



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

### TRABAJO FINAL DE GRADO

---

# POTENCIALES BENEFICIOS DE LA QUERCETINA EN LA SALUD OCULAR

**ANA RUS COPADO**

**DIRECTOR/A:** MARGARITA MORILLO CAZORLA  
**CODIRECTOR:** PERE GARRIGA SOLÉ

DEPARTAMENTO DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

JUNIO 2019



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

La Sra. MARGARITA MORILLO CAZORLA, como Directora del TFG y el Sr. PERE GARRIGA SOLÉ como Codirector del TFG.

### CERTIFICAN

Que la Sra. ANA RUS COPADO, ha realizado bajo su supervisión el trabajo, *Potenciales Beneficios de la Quercetina en la Salud Ocular* que se recoge en esta memoria para optar al título de grado en Óptica y Optometría.

Y para que conste, firmamos este certificado.

Sra. Margarita Morillo Cazorla  
Tutora/Directora del trabajo

Sr. Pere Garriga Solé  
Tutora/Directora del trabajo



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# POTENCIALES BENEFICIOS DE LA QUERCETINA EN LA SALUD OCULAR

### RESUM

La Quercetina (Q) és un flavonoide present en fruites i vegetals, així com en el te, cafè, cacau i vi negre. La ingesta de Q en la dieta s'ha relacionat amb efectes beneficiosos en la salut com ara la protecció davant malalties cardiovasculars, menor incidència en l'aparició de determinats tipus de càncer, menor incidència d'asma i de malaltia pulmonar obstructiva crònica.

Les propietats beneficioses de la Q es relacionen estretament amb la seva estructura química, que li confereix propietats antioxidants. Actua com a protector enfront de les espècies reactives d'oxigen, mitjançant la neutralització de radicals lliures com anions superòxid, òxid nítric i peroxinitrits entre d'altres. L'efecte antioxidant també podria ser degut a la seva capacitat per inhibir enzims com la xantina oxidasa, lipooxigenasa i NADPH oxidasa, impeding la mort cel·lular. A més pot incrementar la producció d'antioxidants endògens.

En aquest treball analitzarem i discutirem alguns estudis que s'han dut a terme sobre l'administració de la Q en la prevenció de la salut visual.

Stefek (2011) revisa el paper dels flavonoides en la prevenció de les cataractes diabètiques. Kalt W. et al (2010) discuteixen el paper dels compostos polifenòlics en la salut de l'ull. Recents estudis *in vitro* demostren que les antocianines i altres flavonoides interactuen directament amb la rodopsina i modulen la funció d'aquest pigment visual. Altres estudis mostren que els flavonoides protegeixen una varietat de cèl·lules retinianes de la mort cel·lular induïda per estrès oxidatiu.

La Q disminueix la inflamació en cultius de teixit orbital sencer, es creu que actua com un antioxidant que protegeix l'epiteli pigmentari de la retina (RPE) danyat per l'estrès oxidatiu. S'ha suggerit que els polifenols vegetals són fàrmacs prometedors per tractar el càncer i les malalties de la retina.



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# POTENCIALES BENEFICIOS DE LA QUERCETINA EN LA SALUD OCULAR

### RESUMEN

La Quercetina (Q) es un flavonoide presente en frutas y vegetales, así como en el té, café, cacao y vino tinto. La ingesta de Q en la dieta se ha relacionado con efectos beneficiosos en la salud, podemos nombrar entre una multitud, la protección frente a enfermedades cardiovasculares, menor incidencia en la aparición de determinados tipos de cáncer, menor incidencia de asma y de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Las propiedades beneficiosas de la Q se relacionan estrechamente con su estructura química, que le confiere propiedades antioxidantes. Actúa como protector frente a las especies reactivas de oxígeno mediante la neutralización de radicales libres. El efecto antioxidante también podría deberse a su capacidad para inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular. Además puede incrementar la producción de antioxidantes endógenos (Vicente-Vicente et al 2013).

En este trabajo analizaremos y discutiremos algunos estudios que se han llevado a cabo sobre la administración de la Q en la prevención de la salud visual.

Stefek (2011) revisa el papel de los flavonoides en la prevención de las cataratas diabéticas. Kalt W. et al (2010) discuten el papel de los compuestos polifenólicos en la salud del ojo. Recientes estudios *in vitro* demuestran que las antocianinas y otros flavonoides interactúan directamente con la rodopsina y modulan la función de este pigmento visual. Otros estudios muestran que los flavonoides protegen una variedad de células retinianas de la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

La Q disminuye la inflamación en cultivos de tejido orbital entero, se cree que actúa como un antioxidante que protege el epitelio pigmentario de la retina (RPE) dañado por el estrés oxidativo. Se ha sugerido que los polifenoles vegetales son fármacos prometedores para tratar el cáncer y las enfermedades de la retina.



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# POTENCIALES BENEFICIOS DE LA QUERCETINA EN LA SALUD OCULAR

### ABSTRACT

Quercetin (Q) is a flavonoid present in fruits and vegetables, as well as tea, coffee, cocoa and red wine. The ingestion of Q in the diet has been related to beneficial health effects such as protection against cardiovascular diseases, lower incidence in the appearance of certain types of cancer, lower incidence of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

The beneficial properties of Q are closely related to its chemical structure, which gives it antioxidant properties. It acts as a protector against reactive oxygen species, through the neutralization of free radicals such as superoxide anions, nitric oxide and peroxynitrites, among others. The antioxidant effect could also be due to its ability to inhibit enzymes such as xanthine oxidase, lipoxygenase and NADPH oxidase, preventing cell death. It can also increase the production of endogenous antioxidants.

In this paper we will analyze and discuss some studies that have been carried out on the administration of Q in the prevention of visual health.

Stefek (2011) reviews the role of flavonoids in the prevention of diabetic cataracts. Kalt W. et al (2010) discuss the role of polyphenolic compounds in eye health. Recent *in vitro* studies show that anthocyanins and other flavonoids interact directly with rhodopsin and modulate the function of this visual pigment. Other studies show that flavonoids protect a variety of retinal cells from cell death induced by oxidative stress.

Q decreases inflammation in whole orbital tissue cultures, and it is believed to act as an antioxidant that protects the retinal pigment epithelium (RPE) damaged by oxidative stress. It has been suggested that plant polyphenols are promising drugs to treat cancer and diseases of the retina.



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# POTENTIAL BENEFITS OF QUERCETIN IN OCULAR HEALTH

### SUMMARY

Flavonoids are a group of bioactive compounds that are widely found in foods of plant origin, which are classified into subgroups according to their chemical structure: flavanones, flavones, flavonols, flavan-3-ols, anthocyanins and isoflavones. Its actions at the molecular level include antioxidant capacity on cultured cells.

Studies indicate that flavonoids may play a beneficial role in disease prevention.

It has been suggested that plant polyphenols (bioflavonoids) represent promising drugs to treat cancer and diseases of the retina. The researchers compared the effects of various bioflavonoids (epigallocatechin-3-gallate [EGCG], luteolin, apigenin, myricetin, quercetin (Q), and cyanidin) on the physiological properties and viability of pigmented epithelial cells of the cultured human retina (RPE).

The structure of the quaternary protein depends on the adequate folding of the newly synthesized polypeptides and the adequate protection against environmental and physiopathological stress. A possible protective mechanism suggested is the response to thermal shock, which involves the transcriptional activation of a small set of specific genes and a subsequent synthesis of the "heat shock proteins" (Hsps).

Recent *in vitro* studies show that anthocyanins and other flavonoids interact directly with rhodopsin and modulate the function of the visual pigment. Additional *in vitro* studies show that flavonoids protect a variety of retinal cell types from cell death induced by oxidative stress, an important neuroprotective property because the retina has the highest metabolic rate of all tissues and is particularly vulnerable to oxidative damage .

Oxidative stress is an initiating factor in the development of cataracts that start at maturity. Diet has a significant impact on the development of cataracts, and the individual dietary components responsible for the protective effect include flavonoids, of which Q is one of the most important.



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

# POTENTIAL BENEFITS OF QUERCETIN IN OCULAR HEALTH

Q is a natural substance found in abundance in grapes, red wine and other food products.

The purpose of this study was to investigate the effects and behaviors of Q on visual health. Among the different effects of Q we find:

### 1. ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF Q IN A COMPLETE ORBITAL TISSUE CULTURE OF GRAVES ORBITOPATHY.

The authors previously reported that Q significantly inhibits interleukin (IL)-1 $\beta$ -induced increases in proinflammatory cytokines in the cultured primary orbital fibroblasts of Graves' orbitopathy (GO). This study investigated the inhibitory effect of Q on inflammation in the entire orbital tissue cultured.

### 2. EFFECT OF Q ON THE FORMATION OF COROIDEA NEOVASCULARIZATION (VNC) IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION (AMD).

Age-related macular degeneration (AMD) as a pathological entity is "dry" in the early stage and is composed of two main components in the late stage: atrophic AMD and exudative AMD. Q acts as an antioxidant to protect the retinal pigment epithelial cells (RPE) damaged by oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effect of Q on the formation of VNC in AMD.

### 3. EFFECTS OF VEGETABLE POLYPHENOLS, EPIGALLOCATEQUINE-3-GALLATE, LUTEOLINE, APIGENIN, MYRICETIN, Q AND CYANIDINE IN PRIMARY CULTURES OF RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS OF HUMAN RETINA.

It has been suggested that plant polyphenols (bioflavonoids) represent promising drugs to treat cancer and diseases of the retina. We compared the effects of various bioflavonoids (epigallocatechin-3-gallate [EGCG], luteolin, apigenin, myricetin, Q, and cyanidin) on the physiological properties and viability of pigmented epithelial cells of the cultured human retina (RPE).



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

### POTENTIAL BENEFITS OF QUERCETIN IN OCULAR HEALTH

#### 4. EXPRESSION OF HSP70 AND HSP27 IN EPITHELIAL LENS CELLS IN EYES AS A RESPONSE TO Q.

The structure of the quaternary protein depends on the adequate folding of the newly synthesized polypeptides and the adequate protection against environmental and physiopathological stress. A possible protective mechanism suggested is the response to thermal shock, which involves the transcriptional activation of a small set of specific genes and a subsequent synthesis of the "heat shock proteins" (Hsps).

#### 5. Q INHIBITS CHOROIDAL AND RETINAL ANGIOGENESIS *IN VITRO*.

Q is a natural substance found in abundance in grapes, red wine and other food products. In this study, the effect of Q on choroidal and retinal angiogenesis *in vitro*, using the rhesus choroid-retinal endothelial cell line (RF / 6A), was studied.

#### 6. Q PROTECTS THE RETINA BY REDUCING APOPTOSIS DUE TO ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN A RAT MODEL

The objective of this study was to investigate the effect of Q on apoptotic cell death induced by ischemia-reperfusion injury (I / R) in the rat retina.

#### 7. RECENT INVESTIGATIONS ON POLYPHENOLS IN VISION AND EYE HEALTH

A long-standing but controversial bioactivity attributed to polyphenols is its beneficial effect on vision. While reports of anecdotal cases and *in vitro* research studies provide evidence of the visual benefits of berries rich in anthocyanins. Recent *in vitro* studies show that anthocyanins and other flavonoids interact directly with rhodopsin and modulate the function of the visual pigment. Additional *in vitro* studies show that flavonoids protect a variety of retinal cell types from cell death induced by oxidative stress, an important neuroprotective property because the retina has the highest metabolic rate of all tissues and is particularly vulnerable to oxidative damage .



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

### POTENTIAL BENEFITS OF QUERCETIN IN OCULAR HEALTH

#### 8. RESPONSES OF THE EPITHELIAL CELLS FROM THE HUMAN LENS TO Q AND DMSO.

Oxidative stress is an initiating factor in the development of cataracts that start at maturity. Diet has a significant impact on the development of cataracts, and the individual dietary components responsible for the protective effect include flavonoids, of which Q is one of the most important. The purpose of this study was to investigate the protective effect of quercetin and its toxicity to human lens epithelial cells (HLEC).

#### 9. Q ATENUES THE PRODUCTION OF LACTATE AND THE SECRETION OF EXTRACELLULAR MATRIX IN THE KERATOCONUS

Keratoconus (KC) is an ectatic corneal disease that leads to a thinning of the cornea and the formation of a cornea similar to a cone. Elevated lactate levels, increased oxidative stress and the formation of myofibroblasts have been previously reported. In the present study, we evaluated the role of quercetin in the secretion of collagen and the formation of myofibroblasts in KC *in vitro*.

The reported data showed that Q significantly downregulates the differentiation of myofibroblast markers and fibrotic markers, such as smooth muscle actin  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) and collagen III (Col III), both in HCFs and in HKC.

#### 10. Q MAY MODULATE THE METABOLISM OF KERATOCONUS *IN VITRO*

In a published study, evidence was presented that Q is a strong candidate to regulate the metabolic activity of both human corneal fibroblasts (HCF) and human keratoconus (HKC) *in vitro*. The metabolomics based on directed mass spectrometry performed in HCF and HKC with and without treatment with Q allowed to identify variations in the flow of metabolites. In general, this study revealed a new therapeutic potential application of Q on the metabolism of corneal stromal cells in healthy and diseased states.

#### 11. Q ATENUES THE PRODUCTION OF LACTATE AND THE SECRETION OF EXTRACELLULAR MATRIX IN THE KERATOCONUS.

The purpose of this study was to evaluate the effect of Q on human keratoconus (HKC) using a 3D model *in vitro*. In addition, the effects of Q on cell metabolism and fibrosis was examined using a variety of techniques to confirm the findings.



## GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

### POTENTIAL BENEFITS OF QUERCETIN IN OCULAR HEALTH

The results showed that Q significantly reduces the secretion of collagen and the expression of pro-fibrotic molecules through the signaling pathway of TGF- $\beta$ . In general, Q is proposed as a novel therapeutic potential to reduce scarring and attenuate the regulatory signals of oxidative stress involved in the pathophysiology of KC.

#### 12. PROTECTIVE EFFECT OF Q AND CHLOROGENIC ACID, TWO POLIFENOLS PRESENT IN VARIETIES OF EDIBLE PLANTS, ON THE DEGENERATION OF THE RETINA INDUCED BY VISIBLE LIGHT *IN VIVO*.

Q and chlorogenic acid effectively suppressed levels of oxidative stress markers increased by exposure to light and significantly increased levels of heme-oxygenase-1 in the retina. Q significantly inhibited the expression of nuclear factor kappa B. In addition, changes induced by photooxidative stress in the expression levels of apoptotic proteins and angiogenesis factors were regulated by Q and chlorogenic acid. Histological analysis revealed that the thickness of the outer nuclear layer was maintained by Q, but not by chlorogenic acid. The results suggest that Q and chlorogenic acid play an important role in relieving the degeneration of the retina induced by light.

#### 13. Q POTENTIAL FOR DRY EYE DISEASES

The elucidation of the association between the antioxidant effects of Q and the secretion of tears is crucial to prevent and/or treat dry eye disease, as it is assumed to be increasingly frequent, as well as lifestyle diseases.

#### 14. THE EFFECTS ON THE DIABETIC CATARACT OF Q ARE MEASURED BY THE INHIBITION OF OXIDATIVE STRESS AND THE ROUTE OF THE POLYPHENOL.

The mechanism that dictates this interesting dexterity of Q could be attributed to its inhibitory strength of aldose reductase (AR), its potential for anti-lipid peroxidation and its anti-activity advanced glycosylation (anti-AGE).



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar tengo que agradecer a mis tutores de este trabajo, Margarita y Pere por la dedicación y supervisión durante el transcurso del trabajo, y también agradecer su apoyo.

A todos los Compañeros de universidad especialmente a Alba y a Raquel ya que me han dado ánimos y apoyo en todo momento.

A amigos que han soportado mis despistes y olvidos, gracias por el aprecio.

Y por último y no menos importante, a mi familia, marido, padres, hermanas e hijo, que han estado en todo momento a mi lado, y por el apoyo incondicional en los momentos de estrés.

Muchísimas gracias a todos.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AGE Glicosilación avanzada

AR Aldosa reductasa

CA Clorogénico

DC Catarata diabética

DMAE Degeneración macular relacionada con la edad

ERO Especies reactivas del oxígeno

FA Angiografía con fluoresceína

GbE Ginkgo biloba

GO Grasa orbital

GSH Glutación reducido

HCF Fibroblastos corneales humanos

HKC Células del Queratocono Humano

HLEC Células epiteliales de la lente humana

KC Queratocono

MAO Mono Amino Oxidasa

MDA Malondialdehído

MEC Matriz Extracelular

Q Quercetina

Rho Rodopsina

RP Retinitis Pigmentosa

RPE Epitelio pigmentario retinal

SB Base de Schiff

STZ Inducida por estreptozotocina

TNF $\alpha$  Factor de necrosis tumoral alfa

VNC Neovascularización coroidea



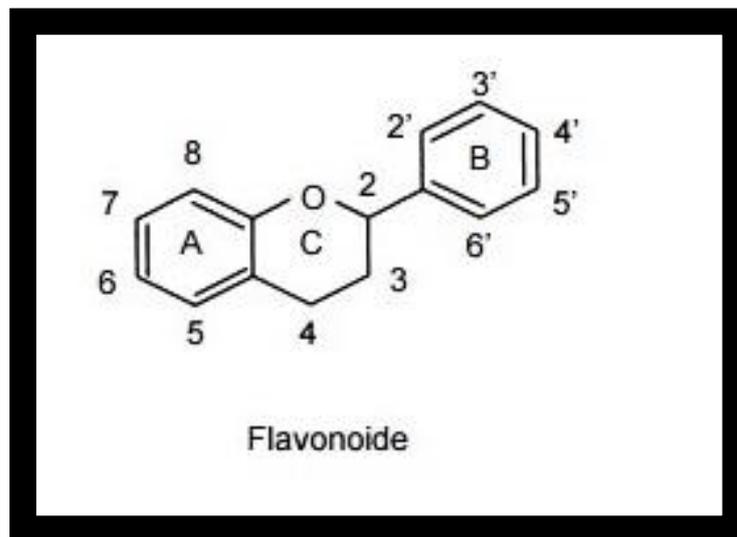
## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES .....	16
2.1. Estudios <i>in vitro</i> .....	16
2.2. Estudios <i>in vivo</i> .....	22
3. RESULTADOS .....	27
3.1. La influencia de la Q en vías metabólicas.....	27
3.2. Efectos de la Q sobre células oculares.....	31
3.3. La Q y las células de tejidos oculares.....	34
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	37
BIBLIOGRAFÍA .....	43

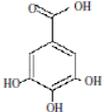
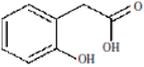
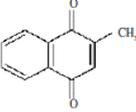
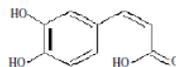
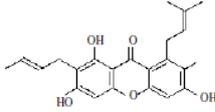
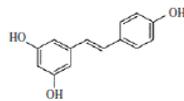
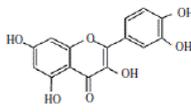
## 1. INTRODUCCIÓN

**Flavonoide** (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. La estructura base, un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados.<sup>2</sup> más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides.

Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas Charophyta, y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones.



**Figura 1.** Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración. (Fuente: Pérez Trueba, Gilberto. (2003))

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	$C_6$	 Catecol	Ácidos hidroxibenzoicos	$C_6-C_7$	 Ácido gálico
Ácidos fenilacéticos	$C_8-C_9$	 Ácido 2-hidroxi-fenilacético	Naftoquinonas	$C_9-C_{10}$	 Menadiona
Ácidos hidroxicinámicos	$C_8-C_9$	 Ácido caféico	Xantomas	$C_8-C_9-C_{10}$	 Mangostina
Estibenos	$C_8-C_9-C_{10}$	 Resveratrol	Flavonoides	$(C_8-C_9-C_{10})$	 Quercetina

**Tabla 1.** Clasificación general de los compuestos polifenólicos (Fuente: Mercado-Mercado, Gilberto (2013)).

Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, y tienen grandes actividades farmacológicas en modelos “*in vitro*” tales como: antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, antibióticas, antidiarreicas, antioxidantes, anticancerígenos.

La extracción de los flavonoides se realiza con solventes orgánicos de alta polaridad como el etanol (el acetato de etilo se usa con bastante precaución ya que por calentamiento puede reaccionar con ciertos compuestos). Posteriormente, se realizan extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente como: Hexano / Cloroformo (para flavonoides de baja polaridad). Acetato de etilo (para flavonoides de mediana polaridad). Butanol (para flavonoides de alta polaridad y, por lo general, los de mayor uso farmacológico gracias a la presencia de grupos funcionales de tipo hidroxilo y carbonilo)

La quercetina (Q), sería un ejemplo de flavonol que se encuentra presente generalmente como O - glicósidos en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras. Es el flavonoide más abundante y habitual en la dieta humana. Alimentos con niveles elevados de Q son las manzanas, las uvas, el brócoli, la cebolla, o el té. Inhibe enzimas virales pudiendo tener acción antivírica, y también inhibe la producción de prostaglandinas ejerciendo efectos antiinflamatorios. Se han realizado distintos experimentos *in vitro* sobre las propiedades biológicas de esta sustancia.

Estudios anteriores aportan datos de la aplicabilidad terapéutica de la Q en la fibromialgia por sus acciones antiinflamatorias. Como se ha demostrado, la conjunción de la acción de la Q con la de los cannabinoides podría ser una fuente de sinergia. Así mismo, la Q es una inhibidora de la enzima Mono Amino Oxidasa (MAO) que está implicada en el metabolismo de neurotransmisores y fármacos; esto es de tener en cuenta por posibles interacciones con algunos fármacos específicos.

## 2. ANTECEDENTES

Como hemos indicado en la introducción la búsqueda bibliográfica la realizaremos sobre las aplicaciones del flavonoide Q en la prevención y/o tratamiento de enfermedades oculares. Dividiremos los estudios en aquellos que utilizan metodologías *in vitro* y los que realizan experimentos *in vivo*.

### 2.1. Estudios *in vitro*.

#### - La Q modula el metabolismo del queratocono *in vitro*. Tina B McKay (2015).

Las cicatrices corneales, resultado de enfermedades, infección o lesiones, causan una pérdida significativa de visión o incluso ceguera. Hasta la fecha, el tratamiento más exitoso es el trasplante de córnea, pero no está exento de efectos secundarios. Una de las distrofias corneales que se correlacionan con la cicatrización corneal es el queratocono (KC). El desencadenante de la enfermedad aún se desconoce; sin embargo, el metabolismo celular alterado se ha relacionado con la promoción del fenotipo fibrótico y por lo tanto la cicatrización.

McKay T. et al (2015) presentan pruebas de que la Q regula la actividad metabólica tanto de los fibroblastos corneales humanos normales (HCF) como de los células del queratocono humano (HKC) *in vitro* y, por lo tanto, sería un posible agente terapéutico para atacar el metabolismo celular alterado característico de los HKC.

En su estudio determinaron el conjunto de metabolitos de las muestras para identificar variaciones de flujo. Se utilizó la espectrometría de masas dirigida. Las muestras se resuspendieron en 20 µL de agua graduada para HPLC para espectrometría de masas tándem dirigida (LC-MS / MS) y se inyectaron 5 µL y se analizaron utilizando un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple híbrido 5500 QTRAP (AB / SCIEX) acoplado a un UFLC de Prominence Sistema (Shimadzu) usando una columna Amide HILIC (Waters) y analizado con monitoreo de reacción seleccionado (SRM) con cambio de polaridad positivo / negativo.

Se realizó en HCF y HKC con y sin tratamiento con Q. En general, el estudio revela una nueva diana terapéutica de la Q sobre las células estromales de la córnea en estado sano y enfermo. La investigación se adhirió a los principios de la Declaración de Helsinki. Se cultivaron HCFs y HKCs; se recogieron HCF de pacientes normales y los HKCs se obtuvieron después del aislamiento de las córneas KC obtenidas. Se eliminaron el epitelio y el endotelio, y el tejido estromal fue cortado en trozos pequeños e incubado con suero bovino fetal al 10%. Después de 2 semanas de incubación, las células se pasaron a una placa de cultivo celular de 100 mm y se cultivaron hasta confluencia antes de la siembra en seis placas de transwell. Fueron cultivados en un 10% de medio FBS EMEM y estimulados con un derivado estable de vitamina C (0,5 ácido mM 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-L-ascórbico), durante 4 semanas con cambios de medios 3x por semana. Las construcciones 3D que contienen HCFs y HKCs fueron tratados con vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO) o quercetina 10 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para el período completo de 4 semanas. Al final de de las 4 semanas las construcciones (Células + ECM autoensamblado) se aislaron y se enviaron para la extracción de metabolitos. Los metabolitos se aislaron y almacenaron a -80 ° C, hasta su uso posterior.

### **-La Q atenúa la producción de lactato y la secreción de matriz extracelular en el queratocono.**

El queratocono (KC) es una enfermedad corneal que conduce a un adelgazamiento de la córnea y la formación de una córnea similar a un cono. Previamente se detectan niveles elevados de lactato, aumento del estrés oxidativo y formación de miofibroblastos.

En el presente estudio (T. B. McKay 2015), los autores evalúan el papel de la Q en la secreción de colágeno y la formación de miofibroblastos en KC *in vitro*.

Los fibroblastos corneales humanos (HCF) y las células de queratocono humano (HKC) se trataron con un derivado estable de vitamina C y se cultivaron durante 4 semanas, estimulando la formación de una matriz extracelular autoensamblada.

Todas las muestras se analizaron mediante transferencias de Western y espectrometría de masas en tándem dirigida. Según los autores los datos mostraron que la Q regula significativamente a la baja la diferenciación de marcadores de miofibroblastos y los marcadores fibróticos, como la actina del músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) y el colágeno III (Col III), tanto en los HCF como en los HKC. La secreción de colágeno III se redujo en un 80% tanto en los HCF como en los HKC después del tratamiento con Q. Además, la Q redujo la producción de lactato por HKCs a niveles normales de HCF. La Q disminuyó la expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 2 en HKCs, lo que sugiere un vínculo significativo con la vía de TGF- $\beta$ .

Los autores concluyen que la Q es un regulador clave de los marcadores fibróticos y el ensamblaje de la ECM mediante la modulación del metabolismo celular y la señalización de TGF- $\beta$  por lo que sugieren que la Q es un posible agente terapéutico para el tratamiento de las distrofias corneales, como el KC.

### **-Investigaciones sobre los polifenoles en la visión y la salud ocular.**

Una bioactividad controvertida atribuida a los polifenoles es su efecto beneficioso en la visión. Si bien los informes de casos anecdóticos y los estudios de investigación *in vitro* proporcionan evidencia de los beneficios visuales de las bayas ricas en antocianinas, todavía faltan pruebas clínicas rigurosas de sus beneficios.

Kalt W. et al (2010) en un estudio *in vitro* demuestran que las antocianinas y otros flavonoides interactúan directamente con la rodopsina y modulan la función del pigmento visual. Estudios adicionales *in vitro* muestran que los flavonoides protegen una variedad de tipos de células retinianas de la muerte celular inducida por estrés oxidativo, una propiedad neuroprotectora importante porque la retina tiene la tasa metabólica más alta de todos los tejidos y es particularmente vulnerable a las lesiones oxidativas.

### **-Modulación alostérica de la rodopsina visual mutada asociada con retinitis pigmentosa mediante flavonoides.**

Los flavonoides dietéticos exhiben muchas funciones biológicamente relevantes y pueden tener efectos beneficiosos en el tratamiento de afecciones patológicas. A pesar de sus conocidas



propiedades antioxidantes, existe escasa información estructural sobre la interacción de los flavonoides con los receptores de membrana.

Herrera-Hernández M. G., et al (2017) analizan el efecto de la Q sobre la conformación, estabilidad y función de la rodopsina, y el G90V, mutante asociado a la retinitis pigmentosa, una enfermedad degenerativa de la retina.

Mediante el uso de una combinación de métodos experimentales y computacionales, los autores concluyen que la Q puede actuar como un modulador alostérico de la opsina regenerada con 9-*cis* retinal, dicha unión tiene un efecto positivo sobre la estabilidad y las propiedades conformacionales del mutante G90V asociado con retinitis pigmentosa.

Los autores también sugieren que sus resultados abren nuevas posibilidades para usar Q y otros flavonoides, en combinación con retinoides específicos como 9-*cis*-retinal, para el tratamiento de la degeneración de la retina asociada con retinitis pigmentosa. Además, proponen que el uso de flavonoides como moduladores alostéricos también puede ser aplicable a otros miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G.

La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), responden a un amplio espectro de entidades químicas, que van desde protones e iones de calcio a pequeñas moléculas orgánicas (incluidos los odorantes y neurotransmisores), péptidos y glicoproteínas. Se activan como resultado de la unión de los ligandos extracelulares específicos del receptor a sus dominios transmembrana y transmitir las señales extracelulares resultante, estos receptores son ampliamente estudiados debido a su uso potencial como dianas farmacológicas en el desarrollo de fármacos.

El progreso en la cristalografía de rayos X ha aumentado el número de estructuras GPCR resueltas y reveladas, instantáneas precisas de las interacciones ligando-receptor. Algunos receptores se han cristalizado en diferentes estados funcionales en complejos con antagonistas, agonistas parciales, agonistas completos, agonistas sesgados y moduladores alostéricos proporcionando información adicional sobre los mecanismos de activación de GPCR inducida por ligando.

Los sitios de unión de GPCR han mostrado ser valiosos para cumplir con los requisitos más refinados para el diseño de medicamentos. Existe un creciente interés por los ligandos que se unen a sitios alostéricos putativos que pueden proporcionar una mayor selectividad para los subtipos de GPCR, reduciendo así los efectos secundarios no deseados.

La Rodopsina (Rho), miembro prototípico de la superfamilia de los GPCR y el primero para el que se resolvió la estructura cristalina, es la proteína principal que se encuentra en las membranas del disco del segmento externo de los bastones de las Células fotorreceptoras de la retina. Media la visión de luz tenue al convertir los fotones en señales químicas que pueden desencadenar los procesos biológicos que permiten al cerebro sentir el estímulo luminoso. Las mutaciones en Rho se asocian con retinitis pigmentosa (RP), un grupo de enfermedades visuales hereditarias que causan la degeneración de la retina. Estas mutaciones pueden provocar un plegamiento incorrecto de proteínas que conduce a una pérdida progresiva de células de bastones y conos, lo que resulta en pérdida de visión. Se han llevado a cabo estudios experimentales con mutantes de RP para

descifrar los mecanismos moleculares de la enfermedad como paso necesario para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Algunas estrategias propuestas para combatir esta afección se basan en el rescate farmacológico, en el que pequeñas moléculas conocidas como chaperonas farmacológicas se unen y estabilizan opsinas plegadas en exceso. Se han estudiado diferentes compuestos para contrarrestar los efectos de las mutaciones de Rho. Para la caracterización espectroscópica de muestras de Rho los autores utilizaron un espectrofotómetro Varian, (Cary 100 Bio, Australia). La temperatura se controló por un accesorio peltier equipado, con un soporte para cubetas con camisa de agua conectado a un baño de agua en circulación. Todos los espectros se registraron en el Rango de 250 nm a 650 nm.

La estabilidad térmica de la Rho se estudió a 48 ° C determinando los espectros UV-VIS de las muestras y evaluando la disminución de la banda de absorbancia máxima en función del tiempo. Los espectros se registraron cada 5 minutos y los tiempos de vida media se determinaron mediante ajuste de los datos experimentales a curvas exponenciales únicas.

Referente a la estabilidad química se añadió una solución de clorhidrato de hidroxilamina 1 M (ajustado a pH 7) para muestras adaptadas a la oscuridad en una cubeta espectroscópica (concentración final de 50 mM), y los espectros sucesivos se registraron cada 5 minutos para controlar la disminución de la Absorbancia a la  $\lambda_{max}$  y la formación de la oxima del retinal. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a 20 ° C. La hidroxilamina es un compuesto que se utiliza en los estudios de Rho para determinar si una mutación puede afectar la compactación estructural alrededor del entorno SB. Este reactivo puede entrar en la unión retiniana, sitio de Rho fotoactivado e hidrolizar el enlace (SB)

Para los experimentos de regeneración del cromóforo, se adicionó un exceso molar de 2,5 veces de 11CR o 9CR (solución madre) a muestras adaptadas a la oscuridad en la cubeta espectroscópica y se mezcló completamente. Inmediatamente después, la muestra se iluminó con un filtro de corte amarillo (> 495 nm) para evitar el blanqueo de la rodopsina libre, y los espectros sucesivos se registraron cada 10 min en el caso de WT y cada minuto en el caso del mutante G90V. Los experimentos se realizaron a 20 ° C en la oscuridad hasta que no se observó un aumento adicional en  $A_{max}$ , en la región visible.

Los estudios de modelización molecular, se llevaron a cabo para identificar posibles sitios de unión de Q en opsina y Rho con 11CR o 9CR enlazados. Para este propósito, las estructuras cristalográficas de opsina (entrada 3CAP), Rho-11CR (entrada 1GZM) 49, Rho-9CR (entrada 2PED) 50, y MetaII (entrada 3PXO51) se recuperaron de la proteína. Las estructuras fueron preparadas para estudios de acoplamiento (optimización de enlaces de hidrógeno, estados de protonación), utilizando la herramienta del asistente de preparación de proteínas del software Schrödinger. Antes de los estudios de acoplamiento molecular, los tres receptores se examinaron para identificar regiones energéticamente favorables para la unión prospectiva de ligandos. Se utilizó el software de reconocimiento de sitios Schrödinger, SiteMap, que identifica los sitios de enlace, adecuado para ser ocupado por grupos hidrófobos o por ligandos, donantes de enlaces de hidrógeno, aceptores o unión a metales. La estructura de Q que se utilizó en el estudio se descargó del sitio web de PubChem y se preparó para estudios de acoplamiento utilizando la herramienta LigPrep, también de Schrodinger.



## **-Efectos de los polifenoles vegetales, epigallocatequina-3-galato, luteolina, apigenina, miricetina, Q y cianidina en cultivos primarios de células epiteliales de pigmento de la retina humana.**

Rui Chen (2014) ha sugerido que los polifenoles vegetales (bioflavonoides) son fármacos prometedores para tratar el cáncer y las enfermedades de la retina. Compara los efectos de varios bioflavonoides (epigallocatechin-3-gallate [EGCG], luteolin, apigenin, myricetin, Q, y cyanidin) sobre las propiedades fisiológicas y la viabilidad de las células epiteliales pigmentadas de la retina humana (RPE).

Las células humanas de RPE se obtuvieron de varios donantes. Las células RPE se recolectaron mecánicamente, se separaron por digestión con tripsina y EDTA, y se lavaron dos veces con PBS a pH 7.2. Las células se suspendieron en medio Ham F-10 completo que contenía suero bovino fetal, GlutaMAX II y penicilina / estreptomycin, y se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos en aire. La naturaleza epitelial de las células RPE se identificó de manera rutinaria con la inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales AE1 (que reconocen la mayoría de las Q ácidas de tipo I) y AE3 (que reconocen la mayoría de las queratinas básicas de tipo II). Para probar las sustancias, los cultivos que alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia se detuvieron en el crecimiento en medio sin suero. Posteriormente, se agregaron medios que contenían suero con y sin sustancias de prueba.

La tasa de proliferación de células RPE se determinó midiendo la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) en el ADN genómico. Las células se sembraron en placas de microtitulación y se dejaron unir. Después de eso, se detuvo las células el crecimiento en medio sin suero, y posteriormente, se añadió medio que contenía suero con y sin sustancias de ensayo. La incorporación de BrdU se determinó utilizando el kit de BrdU del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de proliferación celular (ELISA). Se añadió BrdU al medio de cultivo.

La quimiotaxis se determinó con un ensayo de cámara de Boyden modificado. Se sembraron suspensiones de células RPE en filtros de poli (tereftalato de etileno), recubiertos con fibronectina gelatina, las células se unieron al filtro y formaron una monocapa semiconfluyente. Las células se trataron previamente con sustancias bloqueadoras y, posteriormente, el medio se cambió a medio sin aditivos. Después de la incubación, las inserciones se lavaron con solución salina tamponada, se fijaron con reactivo de Karnofsky y se tiñeron con hematoxilina. Las células no migradas se eliminaron de los filtros frotando suavemente con un algodón. Las células migradas se contaron y los resultados se expresaron en relación con la tasa de migración celular en ausencia de las sustancias de prueba.

La viabilidad celular se determinó mediante exclusión con Trypan Blue. Después de la tripsinización, las células se tiñeron con azul de tripano y el número de células viables (no teñidas) y muertas (teñidas) se determinó utilizando un hemocitómetro.

El ELISA de fragmentación de ADN celular (Roche) se utilizó para determinar si las células se someten a apoptosis o necrosis en ausencia y presencia de sustancias de prueba. La necrosis se determinó mediante el análisis de los fragmentos de ADN marcados con BrdU en los sobrenadantes de cultivos libres de células, y la apoptosis se determinó mediante el uso de lisados citoplásmicos de las células.

El ARN total se extrajo de las células cultivadas mediante el RNeasy Mini Kit. La calidad del ARN se analizó con electroforesis en gel de agarosa.

Después del tratamiento con ADNasa I (Roche), se sintetizó ADNc a partir de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra de RevertAid H Minus. Transcripción inversa (RT) semicuantitativa en tiempo real: la PCR se realizó con el sistema de detección de PCR en tiempo real de un solo color. Se usaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial y activación de la enzima; desnaturalización, amplificación y cuantificación. Esto fue seguido por un análisis de la curva de fusión para determinar la especificidad del producto donde la temperatura se incrementó gradualmente.

Las muestras amplificadas se analizaron con electroforesis. La expresión de ARNm se normalizó al nivel de expresión de ACTB.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, las células se cultivaron, posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se estimularon las células con sustancias de prueba. Los sobrenadantes se recogieron, y el nivel de VEGF-A165 en el medio de cultivo se determinó con ELISA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Extracción de proteínas y western blot. Se realizó un análisis de transferencia Western tanto de los medios de cultivo como de las células sembradas. La extracción de proteínas de los medios después de la estimulación con lactato y / o Q se combinó semanalmente recolectando el sobrenadante de cada pocillo. La cuantificación de bandas se realizó con densitometría.

### **-La Q inhibe la angiogénesis coroidea y retiniana *in vitro*.**

En este estudio (Yi Chen 2008), examina el efecto de la Q en la angiogénesis coroidea y retiniana *in vitro* utilizando la línea celular endotelial rhesus coroides-retina (RF / 6A).

Las células RF / 6A se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 10% de suero bovino fetal. Luego, las células se trataron con diferentes concentraciones (de 0 a 100  $\mu$ M) de Q. La proliferación celular se evaluó utilizando un colorante de bromuro de metiltiazol tetrazolio (MTT) coromogénico después de 24, 48 y 72 horas.

La migración celular después de 24 horas de incubación con Q se investigó mediante el ensayo de la herida. Tras la exposición a las diversas concentraciones de Q durante 24 horas, también se analizó la formación de tubos en matrigel por células endoteliales.

La apoptosis se midió mediante citometría de flujo utilizando anexina V-FITC y tinción con yoduro de propidio.

## 2.2. Estudios *in vivo*.

YongWang and LiangZhao (2017), estudiaron el efecto protector de la Quercetina (Q) y el ácido clorogénico (CA) (dos polifenoles ampliamente presentes en las variedades de plantas comestibles) sobre la degeneración de la retina de conejos inducida por luz visible *in vivo*.

La Q y el CA suprimieron de manera efectiva los niveles de marcadores de estrés oxidativo aumentados por la exposición a la luz y aumentaron significativamente los niveles de hemooxigenasa-1 en la retina ( $p < 0.05$ ). Los niveles de citoquinas inflamatorias, incluida la proteína quimiotáctica de monocitos 1, interleucina (IL) -8, IL-1  $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa, ciclooxigenasa 2 y óxido nítrico sintasa inducible en los tejidos de la retina, se redujeron significativamente mediante Q y CA.

Los resultados sugieren que la Q y la CA juegan un papel importante en el alivio de la degeneración de la retina.

### **-Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes.**

Pérez Trueba G. (2003) aporta evidencias sobre el doble papel que desempeñan los flavonoides como antioxidantes y como prooxidantes y también acerca de la contribución de la estructura a tales actividades.

Según el autor, si bien una dieta rica en flavonoides puede ser beneficiosa para la salud, consumos elevados de estos metabolitos pueden tener efectos nocivos debido a las diversas propiedades farmacológicas. El estudio de los radicales libres (RL) y de los antioxidantes ha cobrado un gran auge particularmente en el último decenio. Un número creciente de artículos que abordan aspectos clínicos y nutricionales ha puesto de manifiesto la importancia que está adquiriendo el empleo de antioxidantes en la dieta contenidos por ejemplo en tomate, espinacas, naranja, entre otros muchos, teniendo en cuenta que a menudo las combinaciones vitamínicas, comúnmente recomendadas en el mundo entero, no ejercen los efectos esperados o por el contrario, estos resultan dañinos. En este contexto los compuestos polifenólicos, y dentro de estos los flavonoides, ocupan un lugar destacado. Los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de sus propiedades quelantes de metales de transición y secuestradoras de RL, así como de la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas. Por otro lado, también estos compuestos pueden actuar como agentes prooxidantes, rasgo probablemente responsable de los efectos mutagénicos y genotóxicos también encontrados para algunos de estos metabolitos en diversos sistemas experimentales. Algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu(II) a Cu(I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa.

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, así como de

hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2),<sup>12</sup> al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí.

La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Existen evidencias de que la Q y la rutina inhiben la NADPH del sistema de la citocromo P-450 en microsomas hepáticos. Este efecto pudiera impedir el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos que emplean esta vía para generar RL. Otros estudios sugieren que la Q, la morina y la catequina, a concentraciones de 0,125; 0,25 y 0,5 mM respectivamente, protegen las células endoteliales de la aorta porcina frente al daño inducido por oxirradicales generados por el sistema XO/hipoxantina. La inhibición de la XO ejercida por la morina y por la Q fue significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) con respecto a la catequina. Las oxidasas CO y LO, involucradas en la cascada del ácido araquidónico, resultan inhibidas por los flavonoides en múltiples ensayos experimentales. La eficacia de la inhibición varía enormemente; así, un único flavonoide puede inhibir una enzima a bajas concentraciones, pero puede necesitar de concentraciones 100 veces superiores para inhibir otra. Por ejemplo, la silibina inhibe fuertemente la 5-LO de granulocitos humanos y de las células de kuffer humanas y de ratas, con valores de CI50 de alrededor de 15 mM determinados por la formación de los leucotrienos. Sin embargo, se necesitan concentraciones de hasta 3 y 4 veces más altas que esta para lograr la mitad de la inhibición máxima en la vía de la CO en las células endoteliales y en los granulocitos humanos. Otro ensayo efectuado con 11 flavonoides mostró que estos inhibieron tanto la CO como la LO, pero que algunos como el cirsilol, la gossypetina, la hypoletina y sus glicósidos, fueron más efectivos inhibiendo la LO. Algunos estudios también hacen referencia a la inhibición de la enzima MPO por parte de los flavonoides, neutralizando así los efectos nocivos del HOCL.

Algunos estudios indican la mutagenicidad y genotoxicidad de los flavonoides, tanto en sistemas experimentales bacterianos como de mamíferos. Debido a sus características estructurales estos metabolitos poseen bajos potenciales que les permiten reducir el  $Fe^{3+}$  y el  $Cu^{2+}$  para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de ciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes. Algunos de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu(II) a Cu(I), la generación de ERO, así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa. Aunque con menos efectividad que los que contienen un núcleo pirogalólico, los flavonoides con un grupo catecólico generan  $H_2O_2$  en disolución amortiguadora acetato pH 7,4, al donar un átomo de hidrógeno de su estructura al oxígeno ( $O_2$ ), según lo dicho anteriormente los compuestos evaluados se comportaron en el orden siguiente: miricetina, baicaleína, Q, epicatequina, catequina y fisetina. Por otra parte, la naringenina, la naringina, la hesperitina y la apigenina, por medio de sus respectivos radicales fenoxilos prooxidantes, oxidaron al NADH en el sistema peroxidasa  $H_2O_2$ . Los radicales NAD originados generaron  $H_2O_2$  en el medio. La baicalina, la Q, la morina y la miricetina, incrementaron la generación de  $OH\cdot$  a través de la reacción de Fenton, en un ensayo basado en la determinación de ácido metanesulfónico producido por la reacción entre el DMSO y este radical. Los flavonoides Q, rutina, galangina, apigenina, fisetina, miricetina y baicaleína, causaron ruptura del ADN de timo de carnero en presencia de Cu y oxígeno molecular. La Q, junto con la miricetina y la baicaleína, dieron lugar a la 8-OH-2'-desoxiguanosina, lesión

oxidativa del ADN de mayor potencial mutagénico. Un estudio más detallado, basado en un análisis de los fragmentos obtenidos del gen supresor de tumores, puso de manifiesto que el daño oxidativo al ADN inducido por la Q en presencia de Cu, transcurre a través del ataque de los residuos de timina y citosina, y que la luteolina y el kaempferol también inducen daños al ADN en presencia de este metal. Teniendo en cuenta que estos daños fueron revertidos por la batocupreína, agente quelatante de Cu, no así por los secuestradores de radicales. OH libres, ha sido sugerido que el daño al ADN es más bien inducido por el complejo oxígeno-Cu-ADN, más que por OH. Al parecer, la sustitución orto 3'-4'- dihidroxi en el anillo B resulta esencial para la formación de quelatos Cu y el OH de la posición 3 aumenta la oxidación de los flavonoides como la Q y el kaempferol en presencia de este, cosa que no ocurre con otros como la luteolina y la rutina, que carecen de este grupo. Por último, la conjugación entre los anillos A y B resulta importante también para la acción prooxidante de un flavonoide iniciada por Cu, mientras que la O-metilación de las sustituciones hidroxílicas inactiva dicha acción.

### **-Efecto antiinflamatorio de la quercetina en un cultivo de tejido orbital completo de la orbitopatía de Graves**

SookYoon et al (2012), investigaron el efecto inhibitorio de la Q sobre la inflamación en el tejido orbital entero cultivado. Los autores encontraron previamente que la Q inhibe significativamente los aumentos de las citocinas proinflamatorias en los fibroblastos orbitarios primarios cultivados de la orbitopatía de Graves (GO) inducidos por interleucina (IL) -1 $\beta$ .

Los tejidos de grasa orbital (GO) y las muestras normales se cultivaron con o sin concentraciones no tóxicas de Q. La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se usó para identificar concentraciones no tóxicas de Q. Las proteínas IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) se midieron en sobrenadantes de cultivos tisulares mediante ELISA, y los niveles de transcripción del gen se determinaron mediante PCR cuantitativa.

### **-Efecto de la Q sobre la formación de Neovascularización Coroidea (VNC) en la Degeneración Macular relacionada con la edad (DMAE)**

El desarrollo de la CNV inducida por láser se detectó mediante angiografía con fluoresceína (FA). Se utilizó la técnica de microesferas de color para determinar el flujo de sangre coroidea en ojos hipertensos de conejo. En estudios *in vitro*, las HUVEC se trataron con NaIO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NaN<sub>3</sub> para inducir células oxidativas. El efecto de la Q en diversas lesiones inducidas por oxidación en HUVEC se midió mediante el ensayo MTT. La migración de HUVEC se evaluó utilizando un ensayo de cicatrización de heridas.

(Pei Zhuang, 2011) investigan el efecto de la Q en la formación de neovascularización coroidea (VNC) en la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE).

La (DMAE) como entidad patológica es "seca" en la etapa temprana y está compuesta por dos componentes principales en la etapa tardía: la DMAE atrófica y la DMAE exudativa. La Q actúa como un antioxidante para proteger las células del (RPE) dañadas por el estrés oxidativo, pero su efecto sobre la formación de neovascularización coroidea (CNV) en la DMAE no está claro. El objetivo de este estudio fue demostrar como la Q se convirtió en una candidata para el tratamiento de la DMAE, ya que inhibió la formación de la VNC tanto *in vivo* como *in vitro* y aumento el flujo sanguíneo coroideo.

### **-Expresión de hsp70 y hsp27 en células epiteliales de lente en ojo contuso de rata, modulada por termotolerancia o quercetina.**

Ke Yao (2006), investiga la expresión dinámica de la proteína de choque térmico (Hsp) 70 y Hsp27 en células epiteliales de lentes (LEC) de ojos contundidos de rata y los efectos del choque térmico y la Q.

Los ojos se dividieron aleatoriamente en tres grupos: con contusión, tratados con choque térmico y tratados con Q. Se indujeron contusiones en los ojos dejando caer una bola de acero de 20 g desde una altura de 20 cm por 100 veces. El choque térmico se indujo elevando la temperatura corporal central a 40.5-41.5 ° C durante 8 min, 2-3 h antes de la contusión del ojo. La Q, un inhibidor de la expresión de Hsp, se administró por sonda (100 mg / kg) 2-3 h antes de la contusión del ojo. Los ojos experimentales se enuclearon a las 0, 1, 3, 6 y 24 h después de cada tratamiento de grupo para la detección de la expresión de Hsp70 y Hsp27 en LEC utilizando RT-PCR. Las secciones de lentes se examinaron mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra Hsp70.

### **-La Q protege la retina al reducir la apoptosis debida a la lesión por isquemia-reperfusión en ratas.**

Sedat Arikan (2018), investigan el efecto de la Q sobre la muerte celular apoptótica inducida por la lesión por isquemia-reperfusión (I / R) en la retina de rata.

Veinticuatro ratas se dividieron en cuatro grupos iguales: control, isquémico, con disolvente y Q. La lesión por I / R se logró elevando la presión intraocular por encima de la presión de perfusión. Las inyecciones intraperitoneales de 20 mg / kg de Q y dimetilsulfóxido (DMSO) se realizaron en los grupos de Q y disolvente, respectivamente, inmediatamente antes de la lesión I / R, y los investigadores permitieron que las retinas se reperfundieran. Cuarenta y ocho horas después de la lesión, se midieron los grosores de la capa de células ganglionares de la retina (RGCL), la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL), la capa plexiforme externa (OPL) y la capa nuclear externa (ONL) todos los grupos. Además, se evaluaron en todos los grupos los números de células [TUNEL (+)] marcadas con nick-end de la desoxinucleotidil transferasa terminal y células caspasa-3 (+) en INL y ONL.

### **-Respuestas de las células epiteliales de la lente humana a la Quercetina y al DMSO.**

Xiao-Guang Cao; Xiao-Xin Li; Yong-Zhen Bao; Nian-Zeng Xing; Yi Chen , 2007 investigan el efecto protector de la Q y su toxicidad para las células epiteliales de la lente humana (HLEC).

El estrés oxidativo es un factor iniciador en el desarrollo de cataratas en la madurez. La dieta tiene un impacto significativo en el desarrollo de cataratas, y los componentes dietéticos individuales responsables del efecto protector incluyen los flavonoides, de los cuales la Q es el más importante.

Los HLEC en cultivo se incubaron durante 48 horas con o sin (DMSO) al 1% (v / v) y con Q a concentraciones entre 0,1 y 100 µM. Las células no estimuladas sirvieron como cultivos de control. La viabilidad de los HLEC se midió mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT). La expresión génica se evaluó con la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

La apoptosis celular se examinó mediante inmunocitoquímica in situ utilizando un marcaje de níquel dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) y mediante citometría de flujo, utilizando la detección de apoptosis con anexina V-FITC.

### **-El potencial de la Q para las enfermedades del ojo seco.**

La prevención de la disminución de las funciones físicas y mentales en la población de mayor edad se ha convertido en un importante problema de política pública en el mundo. Los órganos sensoriales son particularmente vulnerables al envejecimiento, por lo que muchas de las enfermedades oculares están estrechamente relacionadas con el envejecimiento.

En el curso de varios estudios, las propiedades antioxidantes de los polifenoles han estado ganando atención médica como un factor preventivo contra el envejecimiento y / o enfermedades del estilo de vida. La Q es uno de los compuestos polifenólicos que se encuentran abundantemente en las cebollas y las manzanas.

Existe mucha evidencia disponible sobre la Q como un factor alimentario funcional, particularmente por su destacada actividad antioxidante entre los diversos compuestos polifenólicos. Para aclarar la eficacia de la actividad antioxidante de la Q en la patología atenuante de la enfermedad del ojo seco.

Se realizó un estudio en el que se usaron ratones diabéticos como modelo de producción de lágrimas disminuidas. Los ratones de 6 semanas de edad se alimentaron ad libitum con una dieta experimental con Q al 0,5% durante 3 meses. La ingesta total de alimentos, el peso corporal y el volumen de lágrimas se midieron periódicamente. Las pruebas bioquímicas de sangre y el análisis histopatológico se realizaron en la eutanasia después de 3 meses de alimentación.

### **-Los efectos de la catarata antidiabética de la GbE, la rutina y la Q están mediados por la inhibición del estrés oxidativo y la ruta del polirol.**

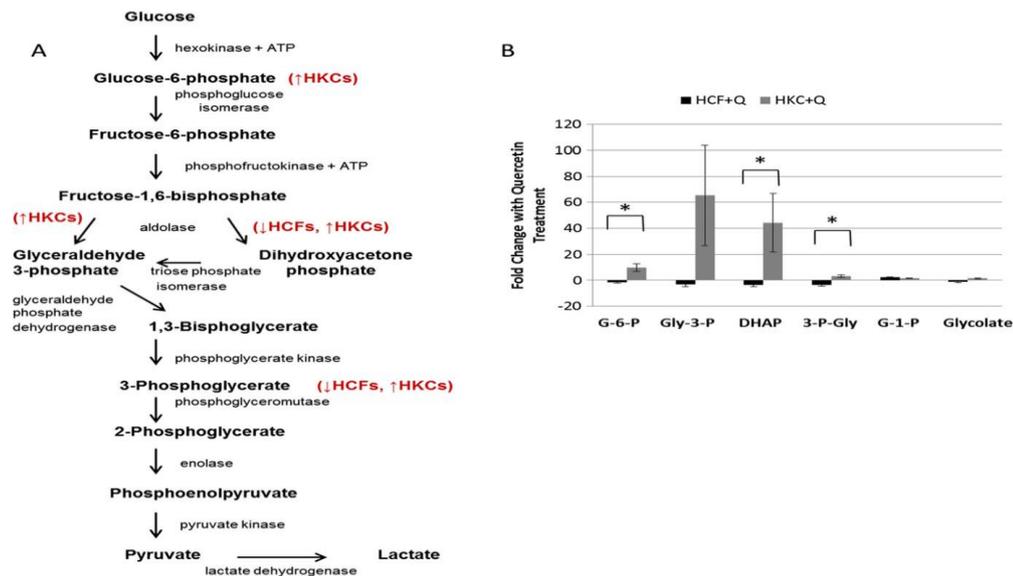
Una de las primeras complicaciones secundarias críticas de la diabetes es la opacificación de la lente ocular, una condición estrictamente asociada con la catarata diabética. El estudio presentado aquí fue diseñado para investigar el efecto del extracto de Ginkgo biloba (GbE), la rutina y la Q en ratas con catarata diabética (DC) inducida por estreptozotocina (STZ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. La influencia de la Q en vías metabólicas.

##### -Glucólisis

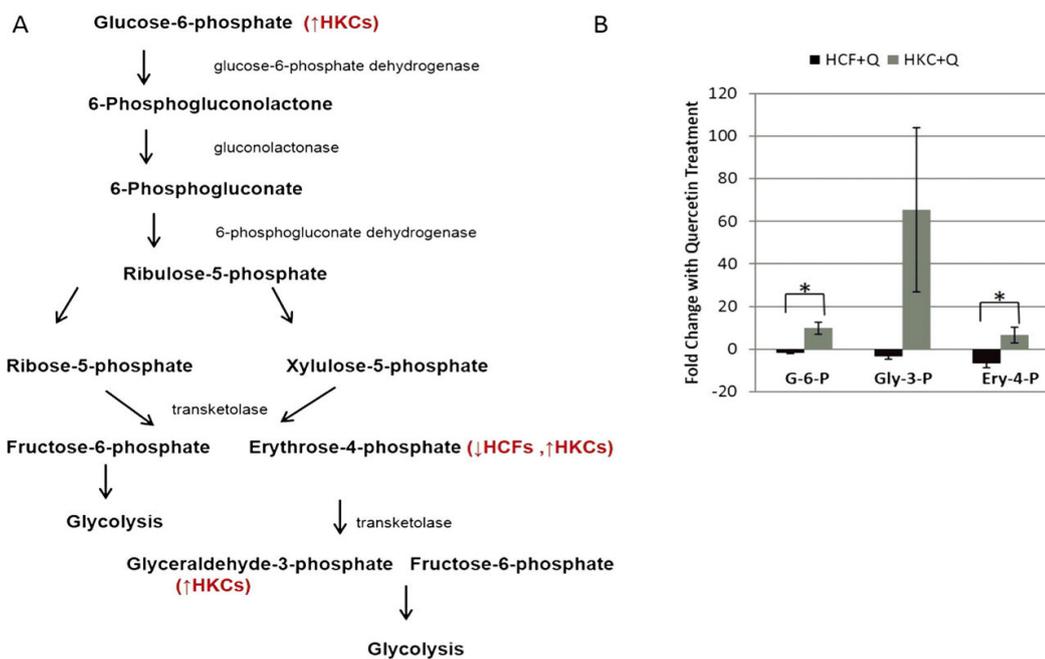
Una vía metabólica clave para la producción de energía y el metabolismo de la glucosa en las células es la glucólisis. Durante este proceso, la glucosa se convierte en piruvato, y la energía libre liberado se utiliza para generar una ganancia neta de 2ATP y 2NADH. La Figura 2A muestra una Representación esquemática de esta vía. Identificamos varios metabolitos que fueron regulados diferencialmente por Q en ambos HCFs y HKCs (Figura 2B). Tanto la glucosa-1-fosfato y el glicolato tuvo un flujo metabólico similar después del tratamiento con Q en ambos tipos de células sugiriendo que la Q se dirige selectivamente a enzimas específicas involucradas en la glucólisis, incluyendo hexocinasa, aldolasa y fosfoglicerato quinasa.



**Figura 2.** (A) Esquema que representa el papel de la quercetina en la modulación del flujo metabólico en la glucólisis en HCFs y HKCs. (B) Cuantificación de los cambios en veces en glucosa-6-fosfato (G-6-P), gliceraldehído-3-fosfato (Glyc-3-P), fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), 3- Fosfoglicerato (3-P-Gly), glucosa-1-fosfato (G-1-P) y glicolato en HCF y HKC Después del tratamiento con quercetina. Significación estadística denotada por \* =  $p < 0.05$  determinada por una prueba t de Student no pareada. Q = quercetina. Los datos son representativos de tres experimentos independientes,  $n = 3$ . [Fuente: McKay T (2015)].

## -Vía pentosa fosfato

En bioquímica, la ruta de la pentosa fosfato pentoso es una vía metabólica paralela a la Glucólisis, que resulta en la generación de grupos NADPH y pentosa de 5 carbonos. La ruta de la pentosa fosfato desempeña un papel importante en el desarrollo de la córnea. Con el fin de determinar el efecto de la Q en la modulación de la producción de energía, los autores midieron los cambios en el flujo de metabolitos, dentro de la vía de fosfato de pentosa, que es un consumidor secundario de glucosa. La Figura 3A, muestra un esquema de la ruta, donde la Figura 3B muestra la cuantificación del metabolitos que fueron regulados significativamente durante el tratamiento con Q, tanto en HCF como en HKCs. El aumento de la glucosa-6-fosfato en los HKC da como resultado un aumento de los metabolitos glucolíticos, así como el flujo de metabolitos en la vía de fosfato de pentosa, incluida una regulación al alza de gliceraldehído-3-fosfato (65 veces) y eritrosa-4-fosfato (6,5 veces,  $p < 0,03$ ). Los aumentos en el eritrose-4-fosfato observado en los HKC contribuye al aumento de gliceraldehído-3-fosfato, un intermedio que se transporta en glucólisis para su conversión en 1,3-bisfosfato.

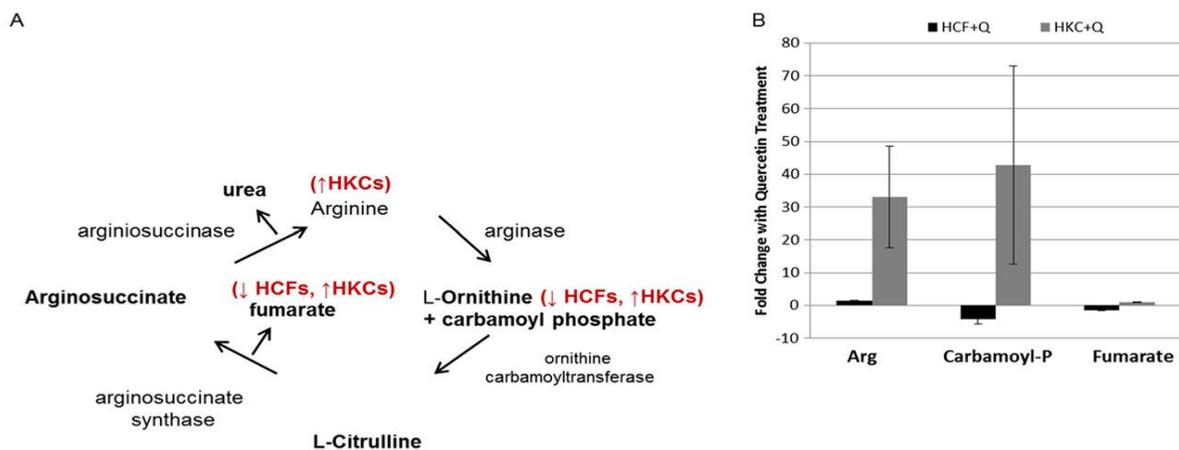


**Figura 3.** (A) Esquema que representa el papel de la quercetina en la modulación del flujo metabólico en la pentosa. Ruta del fosfato en HCFs y HKCs. (B) Cuantificación de los cambios de veces en glucosa-6. fosfato (G-6-P), gliceraldehído-3-fosfato, eritrosa-4-fosfato (Ery-4-P) y gliceraldehído-3-fosfato (Gly-3-P) después del tratamiento con quercetina. Significancia estadística denotado por \* =  $p < 0.05$  determinado por una prueba T de Student no pareada. Q = quercetina. Los datos son Representante de tres experimentos independientes,  $n = 3$ . [Fuente: McKay T (2015)]

## -Ciclo de la urea

El ciclo de la urea utiliza arginina para generar L-ornitina, que después de varias reacciones finalmente se convierte en urea. Se sabe que el ciclo de la urea contribuye a la formación de cataratas dentro de la lente sin embargo, su papel dentro de la córnea es desconocido. En el estudio se miden variaciones de intermedios clave importantes en el ciclo de la urea después del tratamiento con Q. En la urea, el ciclo que se muestra en la Figura 4A, consiste en cinco reacciones, de las cuales dos son mitocondriales y tres citosólicas. Se encuentran alteradas las arginina y los carbamoílfosfato metabolito tras el tratamiento con Q, tanto en los HCF como en los HKC. Otro metabolito no se alteró significativamente dentro del ciclo de la urea, a excepción de la arginina, un metabolito secundario que es sintetizado por citrulina a través de óxido nítrico sintasa (NOS).

El tratamiento con Q en HKC llevó a una significativa regulación positiva de la arginina en comparación con una regulación por disminución de HCF (Figura 4B). La arginina es un conocido metabolito asociado con la biosíntesis de prolina, un aminoácido clave en la estructura del colágeno. El aumento de la concentración de arginina intracelular puede causar un aumento significativo en el colágeno secreción sin promover un fenotipo miofibroblasto simplemente proporcionando un precursor clave al ensamblaje de colágeno.



**Figura 4. (A)** Esquema del ciclo de la urea que muestra el efecto de la quercetina en la modulación. Concentraciones de metabolitos clave en HCFs y HKCs. **(B)** Cuantificación de los cambios en el pliegue en arginina (Arg), fosfato de carbamoilo (Carbamoyl-P) y fumarato. Significancia estadística denotado por \* =  $p < 0.05$  determinado por una prueba T de Student no pareada. Q = quercetina. Los datos son Representante de tres experimentos independientes,  $n = 3$ . McKay T (2015).

## -Caracterización espectroscópica UV-VIS.

Se observó que con 11CR, la relación de absorbancia fue más similar a la del WT, especialmente en el caso de G90V 9CR-Q. El análisis de transferencia Western no indicó cambios importantes en el patrón electroforético de WT y mutante G90V expresado con y sin tratamiento con Q. Durante la inmunopurificación, un espectro UV-vis alterado de la tercera elución de G90V 9CR-Q podría ser observado. Así, cuando el espectro de absorción de la tercera elución de G90V 9CR-Q (se realizó a pH 6.0) se registró, se observó un patrón espectroscópico diferente y dos bandas

de absorbancia adicionales pudieron ser detectado, una banda más grande a 310 nm y un hombro pequeño a 360 nm. Además, la banda a 280 nm representa la fracción de proteína mostró un desplazamiento al rojo de 4 nm. Además, el Western blot de estas muestras fue se realizó y el mutante G90V 9CR-Q, mostró una intensidad reducida en la banda a aproximadamente 27 KDa atribuida a Proteína truncada. Se confirmó la presencia de Q en la muestra purificada, por medio del análisis HPLC-ESI-MS / MS.

#### **- Fotoblanqueo y acidificación.**

Herrera-Hernández (2017) estudia que la fotodecoloración de Rho se puede seguir por el desplazamiento de la banda de 500 nm a 380 nm. Este cambio se debe a la desprotonación del nitrógeno de la base de Schiff (SB), en el estado de Metarhodopsin II (Meta II). Los espectros UV-VIS de WT y G90V mutante fueron grabados en la oscuridad, después de la fotodecoloración durante 30 s y después de la acidificación posterior. La acidificación de estos receptores fotoactivados resultaron en un comportamiento distinto, una banda con un máximo de absorbancia a 440 nm correspondiente a la PSB se pudieron observar en todos los casos, excepto en el caso de G90V 9CR-Q, que mostraron una banda asimétrica con un máximo de absorbancia a 415 nm después de la acidificación. Este comportamiento pudo ser debido a la presencia de Q, y no a la propia mutación. La banda obtenida por desnaturalización ácida de G90V 9CR-Q iluminada, indicaron que el enlace SB había sido sometido a hidrólisis parcial y esta banda mostraría las contribuciones de ambos retina libre a 380 nm y especies ligadas a PSB que absorben a aproximadamente 440 nm.

#### **-Regeneración del Cromóforo y la estabilidad Térmica y Química**

Se ha demostrado que Rho puede ser activada en la oscuridad aumentando la temperatura que forzaría la isomerización del cromóforo. El efecto estabilizador potencial de Q en el mutante G90V-9CR, sería difícil detectar debido al hecho de que la isomerización retiniana inducida por la temperatura y la hidrólisis del SB desprotonado es muy rápido debido a la inestabilidad térmica intrínseca del mutante G90V. Para el WT 9CR, la presencia de Q produce una ligera disminución de la hidroxilamina accesibilidad al sitio de unión de la retina e hidrólisis del enlace SB. Por el contrario, G90V 11CR mostró una cinética no lineal y una disminución dramática debido a la estructura menos compacta en el entorno de enlace SB, como se observó anteriormente. Q aumentó ligeramente la estabilidad química de G90V 11CR-Q. En cuanto a G90V, el análogo 9CR aumentó la estabilidad de este mutante y también mostró una cinética no lineal. El tratamiento con Q en este receptor mutante aumentó aún más la sustancia química, estabilidad del receptor, que es indicativo de una estructura más compacta de la proteína, al menos en la proximidad del enlace SB del cromóforo. Además, este comportamiento cinético fue más lineal. En casos específicos donde la opsina no se une con el cromóforo para dar Rho regenerada, la activación persistente de la proteína G por la opsina desestabiliza y eventualmente daña las células de los bastones conduciendo a la degeneración de la retina. El WT 11CR presentó la tasa de regeneración más baja que no se vio afectada por el tratamiento con Q. El reemplazo del cromóforo natural con análogo 9CR mostró un aumento significativo de la velocidad inicial de regeneración en comparación con WT 11CR. Esta tasa se incrementó en un 50% como resultado del tratamiento con Q. Respecto a G90V mutante, la presencia de Q aumentó significativamente la velocidad inicial de regeneración tanto en G90V 11CR como en G90V 9CR, que tiene un mayor efecto sobre el mutante regenerado con 9CR.

### 3.2. Efectos de la Q sobre células oculares.

#### -Activación de la transducina.

Los resultados son consistentes con la unión de Q a Rho en las muestras purificadas porque los parámetros analizados sólo varían en las muestras de proteínas purificadas que provienen de células tratadas con Q. Es plausible que Q se une durante el proceso de plegamiento e inserción de membrana de la proteína, en el cultivo celular no se pudo detectar ningún efecto de Q cuando el compuesto se agregó a la muestra de proteína después de la purificación.

#### -Antiinflamatorio.

Los niveles de proteína IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  corregidos para el peso del tejido fueron significativamente más altos en los sobrenadantes de las muestras GO que los controles normales ( $p < 0.05$ ). La Q redujo la producción de proteínas de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  en sobrenadantes de todas las muestras GO ( $n = 4$ ) de una manera dependiente de la dosis; sin embargo, solo la reducción en IL-6 fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). La Q tuvo una supresión significativa de la expresión del ARNm de los tejidos IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en tejidos orbitarios cultivados de tres muestras de GO en relación con el tejido de control no tratado ( $p < 0,05$ ).

#### -Formación de neovascularización coroidea (VNC).

La Q inhibió significativamente la formación de CNV inducida por láser. El flujo sanguíneo coroideo en los ojos de conejo aumentó significativamente después de la instilación con Q. Los resultados *in vitro* mostraron que la Q mejoró diversas lesiones inducidas por oxidación en HUVEC e inhibió la migración de HUVEC durante la cicatrización de heridas.

#### -Inhibición de la angiogénesis coroidea y retiniana in vitro.

La Q inhibe la proliferación de células endoteliales de una manera dependiente de la dosis; 10.1%, 42.6% y 65.2% de inhibición en el tratamiento con 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de Q respectivamente. La migración y la formación de tubos de las células RA / 6A también fueron inhibidas significativamente por la Q de una manera dependiente de la dosis. El análisis de citometría de flujo mostró que los porcentajes de células apoptóticas aumentaron ligeramente solo en las células tratadas con Q 100  $\mu\text{M}$ .

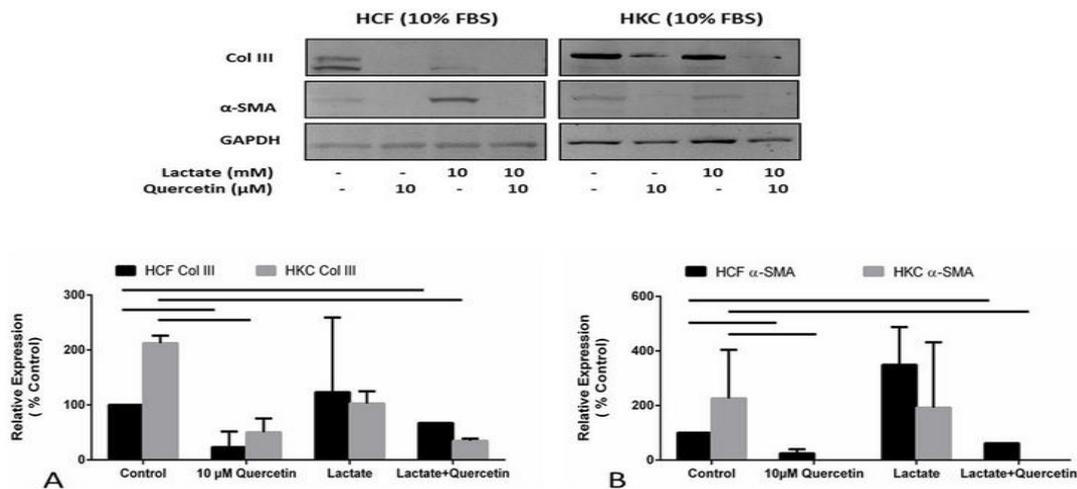
#### -Protección de la retina.

Se encontró que la administración de Q reduce el adelgazamiento de todas las capas retinianas. El grosor medio de INL en la Q y los grupos isquémicos fue de  $21 \pm 5,6 \mu\text{m}$  y  $16 \pm 6,4 \mu\text{m}$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ). De manera similar, el grosor medio de la ONL en la Q y en los grupos isquémicos fue de  $50 \pm 12,8 \mu\text{m}$  y  $40 \pm 8,7 \mu\text{m}$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ). El efecto antiapoptótico de la Q en términos de reducción del número de células TUNEL (+) y de caspasa-3 (+) fue significativo en INL. El número medio de células TUNEL (+) en INL en los grupos isquémico y Q fue  $476,8 \pm 45,6 / \text{mm}^2$  y  $238,72 \pm 251 / \text{mm}^2$ , respectivamente ( $P 0,005$ ). El

número medio de células caspasa-3 (+) en INL de los grupos isquémicos y Q fue  $633.6 \pm 38.7 / \text{mm}^2$  y  $342.4 \pm 36.1 / \text{mm}^2$ , respectivamente ( $P < 0.001$ ).

### - Efectos antifibróticos.

Como identificaron que la Q inhibía la secreción de Col III, *McKay T (2015)*, buscaron investigar si la expresión de Col III se inhibía independientemente de la secreción y reflejaba la inhibición general de la diferenciación de miofibroblastos. Midieron la expresión de Col III y  $\alpha$ -SMA en presencia y ausencia de Q. La Figura 5 muestra que el tratamiento con Q inhibió significativamente la expresión de Col III (Figura 5A;  $p < 0.05$ ) y  $\alpha$ -SMA (Figura 5B;  $p < 0.05$ ) en presencia y ausencia de lactato en HCF y HKC. La reducción en la expresión de Col III y  $\alpha$ -SMA después del tratamiento con Q sugiere que la Q es un potencial antifibrótico que puede ser útil en el tratamiento de enfermedades fibróticas. Se cuantificaron las transferencias Western de lisados celulares de HCF y HKC después de un tratamiento de cuatro semanas con o sin tratamiento con Q y / o lactato.

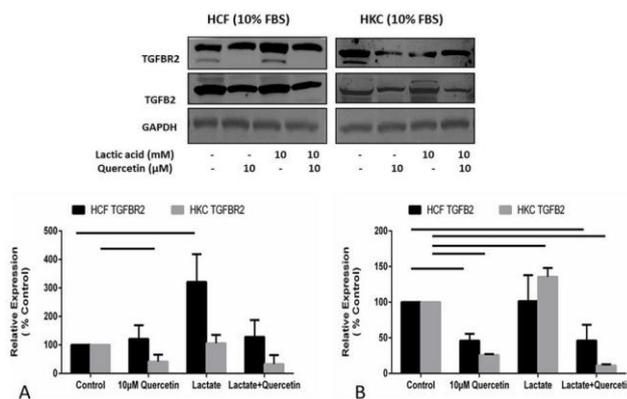


**Figura 5.** *McKay T (2015).* Cuantificación de transferencias Western de lisados celulares de HCF y HKC después de un tratamiento de cuatro semanas con o sin tratamiento con quercetina y / o lactato.

### -Atenuación de la señalización pro-fibrótica.

Estudios previos, han indicado un vínculo entre la fisiopatología KC y la vía TGF- $\beta$ . Con el fin de determinar si la Q inhibió la diferenciación de miofibroblastos terminales de una manera dependiente de TGF- $\beta$ , los autores investigaron los cambios en la ruta de TGF- $\beta$ . Los niveles de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$  receptor II (TGF- $\beta$ RII) fueron altamente modulados. En los HCF, identificamos un aumento sustancial en la expresión de TGF- $\beta$ RII (Figura 6A; 4 veces;  $p < 0.05$ ) después del tratamiento con lactato 10 mM, pero no hubo cambios en TGF- $\beta$ 2 (Figura 6B). Por otro lado, los HKC no mostraron cambios significativos en la expresión de TGF- $\beta$ RII (Figura 6A), pero sí aumentaron significativamente el TGF- $\beta$ 2 regulado (Figura 6B;  $p < 0.05$ ).

De acuerdo con nuestros hallazgos descritos anteriormente, la Q disminuyó significativamente la expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ R2 en HCF y HKC incluso en presencia de exceso de lactato (Figura 6A y 6B). En general, estos datos indicaron un vínculo plausible entre la activación de TGF- $\beta$  elevada y la expresión aumentada de Col III y  $\alpha$ -SMA. Estos resultados sugieren un posible papel de la señalización aberrante de TGF- $\beta$  en el ensamblaje de ECM alterado por HKCs y el uso potencial de Q para atenuar la señalización pro-fibrótica.



**Figura 6.** Cuantificación de transferencias Western de lisados celulares de HCF y HKC después de un tratamiento de cuatro semanas con o sin tratamiento con Q y/o lactat. Fuente: McKay T (2015).

### -Efecto protector de la Q y el ácido clorogénico.

La Q y la CA suprimieron de manera efectiva los niveles de marcadores de estrés oxidativo aumentados por la exposición a la luz y aumentaron significativamente los niveles de hemooxigenasa-1 en la retina ( $p < 0.05$ ).

Los niveles de citoquinas inflamatorias, incluida la proteína quimiotáctica de monocitos 1, interleucina (IL) -8, IL-1  $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa, ciclooxigenasa 2 y óxido nítrico sintasa inducible en los tejidos de la retina, se redujeron significativamente mediante Q y CA; Además, la Q inhibió significativamente la expresión del factor nuclear kappa B ( $p < 0.05$ ). Además, los cambios inducidos por estrés fotooxidativo en los niveles de expresión de las proteínas apoptóticas y los factores de angiogénesis fueron regulados por Q y CA. El análisis histológico reveló que el espesor de la capa nuclear externa se mantenía mediante Q, pero no por CA. Los resultados sugieren que la Q y la CA juegan un papel importante en el alivio de la degeneración de la retina.

### - Los efectos de la Q en la catarata antidiabética de la GbE.

La administración de GbE, rutina y Q inhibió notablemente la actividad AR, estimuló la producción de glutatión y disminuyó los niveles de MDA y AGE en las lentes de ratas inducidas por DC, lo que eventualmente retrasó la progresión de la opacificación de lentes en ratas diabéticas en diversos grados. Nuestros resultados revelaron que la Q tenía el mayor potencial significativo ( $P < 0.05$ ) para retrasar la progresión de la catarata diabética inducida por STZ en comparación con la rutina y la GbE. El mecanismo que dicta esta interesante destreza de la Q podría atribuirse a su fuerza inhibitoria de AR, a su potencial de peroxidación anti-lípidos y a su actividad anti-AGE.

### 3.3. La Q y las células de tejidos oculares.

#### **-Expresión de hsp70 y hsp27 en células epiteliales de lente en ojo contuso de rata modulada por termotolerancia o Q.**

La expresión básica de Hsp70 y Hsp27 se observó en las LEC. La expresión de Hsp70 en LEC se incrementó después de la contusión de una manera dependiente del tiempo.

La hipertermia de preacondicionamiento (45 ° C, 8 min) dio como resultado un aumento significativo de la expresión de Hsp70 en comparación con el nivel básico, y mejoró la expresión en cada subgrupo en contraste con el subgrupo correspondiente en el grupo de contusión.

No hubo un cambio notable de expresión de Hsp27 entre cada grupo.

La inmunotinción de Hsp70 fue prominente en LEC de ojos de contusión y ojos de choque térmico en comparación con los de ojos normales. La inmunotinción de Hsp70 fue débil en LEC de ojos tratados con Q.

#### **- Modulación del metabolismo celular en HCFs y HKCs *in vitro*.**

(McKay TB, et al 2016), identificaron la Q como un inhibidor potencial de los marcadores fibróticos de la córnea, incluyendo la actina del músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) y el colágeno III.

En el estudio actual se exploró los efectos de la Q en la modulación del metabolismo celular en HCFs y HKCs *in vitro*.

Usando la metabolómica, se evaluaron los niveles de metabolitos en los HCF y HKC después del tratamiento con Q, y se cuantificaron solo los que estaban regulados hacia arriba / abajo por más de una proporción de 2:1.

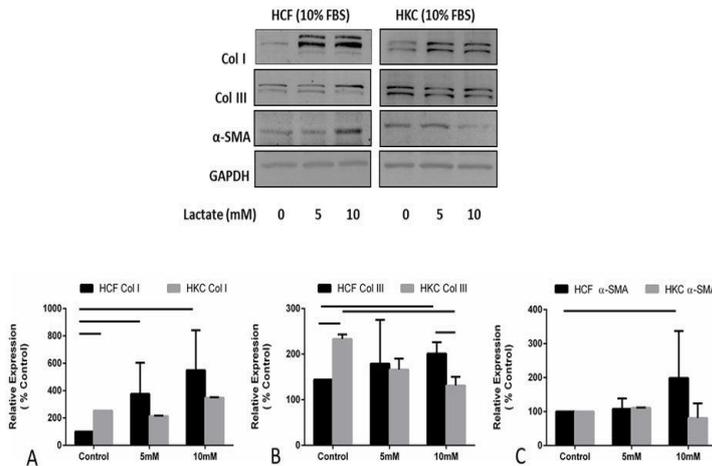
Los resultados muestran que la Q modula directamente el metabolismo celular afectando el metabolismo de la glucosa. Después de mapear los metabolitos en vías bioquímicas generales, fue evidente que la vía común regulaba a la baja tanto en HCF como en HKCs.

#### **- Respuestas de las células epiteliales de la lente humana a la Q y al DMSO.**

El DMSO (1% v / v) disminuyó la viabilidad celular, aumentó la apoptosis celular. La Q 0,1  $\mu$ M inhibió estos efectos y protegió a las HLEC de la toxicidad del DMSO. Mayores concentraciones de Q disminuyeron la viabilidad de los HLEC. En una respuesta dependiente de la dosis a la Q, la apoptosis celular aumentó y el cambio se correlacionó con la disminución de la viabilidad celular.

## -La Q atenúa la producción de lactato y la secreción de matriz extracelular en el queratocono.

El lactato se ha relacionado con el estrés oxidativo, y el edema de córnea así como se ha vinculado con la aparición de KC *in vitro*. En el estudio T. B. McKay (2015), se prueban los efectos de la estimulación exógena de lactato a pH fisiológico dentro de la córnea tanto en los HCF como en los HKC. La estimulación con lactato tuvo el mayor impacto en la expresión de Col III en HKCs. Producción excesiva de lactato en la promoción de cicatrización en enfermedades fibróticas.

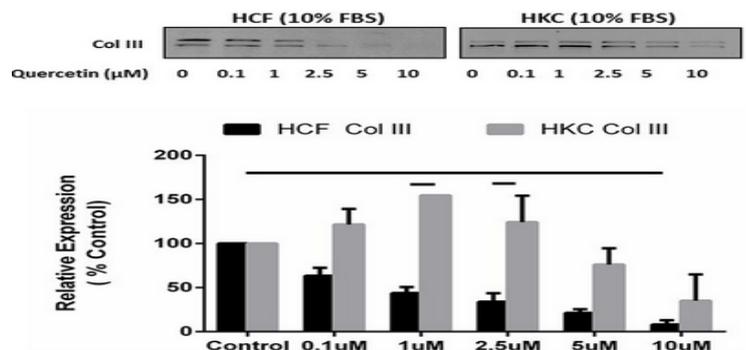


**Figura 7.** Cuantificación de transferencias Western de lisados celulares de HCF y HKC después de cuatro semanas de tratamiento con concentraciones crecientes de lactato. Fuente: McKay T (2015).

Para identificar el efecto de la Q en la secreción de ECM en HCF y HKC, los autores cuantificaron las cantidades de Col III liberadas en los medios de cultivo (Figura 8). Midieron la secreción de Col III (Figura 8) en los medios de cultivo después de las concentraciones incrementales de Q.

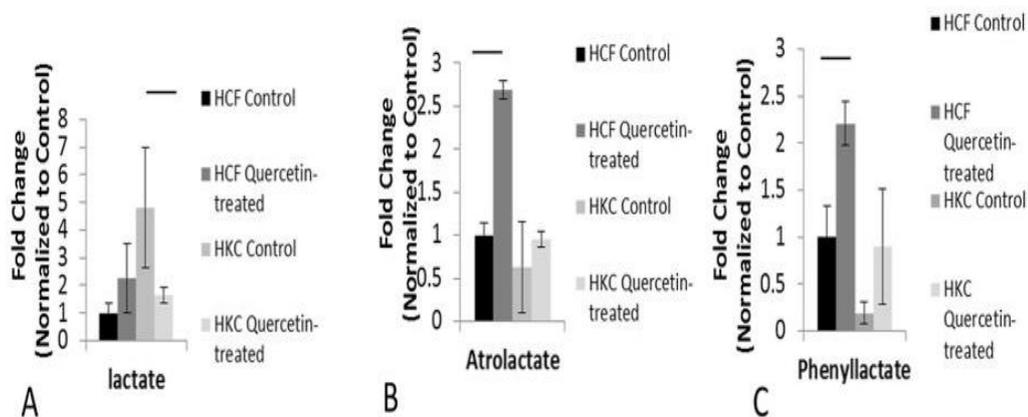
Los niveles de Col III fueron significativamente más altos en HKC en comparación con los HCF a 1 y 2.5  $\mu$ M de Q (Figura 8;  $p < 0.05$ ). No se observó toxicidad de Q en nuestro modelo *in vitro*. Varios estudios han utilizado concentraciones similares de Q hasta 50–100  $\mu$ M *in vitro*.

**Figura 8.** Cuantificación de la secreción de colágeno III en los medios de cultivo por HCF y HKC. Fuente: McKay T (2015).



### -La Q altera el metabolismo en HCF y HKCs.

Dado que la Q es un inhibidor conocido de los transportadores de lactato MCT1, investigaron si la Q puede afectar la producción de lactato intracelular *in vitro* mediante la activación de un circuito de retroalimentación negativa que disminuiría las concentraciones de lactato secretado. Los investigadores utilizaron el análisis metabolómico para identificar variaciones en los metabolitos clave en los HCF y HKC después del tratamiento con Q. Observaron cambios significativos en las concentraciones de metabolitos específicos, como el lactato y los metabolitos derivados del lactato (Figura 9). La Figura 9A muestra un aumento de 5 veces en la producción de lactato por HKC no tratados en comparación con los HCF. El tratamiento con Q causó una disminución dramática en la producción de lactato por los HKC (Figura 9A; 2 veces,  $p < 0.03$ ) y, por lo tanto, restauró los niveles de lactato a los niveles normales de HCF. Curiosamente, se observó una regulación idéntica con otros dos metabolitos clave que son generados por el metabolismo de la fenilalanina y el lactato, el atrolactato (Figura 9B) y el fenyllactato (Figura 9C). Las Figuras 9B y 9C indican que la Q no causó un aumento significativo de estos dos metabolitos en los HKC en comparación con los HCF, que mostraron un aumento significativo (2.5 veces,  $p < 0.05$ ; y 2 veces,  $p < 0.05$ , respectivamente). Los datos sugieren que la Q está inhibiendo directamente la producción del exceso de lactato por los HKC en lugar de aumentar los metabolitos derivados del lactato.



**Figura 9.** Cuantificación de transferencias Western de lisados celulares de HCF y HKC después de un tratamiento de cuatro semanas con o sin tratamiento con quercetina y / o lactato. Fuente: McKay T (2015).

#### 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Es bien sabido que la distrofia KC puede conducir a fibrosis corneal, así como al adelgazamiento de la córnea y el abultamiento. Los modelos de roedores para la lesión / trauma corneal son muchos y bien estudiados, sin embargo, todavía se debe encontrar un modelo de roedor que permita estudiar la distrofia humana de KC. El desarrollo de tal modelo será muy útil para aumentar la comprensión de la patogenia de KC. Es ahora ampliamente aceptado que el metabolismo celular juega un papel clave en la enfermedad de KC.

Tina B McKay (2015), estableció el primer sistema de cultivo en 3D en 2012 que refleja el fenotipo *in vivo* en un intento de comprender los mecanismos moleculares y bioquímicos de la enfermedad. En el proceso, se han utilizado el modelo 3D para caracterizar los perfiles metabólicos globales de humanos, células corneales de cultivos sanos y KC 3D. En el estudio se explora el efecto de un nuevo compuesto antifibrótico llamado Q en la modulación del metabolismo celular en los HKC, que impulsan el fenotipo de la enfermedad en el ensamble de ECM alterado.

En la retina, se demostró que la Q protege el epitelio pigmentario de la retina (RPE) de la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno y el daño oxidativo inverso en el RPE. En la córnea recientemente Tina B McKay (2015) ha demostrado que la Q inhibe el fenotipo fibrótico exhibido por HKC *in vitro* con una disminución en la expresión de  $\alpha$ -SMA y colágeno III. En este documento, exploró el papel de la Q en la modulación del metabolismo celular en HKCs como un posible mecanismo de acción. Entre los hallazgos metabólicos más significativos se encuentran la modulación opuesta de ambos, la glucólisis y el ciclo TCA por Q. La glucólisis y el ciclo del TCA son los mecanismos dominantes utilizados por las células para producir ATP, NADH y FADH<sub>2</sub>, que luego se utilizan para generar energía para impulsar reacciones bioquímicas. Los resultados de los investigadores muestran que la Q modula la glucólisis en HKCs y causa un aumento significativo en la glucosa-6-fosfato, que es el metabolito primario generado por la hexoquinasa tras la captación de glucosa. La Fosforilación de la glucosa es fundamental para restringir la glucosa al citosol y para permitir el metabolismo de la glucosa, azúcar para generar ATP. Según los autores la Q modula directamente la expresión de enzimas glucolíticas que resultan en un aumento de la glucosa-6-fosfato que contribuye impulsando la producción de energía favorable por HKCs. El aumento de gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona, ambos productos de la actividad de la aldolasa, en HKCs siguen el tratamiento con Q, ambos sugieren que la Q modula directamente la actividad glucolítica para favorecer Fosforilación a nivel de sustrato para generar producción de ATP. Por otra parte, en los HCF normales, encontramos el efecto contrario en la producción de intermediarios glucolíticos por la Q, sugiriendo que la expresión génica inherente de las enzimas glucolíticas domina la producción de energía y respuesta a la Q.

Dos de los mecanismos más importantes en el metabolismo celular fueron regulados de manera opuesta con tratamiento de Q. En primer lugar, en los HCF, clave glicolítica, los metabolitos, el dihidroxiacetona fosfato y el 3-fosfoglicerato, fueron regulados a la baja, en cambio, en HKCs los mismos metabolitos fueron regulados al alza. Segundo, en HCFs, el TCA el ciclo mostró una regulación a la baja de citrato mientras que los HKC mostraron una regulación positiva de este metabolito así como isocitrato y malato, lo que indica un ciclo de TCA más rápido y bastante sobrecargado. Estos resultados se vuelven aún más significativos cuando consideramos que la Q regula hacia abajo los marcadores fibróticos en estos mismos tipos de células y el mismo modelo

de cultura 3D, como mostrado por nuestro grupo recientemente. Esto sugiere que el mecanismo metabólico para la córnea la fibrosis difiere entre condiciones específicas y enfermedades.

En otras palabras, el metabolismo en los HCF debe de ser modulado de una manera diferente en comparación con los HKC para promover un Fenotipo no fibrótico. Los hallazgos fueron respaldados por la regulación de los nucleótidos de adenina, ATP, ADP y AMP. La mayoría de las vías metabólicas están reguladas por las proporciones relativas de ATP, ADP y AMP en las células. Una célula que carece de suficiente ATP y / o acumula ADP / AMP casi seguramente habrá alterado la función normal y el comportamiento celular. Se examinan los HCF sanos y los HKC enfermos aislados de pacientes con KC. Sorprende que haya una gran diferencia en la disponibilidad de ATP y en la ATP: ADP / ATP: relaciones AMP. Hemos demostrado anteriormente que los HKC se diferencian terminalmente a los miofibroblastos, una célula responsable de la fibrosis corneal. HCF, por otro lado, son de donantes sanos, pero todavía no tan inactivos como las células corneales residentes normales conocidas como queratocitos. A pesar de eso, existen grandes diferencias entre los HCF y los HKC, en términos de su papel en la fibrosis. Nuestros datos sobre la adenina, los nucleótidos indican que los niveles de ATP fueron más altos en los HCF en comparación con los HKC y masivamente disminuido con el tratamiento con Q. HKCs no mostró una respuesta extensa en ATP, ADP y flujo de AMP después del tratamiento con Q. Sin embargo, los ratios de ATP / ADP y el flujo de ATP / AMP mostró una regulación masiva en HKC cuando se trató con Q como en comparación con todos los otros grupos. Esto indica la acumulación de ATP y AMP cuando HKCs son tratados con Q. Sumando estos hallazgos a lo que sabemos sobre la Q, y los efectos antifibróticos en HKC, estos resultados sugieren que la Q ayuda a restablecer la El ATP – ADP – AMP, se equilibra en estas células y, por lo tanto, las “empuja” hacia un sistema menos fibrótico y un estado potencialmente más saludable.

El estudio sugiere que apuntar al metabolismo celular en KC puede resultar un enfoque prometedor para tratar esta enfermedad corneal mediante la inhibición de la diferenciación del fenotipo miofibroblasto. Los autores proponen que la Q puede ser un antioxidante útil que se puede usar para inhibir la fibrosis corneal ya que modula el metabolismo celular e inhibir la formación de cicatrices.

9CR es el análogo más estudiado al 11CR, produce isorodopsina que contiene un PSB entre 9CR y opsina. Sufre una secuencia de blanqueo idéntica a la de Rho (regenerada con 11CR) y se caracteriza por una banda de Absorbancia máxima visible de desplazamiento azul. 9CR se usa a menudo como un análogo artificial para probar la estructura y función de Rho28 nativo.

La regeneración con 11CR se ha investigado durante la última década, se han atribuido varias propiedades, como el aumento de la estabilidad del mutante RP G90V15, por lo tanto, estos factores aumentan el interés en realizar el estudio utilizando el análogo 9CR. Además, nuevos enfoques metodológicos se han desarrollado para tratar de controlar los procesos fisiológicos mediante el uso de luz. En este sentido la optogenética, y las técnicas oftalmológicas se consideran herramientas prometedoras para el tratamiento de la degeneración de la retina, enfermedades como la R, etc. Sin embargo, estas técnicas requieren el suministro de opsinas microbianas recombinantes con problemas inmunogénicos, como en el caso de optogenética o agentes químicos fotocromáticos con toxicidad potencial como en el caso de la optofarmacología. Para superar estos inconvenientes, el uso de productos naturales como Q, solo o en combinación

con otras moléculas, puede ser una estrategia poderosa para contrarrestar los efectos de mutaciones asociadas a la degeneración retiniana en la PR.

Los resultados encontrados en el estudio de Herrera-Hernández M. G. (2017), demuestran el efecto específico de Q en las propiedades de unión de 9CR que contienen opsinas, especialmente en el caso del mutante G90V en el que su porcentaje y tasa de regeneración fueron mayores. Esto podría atribuirse a la energía de interacción más fuerte adquirida por el Grupo C-13-metilo de Y268 y W265, que favorece la entrada en el sitio de unión de la retina, además, su producto químico. La estabilidad también aumenta después de la regeneración con el análogo de la retina y eso refleja una mejora de la compactación estructural en el entorno SB. Los resultados indican un efecto sinérgico de la combinación de 9CR y Q en la mejora de las propiedades físico-químicas de las proteínas mutantes RP. Herrera-Hernández (2017) también propuso la aplicación farmacéutica de retinoides para tratar disfunciones visuales, de otras moléculas pequeñas también se investigaron sus propiedades como chaperonas farmacológicas. Muchas de estas moléculas se unen y estabilizan opsinas mutantes mejorando así los problemas de plegamiento. Los resultados sugieren que la Q mejoró el plegado y estabilidad estructural del mutante G90V RP. En este caso, la relación  $A_{280} / A_{max}$  fue más similar a la reducción de WT, en aproximadamente el 15%, el presunto plegamiento incorrecto que es común para los mutantes de RP40. Investigaciones anteriores sugirieron que los flavonoides (el grupo al que pertenece Q) pueden estar involucrados en la fisiología de la visión y la salud ocular pero no hay una prueba clara.

Los resultados de Herrera-Hernández (2017), sugieren que la Q puede actuar como un modulador alostérico de Rho y del mutante G90V cuando su ortostérico ligando es 9CR. Los estudios realizados demuestran que los posibles sitios de unión a ligandos son diferentes cuando el ligando ortostérico es 11CR o 9CR. Los resultados del acoplamiento molecular revelan que el sitio de unión 3, que no se encuentra en Rho, podría ser el sitio donde la Q podría vincularse. Este sitio involucra el ECL2 en el cual se detectó una ligera diferencia. Se observó mediante la superposición de las estructuras de Rho y la isorhodopsina, diferencia que también se observó en el N-terminal, el segundo bucle extracelular en particular ha sido el objetivo de una serie de estudios funcionales indicando su papel en la activación de los GPCR como resultado de la unión de moléculas pequeñas o ligandos peptídicos grandes.

En Rho, ECL 2 es parte del tapón de la retina, y forma una tapa sobre el sitio de unión de su cromóforo fotorreactivo. Una red unida en H bien definida estabiliza la estructura ECL2 que está formada por varios residuos polares, con Glu181, en el centro de esta red, que está unida en H a Tyr192 y Tyr268, y está conectada a Glu113, el contraión a la retina PSB. Los estudios computacionales identificaron ECL2 como parte del núcleo plegable estable de Rho45 inactivo. En su conformación activa (Meta II), el desplazamiento de ECL2 desde el sitio de unión retiniana y un reordenamiento en las redes de enlace de hidrógeno que conectan ECL2 con los extremos extracelulares de TM4, TM5 y TM6, ha sido reportado. Dadas las características de ECL2, es posible que el enlace Q en este sitio pueda dar más estabilidad y compactación al entorno de la bolsa de la retina que se refleja en la estabilidad química mejorada presentada por WT 9CR-Q y G90V-9CR-Q. Además, esta estructura más compacta también afecta a la liberación de la retina después de la hidrólisis de Meta II que se incrementó casi al doble en el mutante G90V 9CR-Q. Esta gran diferencia en la desintegración del Meta II para este mutante (con Q aparentemente unido a ECL2) probablemente se deba al reemplazo de glicina por valina en el mutante G90V. En el caso de la conformación fotoactiva de Meta II, nuestro análisis de acoplamiento molecular indica que el sitio 3 queda disponible para la unión Q y esto parece ser consistente con nuestros

resultados experimentales. Esta sugerencia que el sitio de unión 3 solo es accesible de alguna manera durante el plegamiento de la proteína (como sucedería cuando tratamos células COS-1 con Q) o después de reordenamientos estructurales asociados con la formación del estado activo de Meta II. Este hallazgo es muy interesante y abre nuevas vías para explorar la interacción de Q con diferentes Rho. Todos estos resultados pueden ser relevantes para las diferentes conformaciones adoptadas por otros GPCRs.

En los ensayos de activación de transducina, se observaron nuevamente cambios muy marcados en la cinética de activación en muestras WT 9CR-Q y G90V 9CR-Q, y en el caso de G90V 9CR-Q, la activación de la transducina fue de alguna manera reducido en comparación con el mutante sin tratamiento Q. Estos resultados sugieren que el proceso de activación se ve afectado por la Q, probablemente ligado a ECL2, alterando el reordenamiento en las redes de enlace de hidrógeno que conectan este bucle con los extremos extracelulares de TM5 perjudica la ruptura del bloque iónico que regula la activación<sup>46</sup>.

En conclusión, utilizando diversas técnicas de biología molecular y métodos analíticos combinados con estudios computacionales *in silico*, se ha demostrado que la Q actúa como un modulador alostérico de 9-cis-Rho y, lo que es más importante, esa propiedad tiene un efecto sobre la estabilidad del mutante G90V 9CR asociado con RP. Los resultados presentados demuestran que el mismo modulador alostérico (Q) puede actuar como un potenciador de ligando ortostérico (porque aumenta la velocidad de regeneración) y al mismo tiempo reduce la activación de la transducina. Esta respuesta modulada que presenta Q como un modulador alostérico de mutantes Rho, podría ser explotada en el diseño de fármacos y el desarrollo de novedosos enfoques farmacológicos para el tratamiento de la PR.

Estos resultados abren nuevas posibilidades para utilizar compuestos polifenólicos naturales, en combinación con retinoides específicos como 9CR, para el tratamiento de la degeneración retiniana asociada con RP. Este enfoque ayudará a prevenir posibles problemas inmunogénicos asociados con el uso de opsinas microbianas en métodos optogenéticos. También puede eludir los efectos tóxicos potenciales de los ligandos fotocromicos.

Recientemente son propuestos como agentes terapéuticos en las innovaciones optofarmacológicas. Además este efecto de Q como el modulador alostérico también puede ser aplicable a otros miembros de la superfamilia de GPCR.

Los estudios presentados evidencian que los flavonoides pueden comportarse como antioxidantes y prooxidantes, e influyen en ello factores como: las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde se forma la ERO; la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilicidad para ser captados por la membrana y el pH del medio. Por esto, a pesar de que usualmente se asegura que los flavonoides están libres de toxicidad y efectos secundarios, lo que permite sus amplios usos terapéuticos, son necesarias otras investigaciones que profundicen en este sentido teniendo en cuenta que las estrategias de mercado, seguidas por los fabricantes de concentrados de flavonoides, consisten en exagerar sus efectos no tóxicos, la mayoría de los cuales no están sustentados por ensayos clínicos regulados, y recomiendan dosis que pueden sobrepasar a las adquiridas a través de una típica dieta vegetariana, conduciendo a la generación de ERO y daño posterior del ADN. Por otra parte, los aspectos estructurales relacionados con la actividad antioxidante de los flavonoides, considerando los estudios de la actividad secuestradora de RL e

inhibición de la POL, incluyen un grupo catecol como rasgo estructural fundamental, junto con el grupo carbonilo. El grupo OH incrementa la capacidad antioxidante porque la forma libre es más lipofílica que la glicosídica y un grupo OH en posición 5 puede aumentar la actividad antioxidante por incremento de la deslocalización electrónica. La conjugación total del anillo piránico con el resto de la molécula, lo cual es típico de las antocianidinas, incrementa la estabilización de los radicales formados, se produce un aumento de la actividad antioxidante, pero al mismo tiempo la presencia de un grupo pirogalólico predispone hacia una actividad prooxidante.

La inhibición de las citocinas proinflamatorias por parte del producto natural Q tanto en los fibroblastos orbitales primarios como en el cultivo de tejidos proporciona la base para su posible uso como agente antiinflamatorio en el tratamiento de GO. La Q inhibió la formación de la VNC tanto *in vivo* como *in vitro* y aumentó el flujo sanguíneo coroideo por lo que es un candidato prometedor para el tratamiento de la DMAE.

La ingesta de luteolina, apigenina, myricetin y Q como terapia complementaria para el cáncer o en el tratamiento de enfermedades de la retina debe ir acompañada de un control cuidadoso de la función de la retina. Los posibles efectos beneficiosos del EGCG y la cianidina, que tuvieron poco efecto en la viabilidad de las células RPE, en el tratamiento de las enfermedades de la retina, deben examinarse en investigaciones adicionales.

El aumento de la expresión de Hsp70 en LEC de ojos contundidos puede desempeñar un papel protector contra la degeneración de la proteína de la lente. El precondicionamiento térmico posiblemente protege contra la lesión de la lente al aumentar la expresión de Hsp70. Los mecanismos de protección endógenos pueden ser importantes en la contusión ocular.

La respuesta al choque térmico es un posible mecanismo de protección para mantener un microambiente normal en la lente. Los **resultados de Yi Chen (2008), confirman las observaciones** de estudios anteriores, lo que sugiere que Hsp y Hsp se expresan de forma constitutiva en la lente. La lente es un sistema cerrado con capacidad limitada para repararse o regenerarse sin embargo, la cámara ocular está expuesta constantemente a humor acuoso que contiene especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por reacciones catalizadas por la luz.

Sus resultados **demuestran que la Q inhibe la angiogénesis coroidea y retiniana *in vitro***. Yi Chen (2008) está realizando más estudios para evaluar este fármaco como un posible candidato para el tratamiento de la neovascularización coroidea o retiniana.

El uso de Q puede ser beneficioso en el tratamiento de la lesión I / R retiniana debido a su efecto antiapoptótico en las capas retinianas, particularmente en INL.

La Q, a una concentración baja, protege los HLEC y revierte los efectos tóxicos del DMSO. Sin embargo, en concentraciones más altas, la Q es tóxica para los HLEC con un LD50 de 90.85  $\mu\text{M}$ . La Q indujo apoptosis y regula al alza los genes apoptóticos en HLEC de una manera dependiente de la dosis.

El KC es una de las distrofias corneales más comunes que pueden provocar una discapacidad visual grave. Se caracteriza por una ectasia corneal progresiva no inflamatoria bilateral que puede llevar a una discapacidad visual grave una vez que se alcanzan las etapas severas. Hasta la fecha,

no hay un objetivo terapéutico disponible para la prevención de esta enfermedad, y la patogenia del KC sigue siendo desconocida. Además, no hay un modelo animal disponible que pueda usarse para estudiar la progresión de la enfermedad y promover el desarrollo de nuevos tratamientos.

En este trabajo se documenta que la Q es un potente inhibidor de la fibrosis inducida por lactato en KC. Usando una variedad de técnicas establecidas, los autores demuestran que la Q atenúa la secreción de colágeno y la diferenciación terminal al fenotipo fibrótico observado en HKCs. Teniendo en cuenta sus propiedades antioxidantes los autores plantean la hipótesis de que la Q puede atacar el metabolismo celular tanto en los HCF como en los HKC. Los datos están de acuerdo con la observación previa de que los HKC han alterado el metabolismo celular, incluida la producción elevada de lactato en comparación con los HCF. Además, los resultados mostrados sugieren que la Q modula la señalización fibrótica en HKCs al alterar el metabolismo celular y reducir la producción de lactato. Los análogos de lactato, incluido el atrolactato y el fenillactato, que se forman principalmente a partir del metabolismo del lactato y la fenilalanina, aumentaron significativamente en los HCF después del tratamiento con Q, lo que sugiere que la Q inhibe el transporte de cualquier lactato producido por los HCF normales, lo que da lugar a la acumulación de metabolitos de lactato citoplasmático. La falta de aumento tanto de atrolactato como de fenillactato en HKCs sugiere que la Q inhibe directamente la producción elevada de lactato en estas células. Por lo tanto, es plausible postular que el fenotipo HKC puede corregirse alterando el metabolismo para promover un ensamblaje de ECM normal. Esta hipótesis está respaldada por estudios previos que muestran la importancia que puede tener el metabolismo en la enfermedad de KC.

La fibrosis corneal es una característica común asociada con la patología de KC y también es un problema clínico importante con una sola opción de tratamiento en la actualidad: el trasplante de córnea. Los estudios indican que la Q es un inhibidor potencial novedoso de la señalización antifibrótica y postula su potencial para atenuar la formación de cicatrices en KC y otras enfermedades asociadas con la fibrosis. Como hemos informado anteriormente, los HKC se diferencian terminalmente en miofibroblastos con expresión elevada de  $\alpha$ -SMA y Col III. En el estudio actual, avanzamos nuestro conocimiento al vincular los marcadores fibróticos clave con los niveles elevados de lactato y demostrar cómo éstos pueden ser responsables de promover el fenotipo HKC y el estado celular alterado. Según nuestros hallazgos, el exceso de lactato exógeno puede inducir a los HCF a experimentar una diferenciación terminal a un fenotipo fibrótico similar al observado en HKC con características fibróticas.

En conjunto, los datos muestran que la Q es un potente inhibidor de los marcadores fibróticos clave y un regulador metabólico fuerte en KC y resalta su potencial como agente terapéutico en el tratamiento de la cicatrización corneal asociada a KC. La dilucidación de la asociación entre los efectos antioxidantes de la Q y la secreción de lágrimas es crucial para prevenir y / o tratar la enfermedad del ojo seco, ya que se supone que es cada vez más frecuente.



## BIBLIOGRAFÍA

Chen, Y., Li, X., Xing, N. et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis *in vitro*(2008) 246: 373. doi.org/10.1007/s00417-007-0728-9

Herrera-Hernández M. G., Ramon E., Lupala C. S., Tena-Campos M., Pérez J. J., Garriga P. (2017) Flavonoid allosteric modulation of mutated visual rhodopsin associated with retinitis pigmentosa from www.nature.com/scientificreports

Kalt W., Hanneken A., Milbury P. (2010) Recent Research on Polyphenolics in Vision and Eye Health J. Agric. Food Chem. , 58, 4001–4007 doi:10.1021/jf903038r

Ke Yao,<sup>1,2</sup> Huiying Rao,<sup>2,3</sup> Renyi Wu,<sup>1</sup> Xiajing Tang,<sup>1</sup> Wen Xu. Expression of Hsp70 and Hsp27 in lens epithelial cells in contused eye of rat modulated by thermotolerance or quercetin (2006); 12:445-50

Kozłowska A., Szostak-Węgierek D. (2014) Flavonoids-Food sources and Health Benefits Rocz Panstw Zakl Hig 2014;65(2):79-85

Margrit Hollborn, Department of Ophthalmology and Eye Hospital, University of Leipzig, Faculty of Medicine (2014) Effects of the vegetable polyphenols epigallocatechin-3-gallate, luteolin, apigenin, myricetin, quercetin, and cyanidin in primary cultures of human retinal pigment epithelial cells, 2014; 20: 242–258.

McKay T., Sarker-Nag A., Lyon D., Asara J. M., and Karamichos D. (2015) Quercetin modulates keratoconus metabolism *in vitro* Cell Biochem unct. 33(5): 341–350. doi:10.1002/cbf.3122.

Pei Zhuang., Yi Shen., Baoqin Lin., Wanyu Zhang., George C.Y. Chiou .(2011) Effect of Quercetin on Formation of Choroidal Neovascularization (CNV) in Age-related Macular Degeneration (AMD) 1000-4432.

Qian Lu, Meng Hao of Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004 China (2017), Los efectos de la catarata antidiabética de la gbe, la rutina y la quercetina están mediados por la inhibición del estrés oxidativo y la ruta del poliol, procedenciadoi:https://doi.org/10.18388/abp.2016\_1387

Rui Chen, Margrit Hollborn, Antje Grosche, Andreas Reichenbach, Peter Wiedemann, Andreas Bringmann, and Leon Kohen, Efectos de los polifenoles vegetales, epigallocatequina-3-galato, luteolina, apigenina, myricetin, quercetina y cianidina en cultivos primarios de células epiteliales de pigmento de la retina humana.(2014); 20: 242–258.

Sedat Arıkan, İsmail Ersan Turan Karaca, Selcuk Kara, Baran Gencer, İhsan Karaboga, Tufan Hasan Ali. (2015) Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model, issn 0004-2749 doi.org/10.5935/0004-2749.20150026

Stefek M. (2011) Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. Interdiscip Toxicol 4:69-77. doi: 10.2478/v10102-011-0013-y Published online in: www.intertox.sav.sk & www.versita.com/science/medicine/it/

T. B. McKay, D. Lyon, A. Sarker-Nag, S. Priyadarsini, J. M. Asara , & D. Karamichos, *Scientific Reports* volume 5, (2015) Quercetin Attenuates Lactate Production and Extracellular Matrix



Secretion in Keratoconus, doi: 10.1038/srep09003 Published online in:  
[www.nature.com/articles/srep09003](http://www.nature.com/articles/srep09003)

Vicente-Vicente L., Prieto M., Morales A. (2013) Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio Rev. Toxicol. 30: 171-181

Xiao-Guang Cao; Xiao-Xin Li; Yong-Zhen Bao; Nian-Zeng Xing; Yi Chen , Investigative Ophthalmology & Visual Science August 2007, Vol.48, 3714-3718. doi:10.1167/iovs.06-1304, Responses of Human Lens Epithelial Cells to Quercetin and DMSO, from <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2184158>

YongWang,LiangZhao, ChengtaoWang, JimeiHu, XiaoxuanGuo, DiZhang, WeiWu, FengZhouBaopingJi, Journal of Functional Foods, (2017), Efecto protector de la quercetina y el ácido clorogénico, dos polifenoles ampliamente presentes en las variedades de plantas comestibles, sobre la degeneración de la retina inducida por luz visible in vivo,doi: [doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.034](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.034) Published online in: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617301056](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617301056)

Yoon JS., Chae MK., Lee SY.(2012) Anti-inflammatory effect of quercetin in a whole orbital tissue culture of Graves' orbitopathy British Journal of Ophthalmology 96:1117-1121.