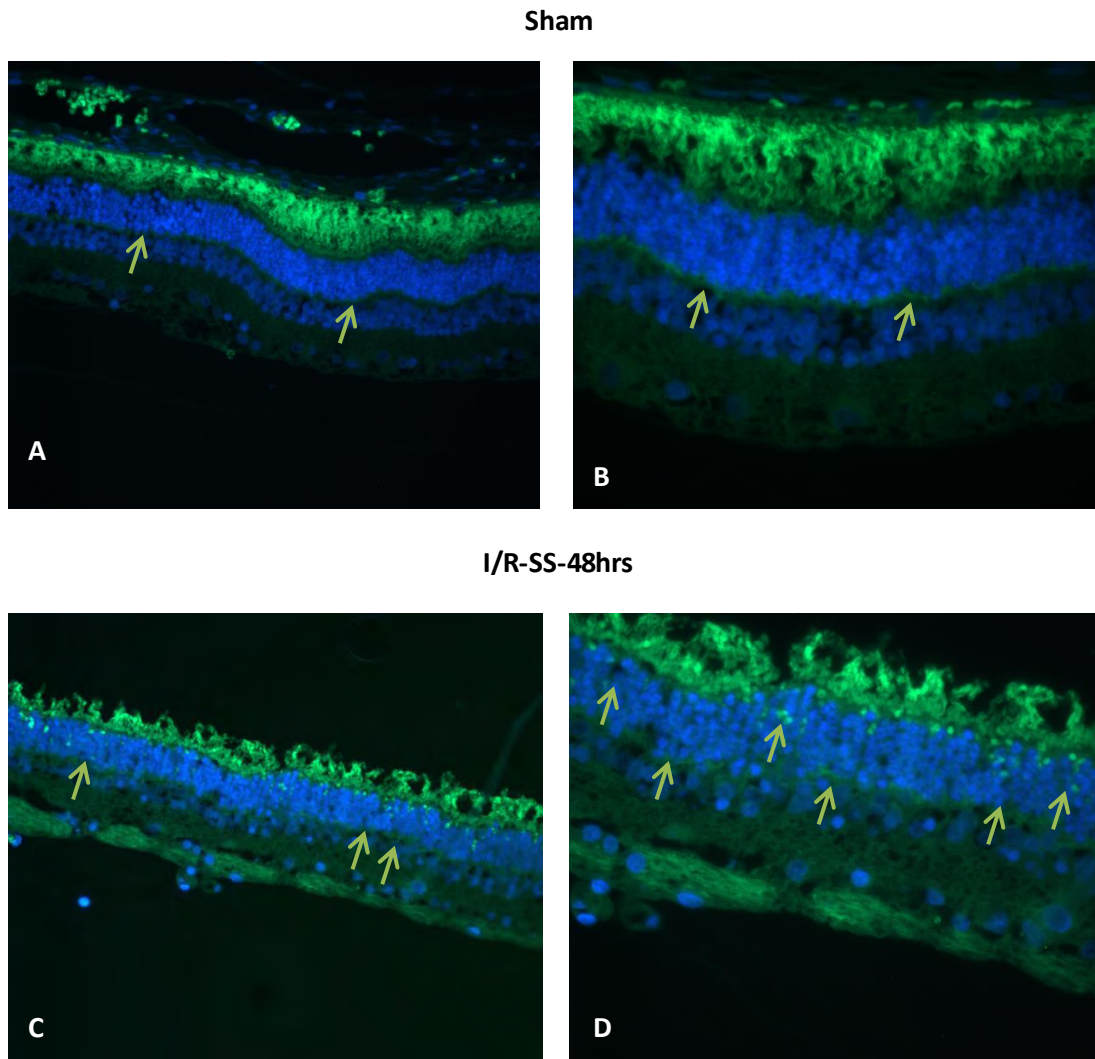


Figura 6: Nivel de expresión OH-1 citoplasmático en retina en pruebas Sham vs Vehículo a las 48 hrs. A) Sham 20x, expresión citoplasmática en capas intermedias limitada (flechas verdes) a nivel de células ganglionares, es menor la concentración. B) Sham 40x. C) I/R de 48 hrs vehículo, donde se aprecia mayor concentración de OH-1 Citoplasmático en capas intermedias. D) Vehículo 40x, expresión NRF2 citoplasmático.

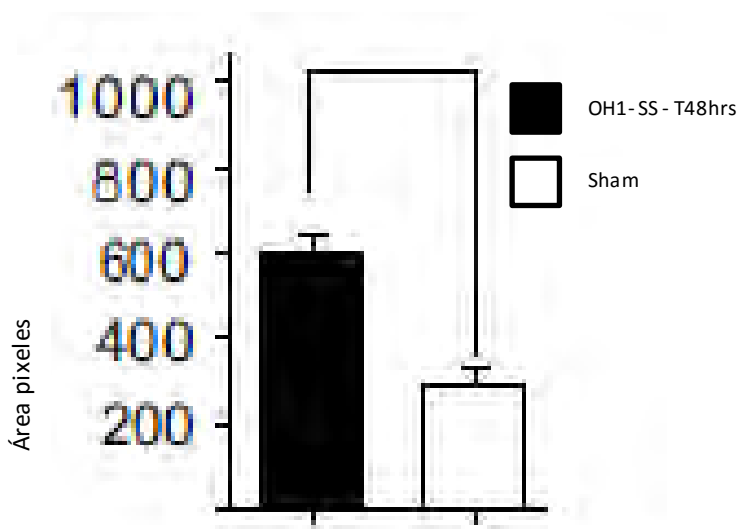


Figura 7: Porcentaje de área de expresión OH-1 en retina con I/R vs SHAM

Efecto de EGCG en la expresión de OH-1 de retinas dañadas por I/R

En la figura 8 (a-h) muestra las imágenes representativas de la inmunolocalización citoplasmática de OH-1 en retinas I/R tratada y no tratada con EGCG a las 3, 6, 24 y 48 hrs. (Aumento 20X).

En el análisis por Área/pixeles se muestra que a las 3 hrs los cambios de la actividad citoplasmática de OH-1 son similares en las retinas tratadas con EGCG (397.4) y no tratada (376.96) (Fig. 8a-b). A las 6 hrs se aprecia una mayor actividad citoplasmática de OH-1 en las tratada (813.97) comparado a las no tratada (399.77) $p < 0.05\%$, y a las 24 y 48 hrs los niveles fueron 425.19 y 465.8, respectivamente no se apreciaron diferencias con las no tratada (521.27 Y 665.81 $p > 0.05\%$). En la tabla 2 se expresan los resultados de los niveles de expresión de OH-1 en retinas tratada y no tratada con EGCG a las 3, 6, 24 y 48 hrs.

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

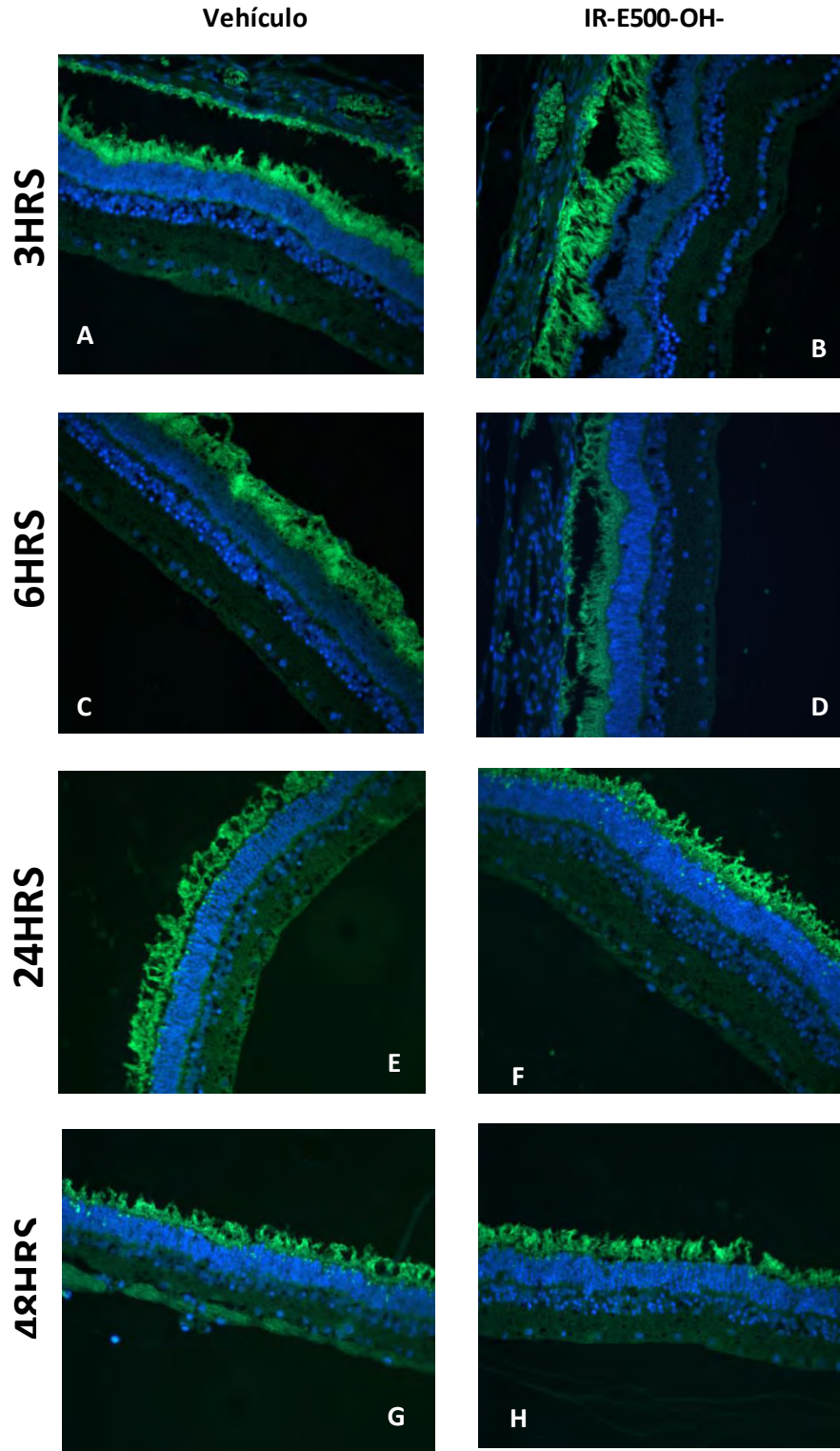


Figura 8: Expresión OH-1 citoplasmática en retinas dañadas por I/R tratadas y no tratadas con EGCG a las 3, 6, 24 y 48 hrs. A y B) En comparación de ambas se aprecian similares en mayor actividad citoplasmática. C y D) Mayor expresión citoplasmática en grupo tratado. E-H) Los cambios entre el grupo tratado y no tratado de acuerdo a la actividad citoplasmática no muestran diferencias

“Internalización nuclear de NRF2 secundario al uso de Epigallocatequina 3 galato como actividad neuroprotectora en retinas de conejos dañadas bajo el estímulo de isquemia/reperfusión”

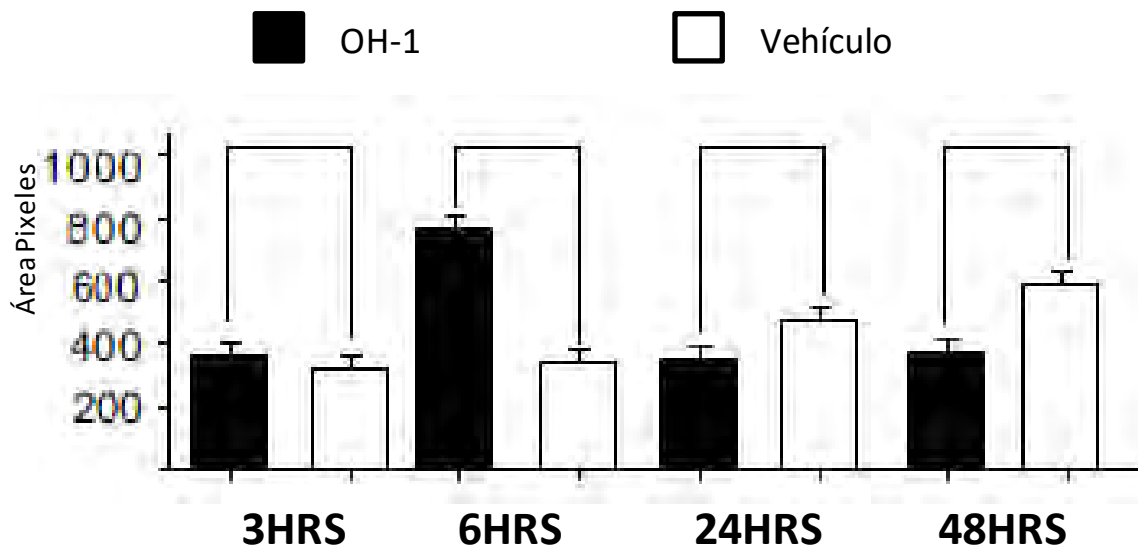


Figura 9: Expresión de OH-1 citoplasmático en retina I/R tratadas y no tratadas con EGCG- E500 expresada en horas.

TIEMPO	3 hrs	6 hrs	24 hrs	48 hrs
VEHÍCULO	376.96	399.77	521.27	665.81
OH-1	397.40	813.97	425.19	465.83

Tabla 2: Expresión de área de pixeles de OH-1 tratado y no tratado con EGCG

VII.- DISCUSION

Sin duda alguna la selección de la dosis y concentración del medicamento para una prueba terapéutica siempre ha sido un reto para el investigador. Debido a la problemática en este estudio de fase experimental se decidió iniciar con concentraciones intravenosas micromolares de EGCG que produjeran menores cambios arquitectónicos en la retina concluyendo que la dosis única a concentración de 500 μ M fue la dosis con menor efecto en el daño de la retina I/R comparado con el vehículo (IR-SS-48hrs) sugiriendo que EGCG usado como dosis única puede ejercer un efecto neuroprotector dependiente de la concentración. Resultados similares concuerdan que EGCG actúa como un agente neuroprotector en retinas dañadas usando otros modelos animales (23). Sin embargo se desconoce el efecto neuroprotector de EGCG asociado al sistema de NRF2/OH-1 en retinas I/R.

En el presente estudio, hemos demostrado que el tratamiento con EGCG intravenoso durante la lesión por I/R en retina tiene efectos protectores en un modelo de PIO en conejos, demostrado por cambios menos severos en la arquitectura histológica de la retina y comparado el grupo tratado con vehículo, incluyendo la activación de la expresión y translocación de NRF2 a núcleo y la expresión citoplasmática de OH-1 en las capas neuronales de la retina.

Aunque el mecanismo de daño en retina por I/R es complicado, la sobreproducción de los radicales libres es uno de los factores de inicio más importantes causando graves daños en las macromoléculas biológicas y conducir a la apoptosis o necrosis celular. Por lo

tanto, los antioxidantes han sido considerados en la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas al estrés oxidativo con efectos neuroprotectores (16).

El té verde (TV) es una de las bebidas más populares en todo el mundo y su consumo habitual ha sido asociado con beneficios para la salud. Los estudios epidemiológicos muestran un efecto protector del consumo de té verde habitual en los sistemas cardiovasculares y cerebrovasculares con una reducción significativa en la incidencia de accidente cerebrovascular. El TV protege la retina contra la toxicidad del glutamato a través de un mecanismo antioxidante. Esto revela que existe un mecanismo por el cual el TV protege la retina contra la neurodegeneración en enfermedades tales como la retinopatía diabética (33). La mayoría de los efectos beneficiosos del té verde son atribuidos principalmente al flavonoide polifenólico EGCG (34).

EGCG purificado ha sido el centro de investigación en los últimos años. Numerosos estudios en diferentes modelos han demostrado que el EGCG presenta efectos protectores sobre el daño intestinal por I/ R (25), lesión de la médula espinal (16), nefrotoxicidad inducida por cisplatino (20), lesión cerebral (18) y en los últimos años muestra tener un efecto protector en retina dañadas por diferentes estímulos (35-41). Aunque varios estudios demuestran que la activación de Nrf2 puede proteger contra el daño de retina I/R, (42-48), y EGCG activa el sistema NRF2/OH-1- ARE como un mecanismo de protección en otras enfermedades (49-52), no queda claro cómo EGCG protege eficazmente las capas neuronales de la retina contra el insulto de estrés oxidativo, originado por I/R y asociado a la activación de NRF2/OH-1. En este estudio, hemos

demostrado por primera vez que EGCG que de manera indirecta suprime el daño oxidativo y este efecto protector fue dependiente de la estimulación de las vías anti-oxidativo mediado Nrf2/OH-1.

VIII.- CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio han demostrado que el tratamiento de EGCG-E500 durante la ischemia en retina de conejos, significativamente aumenta la expresión y translocación Nrf2 a núcleo y su relación con expresión citoplasmática de OH-1 en las capas neuronales de la retina con la conservación de las estructuras de las capas internas del tejido observada a las 48 horas de la fase aguda de la lesión. Sin embargo la eficacia de la dosis única de EGCG-500 confirma que la actividad neuroprotectora (por expresión de NRF2 y OH-1) es realizada en las primeras 6 horas desde su administración intravenosa. Muchas de las preguntas relacionadas con los efectos antioxidantes de EGCG necesitan todavía ser aclarados y el mecanismo molecular de los efectos de EGCG en retina requiere ser estudiado más a fondo.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1) Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, et al. (2002) Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury Proc Natl Acad Sci U S A 99: 10659–10664.
- 2) Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS (2007) Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 361–367.
- 3) Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, et al. (1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. Surv Ophthalmol 43 Suppl 1: S102–S128.
- 4) Bonne C, Muller A, Villain M (1998) Free radicals in retinal ischemia. Gen Pharmacol 30: 275–280.
- 5) Muller A, Maurin L, Bonne C (1998) Free radicals and glutamate uptake in the retina. Gen Pharmacol 30: 315–318.
- 6) Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N (2000) Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3607–3614.
- 7) He M, Siow RC, Sugden D, Gao L, Cheng X, et al. (2011) Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes. Nutr Metab Cardiovasc Dis 21: 277–285.

- 8) St-Pierre J, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*.2006; 127(2):397–408.
- 9) Fainstein Mina et al. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo, *REB* 26(1): 18-25, 2007
- 10) Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*. 2004; 10:879–891.
- 11) Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug metabolism reviews*. 2006; 38:769–789.
- 12) B.Halliwell, Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutr.Rev.*70 (2012)257–265.
- 13) Nagai N, Thimmulappa RK, Cano M, Fujihara M, Izumi-Nagai K, Kong X, Sporn MB, Kensler TW, Biswal S, Handa JT. Nrf2 is a critical modulator of the innate immune response in a model of uveitis. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:300–306.
- 14) Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, Nagai N, Sporn M, Wang AL, Neufeld AH, Biswal S, Handa JT. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Res*. 2010; 50:652–664.
- 15) Himori, N., Yamamoto, K., Maruyama, K., Ryu, M., Taguchi, K., Yamamoto, M. and Nakazawa, T. (2013) Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Journal of neurochemistry*, 127, 669-680.

- 16) Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL, Heber D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1558–64?
- 17) Toolsee NA, Aruoma OI, Gunness TK, Kowlessur S, Dambala V, Murad F, Googoolye K, Daus D, Indelicato J, Rondeau P, Bourdon E, Bahorun T. Effectiveness of green tea in a randomized human cohort: relevance to diabetes and its complications. *Biomed Res Int* 2013; 2003:412379.
- 18) Yang YC, Lu FH, Wu JS, Wu CH, Chang CJ. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med* 2004; 164:1534–40.
- 19) Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr* 2003; 133:3268S–74S.
- 20) Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 2003; 133:3262S–7S.
- 21) Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7182–6.
- 22) Kuriyama S. The relation between green tea consumption and cardiovascular disease as evidenced by epidemiological studies. *J Nutr* 2008; 138:1548S–53S.
- 23) Chiu AE, Chan JL, Kern DG, Kohler S, Rehmus WE, Kimball AB. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. *Dermatol Surg* 2005;31(7 Pt 2):855–60

- 24) Take S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 1991; 25: 438–43.
- 25) Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M (2006) Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *J Biol Chem* 387:1311-1320.
- 26) Zhao B, Guo Q, Xin W. Free radical scavenging by green tea polyphenols. *Methods Enzymol* 2001; 335:217–31.
- 27) Weinreb O, Mandel S, Youdim MB. Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, R-apomorphine, green tea polyphenol (-) - epigallocatechine-3-gallate, and melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 2003;993:351–61
- 28) LevitesY, Amit T, YoudimMB, MandelS. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002; 277:30574–80.
- 29) Lin YL, Lin JK. Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 1997; 52:465–72.
- 30) Kim, I.B., Kim, K.Y., Joo, C.K., Lee, M.Y., Oh, S.J., Chung, J.W., Chun, M.H., 1998. Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Exp. Brain Res.* 121, 419e424.
- 31) Kuriyama, H., Waki, M., Nakagawa, M., Tsuda, M., 2001. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic Res.* 33, 196e202

- 32) Alexandria Lau, Wang Tian, Samantha Whitman and Donna Zhang, 2013. The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It Is Not. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* Volume 18, Number 1.
- 33) Silva KC, Rosales MA, Hamasaki DE, Saito KC, Faria AM, Ribeiro PA, Faria JB, Faria JM. Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Feb 15;54(2):1325-36)
- 34) Han jie, Miaomiao Wang, Xu Jing, Huanying Shi, Manru Ren, Haiyan Lou. Epigallocatechin Gallate Protects Against Cerebral Ischemia-Induced Oxidative Stress via Nrf2/ARE Signaling. *Neurochem Res.* DOI 10.1007/s11064-014-1311-5.
- 35) Yang Y, Qin YJ, Yip YW, Chan KP, Chu KO, Chu WK, Ng TK, Pang CP, Chan SO. Green tea catechins are potent anti-oxidants that ameliorate sodium iodate-induced retinal degeneration in rats. *Sci Rep.* 2016 Jul 7; 6:29546.
- 36) Shen C, Chen L, Jiang L, Lai TY. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of chronic glaucoma. *Neurosci Lett.* 2015 Jul 23; 600:132-6.
- 37) Chu KO, Chan KP, Yang YP, Qin YJ, Li WY, Chan SO, Wang CC, Pang CP. Effects of EGCG content in green tea extract on pharmacokinetics, oxidative status and expression of inflammatory and apoptotic genes in the rat ocular tissues. *J Nutr Biochem.* 2015 Nov; 26(11):1357-67.
- 38) CIA D, Vergnaud-Gauduchon J, Jacquemot N, and Doly M. Epigallocatechin gallate (EGCG) prevents H₂O₂-induced oxidative stress in primary rat retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.* 2014 Sep; 39(9):944-52.

- 39) Chen F, Jiang L, Shen C, Wan H, Xu L, Wang N, Jonas JB. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the adult rat retina. *Acta Ophthalmol.* 2012 Dec; 90(8):e609-15.
- 40) Xie J, Jiang L, Zhang T, Jin Y, Yang D, Chen F. Neuroprotective effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in optic nerve crush model in rats. *Neurosci Lett.* 2010 Jul 19; 479(1):26-30.
- 41) Peng PH, Chiou LF, Chao HM, Lin S, Chen CF, Liu JH, Ko ML. Effects of epigallocatechin-3-gallate on rat retinal ganglion cells after optic nerve axotomy. *Exp Eye Res.* 2010 Apr; 90(4):528-34.
- 42) Wei Y, Gong J, Xu Z, Thimmulappa RK, Mitchell KL, Welsbie DS, Biswal S, Duh EJ. Nrf2 in ischemic neurons promotes retinal vascular regeneration through regulation of semaphorin 6A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 15; 112(50):E6927-36.
- 43) Thimmulappa RK, Sporn MB, Biswal S, Welsbie DS, Duh EJ. Neuroprotective role of Nrf2 for retinal ganglion cells in ischemia-reperfusion. *J Neurochem.* 2015 Apr; 133(2):233-41.
- 44) Pan H, He M, Liu R, Brecha NC, Yu AC, and Pu M. Sulforaphane protect rodent retinas against ischemia-reperfusion injury through the activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway. *PLoS One.* 2014 Dec 3; 9(12):e114186.
- 45) Wei Y, Gong J, Yoshida T, Eberhart CG, Xu Z, Kombairaju P, Sporn MB, Handa JT, Duh EJ. Nrf2 has a protective role against neuronal and capillary degeneration in retinal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jul 1; 51(1):216-24.

- 46) Chen L, Wang L, Zhang X, Cui L, Xing Y, Dong L, Liu Z, Li Y, Zhang X, Wang C, Bai X, Zhang J, Zhang L, Zhao X. The protection by octreotide against experimental ischemic stroke: up-regulated transcription factor Nrf2, HO-1 and down-regulated NF- κ B expression. *Brain Res.* 2012 Sep 26; 1475:80-7.
- 47) He M, Pan H, Chang RC, So KF, Brecha NC, Pu M. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. *PLoS One.* 2014 Jan 6; 9(1):e84800.
- 48) Zhang X, Jizhang Y, Xu X, Kwiecien TD, Li N, Zhang Y, Ji X, Ren C, Ding Y. Protective effects of remote ischemic conditioning against ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *Vis Neurosci.* 2014 May; 31(3):245-52.
- 49) Wang Y, Wang B, Du F, Su X, Sun G, Zhou G, Bian X, Liu N. Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in Obstructive Nephropathy via NF- κ B and Nrf2/HO-1 Signalling Pathway Regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Sep; 117(3):164-72.
- 50) Wang Y, Liu N, Su X, Zhou G, Sun G, Du F, Bian X, Wang B. Epigallocatechin-3-gallate attenuates transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition via Nrf2 regulation in renal tubular epithelial cells. *Biomed Pharmacother.* 2015 Mar;70:260-7.
- 51) Ye T, Zhen J, Du Y, Zhou JK, Peng A, Vaziri ND, Mohan C, Xu Y, Zhou XJ. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate restores Nrf2 activity and ameliorates crescentic glomerulonephritis. *PLoS One.* 2015 Mar 18;10(3):e0119543.

- 52) Epigallocatechin gallate attenuates amyloid β -induced inflammation and neurotoxicity in EOC 13.31 microglia. *Eur J Pharmacol.* 2016 Jan 5;770:16-24.
- 53) Yang GZ, Wang ZJ, Bai F, Qin XJ, Cao J, Lv JY, and Zhang MS. Epigallocatechin-3-gallate protects HUVECs from PM2.5-induced oxidative stress injury by activating critical antioxidant pathways. *Molecules.* 2015 Apr 14;20(4):6626-39.
- 54) Brener O, Dunkelmann T, Gremer L, van Groen T, Mirecka EA, Kadish I, Willuweit A, Kutzsche J, Jürgens D, Rudolph S, Tusche M, Bongen P, Pietruszka J, Oesterhelt F, Langen KJ, Demuth HU, Janssen A, Hoyer W, Funke SA, Nagel-Steger L, Willbold D. QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic A β oligomers. *Sci Rep.* 2015 Sep 23;5:13222
- 55) Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 2007 Jul 26;81(7):519-33. Epub 2007 Jun 28. Review.
- 56) Baker GR, Lowe RF, Southwell. Comparison of oil recovered from tea tree leaf by ethanol extraction and steam distillation. *J Agric Food Chem.* 2000 Sep;48(9):40413
- 57) D'Alessandro T, Prasain J, Benton MR, Botting N, Moore R, Darley-Usmar V, Patel R, Barnes S. Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils. *J Nutr.* 2003 Nov;133(11 Suppl1):3773S-3777S
- 58) Yang CS, Hong J. Prevention of chronic diseases by tea: possible mechanisms and human relevance. *Annu Rev Nutr.* 2013;33:161-81.

X.- ANEXOS



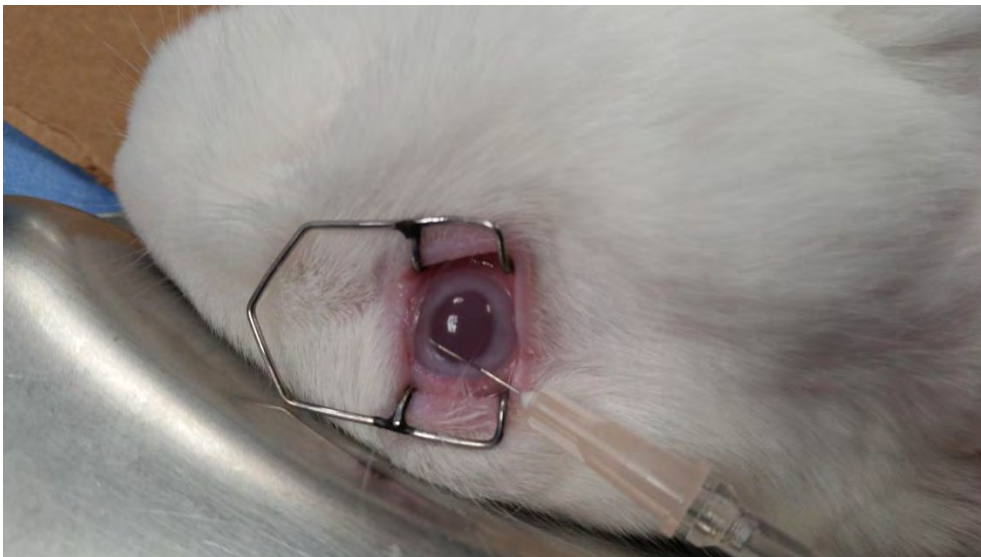
Anexo 1. Bioterio



Anexo 2.
Conejos Machos
Nueva Zelanda



Anexo 3. Medición PIO con tonometría Schiotz



Anexo 4. Aumento de PIO a través de aguja con solución salina en cámara anterior



Anexo 5. Enucleación globo ocular conejo



Anexo 6. IpWin32