



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de Doctorado 3102 - Biomedicina y Biotecnología

**APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO AL ESTUDIO EN
TIEMPO REAL DE LAS INTERACCIONES ENTRE
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO EN EL
ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR XENOBIÓTICOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
BEATRIZ JÁVEGA MARTÍNEZ

Dirigida por:
JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR BLASCO
GUADALUPE HERRERA MARTÍN

Tutor:
GERARDO LÓPEZ RODAS

València, abril 2022

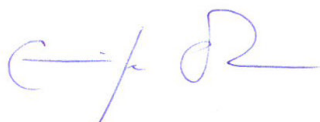
D. José Enrique O'Connor Blasco, Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

Dña. Guadalupe Herrera Martín, Responsable de la Unidad de Citómica de la Unitat Central d'Investigació de Medicina de la Universitat de València,

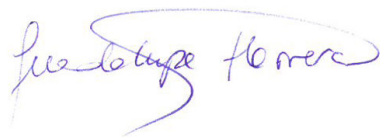
CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO AL ESTUDIO EN TIEMPO REAL DE LAS INTERACCIONES ENTRE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR XENOBIÓTICOS", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Beatriz Jávega Martínez, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 19 de abril de 2022.



Fdo. José Enrique O'Connor Blasco



Fdo. Guadalupe Herrera Martín

*Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más para temer menos.*

Marie Curie

Agradecimientos

La elaboración de esta Tesis no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas que de una u otra forma han contribuido en este trabajo y a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A mis directores, el Dr. José Enrique O'Connor y la Dra. Guadalupe Herrera por haber depositado su confianza en mí y haberme mostrado las herramientas con las que convertirme en una buena científica. Gracias Enrique por enseñarme el mundo de la citometría y poder formar parte de tu equipo. La experiencia adquirida durante estos años en cursos y congresos me ha permitido madurar profesionalmente. Gracias Guadalupe por transmitirme la pasión por la investigación, por todos los buenos momentos compartidos y por tus innumerables consejos.

A Susana, que me acompañó y me ayudó en mis comienzos en el laboratorio.

A Pau y Manu, por los buenos momentos vividos en el laboratorio y fuera de él.

A mis compañeros del CIPF, Ali y Domingo, por su ayuda y consejos.

A Mar, mi compañera con la que he compartido congresos y cursos.

A los compañeros del Laboratorio de Citometría, Salva, Ali, Americo, Miguel Ángel, Natalia, Álvaro, Deborah, Juan, Valentín, Damián, Kelly, Ángela, Nieves y Dani. Guardo un buen recuerdo de cada uno de vosotros. En especial, a Esther, Julián, Alberto y Christian por su compañía, amistad y ayuda en los largos días en el laboratorio. Por los buenos momentos vividos. He aprendido de cada uno de vosotros. Todos habéis contribuido de una manera u otra a que pudiese llegar hasta este momento.

A Paco, por sus rápidas visitas y sus consejos.

A Marcelino, mi vecino del laboratorio, por esos ratos y conversaciones que hemos compartido.

A Paula y Lidia, por su especial amistad y colaboración incondicional.

A Juanjo, por ser mi confidente en tantas horas en el laboratorio.

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Lucía, Mari Carmen, Sonia, Carmen, Zahara, Fede, Ernesto, Ana, Rocío... Por su apoyo, ayuda y constante ánimo.

Dedicárselo en especial a mi familia. A mis padres, Rafael y Pepi, por su comprensión, su afecto, su confianza, su amor y por el esfuerzo invertido para que pudiese estudiar y formarme en lo que quería. A mi hermana Almudena por animarme, ayudarme en todo lo posible siempre y por estar siempre a mi lado. A Frodo y Sansa, por alegrarme los días. A Irene, por el interés y el cariño que me has dado durante este recorrido. A mi abuelo Pascual. A mis primos, amigos, tías y tíos, suegros, cuñados, abuelos y sobrino. Gracias a todos.

A Álvaro por su cariño, complicidad, apoyo y ayuda. Por estar siempre a mi lado.

Gracias a todos por estos años de doctorado que son inolvidables.

Índice



Índice de Figuras y Tablas	11
Abreviaturas, siglas y acrónimos	29
RESUMEN	39
ABSTRACT	41
Introducción	45
1. Radicales libres y especies reactivas	47
1.1. Especies reactivas del Oxígeno	47
1.2. Otras proteínas reactivas	50
1.3. Fuentes celulares de ROS y RNS	52
1.3.1. Fuentes endógenas	52
1.3.2. Fuentes exógenas	57
1.4. Propiedades químicas de ROS y RNS	58
1.5. Efectos lesivos de las ROS y RNS sobre estructuras y funciones celulares	63
2. Sistemas antioxidantes	66
2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	67
2.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	72
3. Estrés oxidativo	74
3.1. Definición de estrés oxidativo	75
3.2. El estrés oxidativo como mecanismo de regulación celular	76
4. Estrés oxidativo en bacterias: <i>Escherichia coli</i>	80
4.1. Fuentes de ROS en bacterias	81
4.2. Efectos lesivos de las ROS en bacterias	82
4.2.1. Efectos lesivos sobre enzimas	82

Índice

4.2.2. Mutagénesis y su reparación	84
4.2.3. Peroxidación lipídica	85
4.3. Sistemas antioxidantes en bacterias	86
4.4. Regulación de la respuesta al estrés en <i>E. coli</i>	89
4.4.1. Regulación de la respuesta al estrés general	89
4.4.2. Regulación de la respuesta al estrés oxidativo	91
4.4.2.1. Regulador SoxRS de la respuesta al estrés por superóxido	92
4.4.2.2. OxyR, regulador de peróxido de hidrógeno	99
4.4.3. Regulación de la respuesta al estrés nitrosativo	110
5. Citometría de flujo como método de estudio	112
Hipótesis y Objetivos	117
Material y métodos	123
1. Material biológico	125
1.1. Líneas celulares y medios de cultivo rutinario	125
1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo rutinarios	125
2. Reactivos	127
2.1. Sondas y sustratos fluorogénicos de estrés oxidativo y nitrosativo	127
2.2. Fluorocromos para la determinación de viabilidad celular	132
2.3. Xenobióticos y compuestos de control	134
2.3.1. Xenobióticos generadores de peróxidos intracelulares	134
2.3.2. Xenobióticos generadores de superóxido intracelular	135
2.3.3. Otros inductores de estrés oxidativo	135
2.3.4. Xenobióticos donadores de Óxido Nítrico	136

2.3.5. Antioxidantes solubles	137
2.3.6. Inhibidores enzimáticos	137
3. Citómetros de Flujo	138
3.1. Gallios	138
3.2. Accuri C6	139
3.3. Configuración óptica de los citómetros	139
3.4. Procedimientos generales de los análisis citométricos	139
4. Métodos con células eucarióticas	140
4.1. Determinación de la viabilidad en células Jurkat	140
4.2. Titulación de los sustratos fluorogénicos en las células Jurkat	141
4.3. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con peróxidos exógenos	143
4.4. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con generadores de superóxido	144
4.5. Determinación de estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con generadores de óxido nítrico	145
4.6. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con antioxidantes e inhibidores enzimáticos	145
4.7. Determinación de estrés oxidativo y nitrosativo en tiempo real en células N13	146
4.8. Determinación de las interacciones entre sustratos fluorogénicos en las líneas celulares Jurkat y N13	147
5. Métodos con <i>E. coli</i>	148
5.1. Determinación en disco de la inhibición de crecimiento en placa	148
5.2. Determinación del crecimiento exponencial en las cepas bacterianas	148
5.3. Determinación de la viabilidad bacteriana	149

Índice

5.4. Determinación del crecimiento bacteriano en cepas tratadas con xenobióticos	149
5.5. Determinación del conteo bacteriano en cepas tratadas xenobióticos	149
5.6. Determinación de la viabilidad con SYTO9 y DiBAC ₄ (3)	150
5.7. Titulación de los sustratos fluorogénicos en bacterias	150
5.8. Determinación de estrés oxidativo en cepas bacterianas tratadas con xenobióticos	151
6. Análisis estadístico	152
Resultados	155
1. Ensayos por CMF de viabilidad en células Jurkat para cuantificar la citotoxicidad y establecer las dosis de xenobióticos prooxidantes	157
1.1. Cuantificación de la citotoxicidad de peróxidos exógenos	158
1.2. Cuantificación de la citotoxicidad de generadores de superóxido	160
2. Optimización de ensayos citométricos de tiempo final para evaluar la generación de ROS en suspensiones celulares tratadas con prooxidantes exógenos	161
2.1. Titulación de sustratos fluorogénicos para la determinación de ROS en suspensiones celulares	161
2.2. Ensayos citométricos de generación de ROS en cultivos celulares tratados con peróxidos exógenos	166
2.2.1. Efecto del H ₂ O ₂ exógeno sobre los niveles intracelulares de ROS	166
2.2.2. Efecto de t-BOOH sobre el estrés oxidativo	169
2.2.3. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo	172
2.3. Niveles celulares de ROS en cultivos celulares tratados con generadores de ión superóxido	174
2.3.1. Efecto de menadiona sobre el estrés oxidativo	174
2.3.2. Efecto de plumbagina sobre el estrés oxidativo	177

2.4. Ensayos de estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con xenobióticos donadores de óxido nítrico y peroxinitrito	181
2.4.1. Estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con DEA NONOato	181
2.4.2. Estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con SIN-1	182
2.5. Determinación por CMF del efecto de antioxidantes e inhibidores del estrés oxidativo	185
2.5.1. Efecto de N-acetilcisteína	185
2.5.2. Efecto de la inhibición de SOD sobre los niveles de fluorescencia de los sustratos fluorogénicos en condiciones de generación de ión superóxido	187
2.5.3. Efecto de la inhibición de catalasa sobre los niveles de fluorescencia de los sustratos fluorogénicos en condiciones de niveles elevados de H ₂ O ₂	188
3. Ensayos por RT-CMF con sustratos fluorogénicos para determinar la generación de ROS y RNS en suspensiones celulares tratadas con prooxidantes y dadores de óxido nítrico exógenos	189
3.1. Ensayos por citometría de flujo en tiempo real de estrés oxidativo inducido por sustancias prooxidantes	189
3.1.1. Efecto de H ₂ O ₂ sobre el estrés oxidativo en cinética	190
3.1.2. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo en cinética	191
3.1.3. Efecto de propranolol sobre el estrés oxidativo en cinética	192
3.1.4. Efecto de plumbagina sobre el estrés oxidativo en cinética	193
3.1.5. Efecto de epinefrina sobre el estrés oxidativo en cinética	195
3.1.6. Efecto de FCCP sobre el estrés oxidativo en cinética	196
3.2. Análisis cinético de la generación intracelular de óxido nítrico	197
4. Interferencias de sustratos fluorogénicos entre sí y con el sistema biológico en ensayos multiparamétricos de estrés oxidativo por CMF y RT-FCM	198
4.1. Efecto de H ₂ O ₂ sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de	

Índice

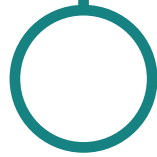
ROS	198
4.2. Efecto de t-BOOH sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	202
4.3. Efecto de CHP sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	205
4.4. Efecto de menadiona sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	208
4.5. Efecto de plumbagina sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	210
4.6. Efecto de propranolol sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	215
4.7. Efecto de epinefrina sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	216
4.8. Efecto de FCCP sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS	218
5. Análisis por CMF de biosensores bacterianos para detectar el estrés oxidativo mediante el uso de cepas bacterianas deficientes en genes de la defensa antioxidante	219
5.1. Análisis de los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano	220
5.2. Evaluación del crecimiento exponencial en las diferentes cepas bacterianas	221
5.3. Análisis de la viabilidad bacteriana por adición de compuestos prooxidantes	223
5.3.1. Análisis de la viabilidad con PI	223
5.3.2. Análisis de la viabilidad por recuento de colonias y densidad óptica	226
5.3.3. Análisis de la viabilidad con SYTO9 y DiBAC ₄ (3)	230
5.4. Titulación de sustratos fluorogénicos para la determinación de ROS en bacterias	233
5.5. Niveles celulares de ROS en cepas de <i>E. coli</i> tratadas con prooxidantes exógenos	235

5.5.1. Efecto de H ₂ O ₂ sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	236
5.5.2. Efecto de t-BOOH sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	239
5.5.3. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	243
5.5.4. Efecto de menadiona sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	246
5.5.5. Efecto de paraquat sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	248
Discusión	251
1. Consideraciones sobre el diseño experimental	253
2. Modelo de estrés oxidativo inducido en células Jurkat	254
3. Modelo de estrés oxidativo inducido en cepas de <i>E. coli</i> WP2	256
4. Xenobióticos modelo elegidos como inductores exógenos de estrés oxidativo	259
4.1. H ₂ O ₂	259
4.2. Peróxidos orgánicos	260
4.3. Compuestos que generan superóxido por redox cycle	260
4.4. Consideraciones acerca de la potencia citotóxica de los diferentes compuestos modelo	262
5. Fluorocromos y sustratos fluorogénicos elegidos para la determinación de ROS y RNS	266
5.1. Titulación de fluorocromos:	267
5.2. Consideraciones sobre los resultados	268
5.3. Relevancia de los controles positivos y negativos en el estudio:	273
5.4. Relevancia de los resultados obtenidos en el uso de cepas de <i>E. coli</i>	275
6. Relevancia de los resultados en los modelos de estrés nitrosativo	277

Índice

7. Relevancia del análisis cinético por CMF y problemas encontrados en su aplicación	279
7.1. Puesta en contexto de los ensayos cinéticos de estrés oxidativo	279
8. Problemas encontrados en los ensayos multiparamétricos de estrés oxidativo	279
9. Integración de las estrategias citómicas en el análisis de estrés oxidativo	284
9.1. Propuesta de paneles de análisis in vitro de ROS y RNS por CMF	289
Conclusiones	293
Bibliografía	297

Índice de Figuras y Tablas



- Figura 1:** Los estados redox del O_2 con potenciales de reducción estándar. La concentración estándar de O_2 se consideró como 1 M. Tomada de Sen and Imlay, 2021. 48
- Figura 2:** Fuentes celulares de producción de ROS y RNS. Los diferentes orgánulos y componentes celulares contribuyen a la producción de una amplia variedad de especies reactivas. 57
- Figura 3:** Enzimas involucradas en la generación e inactivación de ROS y RNS. El $O_2^{\cdot-}$ se puede convertir en H_2O_2 mediante la SOD. El H_2O_2 puede dar lugar al OH^{\cdot} a través de la reacción de Fenton. El OH^{\cdot} puede generar RO^{\cdot} Y ROO^{\cdot} . El H_2O_2 se puede desintoxicar a través de la GPx, la catalasa o Trx. La enzima MPO puede usar H_2O_2 para oxidar el cloruro a HOCl. 67
- Figura 4:** Cronograma de los conceptos de estrés y respuestas adaptivas al estrés. Tomada de Sies et al., 2017. 75
- Figura 5:** Representación esquemática de la clasificación de las tensiones oxidativas basadas en el tiempo. Tomada de Lushchak and Storey, 2021. 76
- Figura 6:** Concentraciones estimadas de H_2O_2 con respecto a las respuestas celulares. La coloración verde y roja denotan respuestas predominantemente beneficiosas (eustress) o perjudiciales (distress) respectivamente. Adaptada de Sies and Jones, 2020. 77
- Figura 7:** Mecanismo de Keap1-Nrf2. En condiciones de estrés oxidativo, las ROS desencadenan la activación de múltiples vías que inducen la expresión de Nrf2 para impulsar la transcripción de genes antioxidantes. Tomada de Rahman et al., 2021. 79
- Figura 8:** Las fuentes exógenas (bacterias del ácido láctico, macrófagos, tioles y metales reducidos) y las fuentes endógenas (fuga de electrones de enzimas redox y compuestos de redox cycle) generan ROS. Tomada de Khademian and Imlay, 2021. 81
- Figura 9:** El daño oxidativo y la reparación de enzimas: (A) deshidratasa dependientes de Fe-S y (B) mononucleares de Fe. Tomada de Khademian and Imlay, 2021. 84
- Figura 10:** Mecanismos enzimáticos de degradación de ROS. Además de SOD y catalasa, otros sistemas enzimáticos intervienen para desintoxicar los radicales como el sistema de GSH y el sistema de Trx. Tomada de Staerck et al., 2017. 88
- Figura 11:** (A) Estructura de rayos X del complejo promotor SoxR – soxS. (B) Estructura cristalográfica de SoxR. Se muestra el clúster $[2Fe-2S]$. Tomada de Fujikawa et al., 2012.

	94
Figura 12: Mecanismo de activación de SoxR por $O_2^{\cdot-}$. Tomada de Pomposiello and Demple, 2001.	95
Figura 13: (A) Forma reducida y (B) oxidada de OxyR. Tomada de Choi et al., 2001.	103
Figura 14: Mecanismo de activación de OxyR por H_2O_2 . Tomada de Dubbs and Mongkolsuk, 2012.	104
Figura 15: Flujo de H_2O_2 en <i>E. coli</i> . El H_2O_2 se difunde gradualmente en el citoplasma, donde es degradado por AhpCF y catalasa. En condiciones hipóxicas, OxyR induce la Ccp, que permite que la cadena respiratoria emplee H_2O_2 como oxidante terminal. Tomada de Sen and Imlay, 2021.	107
Figura 16: Modelo de respuesta al estrés oxidativo por H_2O_2 . Las proteínas en azul son inducidas por OxyR. Dps, YaaA y Fur colaboran para reducir los niveles de Fe. En cambio, MntH, Suf, y HemH aseguran la activación continua de enzimas Fe-S cuando el Fe es escaso. Tomada de Sen et al., 2020.	108
Figura 17: Regulación de la S-nitrosilación de OxyR. Tomada de Seth et al., 2019.	111
Figura 18: Mecanismo de desesterificación de DCFH-DA a DCFH y posterior conversión en DCF. Modificada de Gomes et al., 2005.	127
Figura 19: Conversión de DHR123 a rodamina 123. Tomada de Halliwell and Whiteman, 2004.	128
Figura 20: Conversión de HE a etidio. Tomada de Halliwell and Whiteman, 2004.	129
Figura 21: Oxidación de MitoSox Red por parte de $O_2^{\cdot-}$. Tomada de Thermofisher 2022a.	130
Figura 22: Esquema de reacción para la detección de NO por DAF-FM DA. Tomada de Thermofisher 2022a.	131
Figura 23: Estrategia de análisis de los ensayos citómicos.	157
Figura 24: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de H_2O_2 sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3).	158

Figura 25: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de t-BOOH sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 159

Figura 26: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de CHP sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 159

Figura 27: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de (A) menadiona y (B) plumbagina sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 160

Figura 28: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 163

Figura 29: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) CellROX Green y (B) CellROX Orange. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 164

Figura 30: Ratio de las intensidades de fluorescencias del fluorocromo CellRox Deep Red. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 165

Figura 31: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) Oxidative Stress Green y (B) Superoxide Orange. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 165

Figura 32: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 167

Figura 33: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 168

Figura 34: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en las células Jurkat expuestas a diferentes

Índice de tablas y figuras

concentraciones de H₂O₂. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

169

Figura 35: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

170

Figura 36: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

171

Figura 37: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en células Jurkat expuestas a 1000 µM de t-BOOH. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

172

Figura 38: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

173

Figura 39: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

174

Figura 40: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

175

Figura 41: Ratio de los fluorocromos DCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

176

Figura 42: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en las células Jurkat expuestas a 50 μ M de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 177

Figura 43: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 178

Figura 44: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 179

Figura 45: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de (A) H_2O_2 , (B) t-BOOH, (C) CHP, (D) menadiona y (E) plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 180

Figura 46: Ratio de los fluorocromos DAF-FM, DHR123, MitoPY1 y Oxidative Stress Green en células Jurkat expuestas a 250 μ M de DEA NONOato. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 182

Figura 47: Ratio del fluorocromo DHR123 en células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 183

Figura 48: Ratio de los fluorocromos DHR123, HE, DAF-FM y Oxidative Stress Green en células Jurkat expuestas a 400 μ M de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 184

Figura 49: Ratio del fluorocromo DHDCF en células Jurkat expuestas a (A) 250 μ M de DEA NONOato y (B) a 400 μ M de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$). 185

Figura 50: Ratio del fluorocromo (A) MitoPY1 en células Jurkat expuestas a 1000 μ M de

Índice de tablas y figuras

H₂O₂ en presencia o ausencia de 5 mM de NAC y ratio del fluorocromo (B) MitoSox Red en células Jurkat expuestas a 50 µM de menadiona en presencia o ausencia de 5 mM de NAC. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 186

Figura 51: Ratio del fluorocromo DHR123 en células Jurkat expuestas a 100 µM de CHP en presencia o ausencia de 5 mM de NAC. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 187

Figura 52: Ratio del fluorocromo MitoSox Red en células Jurkat expuestas a 50 µM de menadiona en presencia o ausencia de DETC. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 188

Figura 53: Ratio del fluorocromo MitoPY1 en células Jurkat expuestas a 1000 µM H₂O₂ en presencia o ausencia de 3-AT. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 189

Figura 54: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 44 mM de H₂O₂. Se muestran la media ± SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 191

Figura 55: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 26,3 mM de CHP. Se muestran la media ± SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 192

Figura 56: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 5 mM de propanolol. Se muestran la media ± SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 193

Figura 57: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante

la cinética de las células N13 tras la adición de 0,19 mM de plumbagina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 194

Figura 58: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 19 mM de epinefrina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 195

Figura 59: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 50 μ M de epinefrina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 196

Figura 60: Ratio de los fluorocromos DAF-FM y DHR123 durante la cinética de las células N13 tras la adición de 250 μ M de NOR-1. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 197

Figura 61: Ratio de los fluorocromos (A) MitoPY1 y (B) DHDCF solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 1000 μ M de H_2O_2 . Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 200

Figura 62: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 44 mM de H_2O_2 . Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 201

Figura 63: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF y (B) DHR123 solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 1000 μ M de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 204

Figura 64: Ratio de los fluorocromos (A) DHR123 y (B) MitoSox Red solos o combinados

Índice de tablas y figuras

con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 100 μM de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 206

Figura 65: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 26,3 mM de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 208

Figura 66: Ratio del fluorocromo MitoSox Red solo o combinado con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 50 μM de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 209

Figura 67: Ratio del fluorocromo HE solo o combinado con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 50 μM de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 212

Figura 68: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 0,19 mM de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 214

Figura 69: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 5 mM de propranolol. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 215

Figura 70: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 19 mM de epinefrina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). 217

Figura 71: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red

solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 50 μ M de FCCP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 218

Figura 72: Curvas de crecimiento microbiano de *E. coli* cultivadas a 37°C. (A) DO₆₀₀ obtenida en función del tiempo de las cepas IC188, IC203 e IC5233 y (B) DO₆₀₀ obtenida en función del tiempo de las cepas IC188, IC5228, IC5228 e IC5232. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 222

Figura 73: Ensayo de PI para determinar la IC₅₀ de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar el efecto de H₂O₂ sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC₅₀ y R² obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 223

Figura 74: Ensayo de PI para determinar la IC₅₀ de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar el efecto de t-BOOH sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC₅₀ y R² obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 224

Figura 75: Ensayo de PI para determinar la IC50 de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar el efecto de CHP sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC₅₀ y R² obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 225

Figura 76: (A) Análisis de la viabilidad con los fluorocromos PI y Helix NP Green de la cepa IC188 tratada con menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). (B) Dot-plot de FSS vs SSC de la cepa IC188 en diferentes condiciones: IC188 sin menadiona, IC188 tratada con 2,53 mM de menadiona e IC188 control de DMSO. 226

Figura 77: Curvas de crecimiento bacteriano de la cepa IC188 tratada con (A) t-BOOH o (B). Los resultados son la media \pm SD (n = 3). 227

Figura 78: Curva de crecimiento de la cepa IC188 tratada con t-BOOH expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3). 228

Índice de tablas y figuras

Figura 79: Curva de crecimiento de las cepas (A) IC188, (B) IC5233 e (C) IC203 tratadas con menadiona expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3). 229

Figura 80: Curva de crecimiento de las cepas (A) IC188, (B) IC5228, (C) IC5229 e (D) IC203 tratadas con paraquat expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3). 230

Figura 81: Dot-plots de SYTO9 vs PI de la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Para cada dot-plot se realizan las siguientes regiones: debris, vivas, intermedias y muertas. 231

Figura 82: Dot-plots de DiBAC₄(3) vs PI de la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Para cada dot-plot se realizan las siguientes regiones: DiBAC₄(3)- PI-, DiBAC₄(3)⁺ PI- y DiBAC₄(3)⁺ PI⁺. 232

Figura 83: Ratio de las intensidades de fluorescencias de la cepa IC188 expuesta a 10mM de t-BOOH de los fluorocromos (A) DHDCF y (B) MitoPY1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 234

Figura 84: Ratio de las intensidades de fluorescencias de la cepa IC5233 expuesta a 0,29 mM de menadiona del fluorocromo HE. Los resultados son la media \pm SD (n=3). 235

Figura 85: Ratio de DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes dosis de H₂O₂. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 237

Figura 86: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCF, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 239

Figura 87: Ratio de los fluorocromos DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 241

Figura 88: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCF, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los

resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 242

Figura 89: Ratio de los fluorocromos DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 244

Figura 90: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCF, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 245

Figura 91: Ratio del fluorocromo HE en las cepas (A) IC188, IC5228 e IC5229 y (B) IC188, IC203, IC5232 e IC5233 y expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 246

Figura 92: Comparación del ratio del fluorocromo HE entre las cepas IC188, IC203, IC5232 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 247

Figura 93: Ratio del fluorocromo DHDCF y comparación del ratio entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 248

Figura 94: Ratio del fluorocromo HE y comparación del ratio entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de paraquat. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001). 249

Figura 95: Esquema de las modificaciones genéticas inducidas por nuestro laboratorio en la cepa salvaje IC188 para obtener las cepas IC203 (deficiente en OxyR) e IC5233 (deficiente en OxyR, MnSOD y FeSOD). 258

Figura 96: Esquema del redox cycling del paraquat y su biperidinio homólogo diquat. Tomado de Fussell et al., 2011. 261

Figura 97: Esquema de ciclo redox para una quinona genérica. Tomada de Johnston, 2011. 262

Figura 98: Efecto de la menadiona sobre las variaciones en los cocientes de fluorescencia de las sondas fluorescentes cuando se utilizan en parejas. La presencia del fluorocromo de la fila afecta a la sonda de la columna. El color de las celdas indica el efecto de la interacción de una pareja de fluorocromos en relación con el cociente de fluorescencia de la sonda de la columna analizada individualmente. Las celdas en verde indican un aumento del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas rojas indican una disminución del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas azules indican ausencia de efecto del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. 281

Figura 99: Efecto de la plumbagina sobre las variaciones en los cocientes de fluorescencia de las sondas fluorescentes cuando se utilizan en parejas. La presencia del fluorocromo de la fila afecta a la sonda de la columna. El color de las celdas indica el efecto de la interacción de una pareja de fluorocromos en relación con el cociente de fluorescencia de la sonda de la columna analizada individualmente. Las celdas en verde indican un aumento del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas rojas indican una disminución del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas azules indican ausencia de efecto del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. 282

Figura 100: Principales vías de ROS y RNS. 286

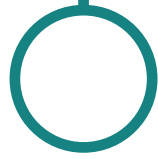
Tabla 1: Especies reactivas. Adaptada de Sies et al., 2017.	51
Tabla 2: Características de las diferentes especies reactivas de O ₂ y N ₂ . Adaptada de Phaniendra et al., 2015.	63
Tabla 3: Genes inducidos por SoxRS Tomada de <i>Imlay et al 2008</i> .	96
Tabla 4: Genes inducidos por oxyS. Tomada de Altuvia et al., 1997.	100
Tabla 5: Genes regulados por OxyR. Tomada de Sen and Imlay, 2021.	101
Tabla 6: Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en esta Tesis Doctoral.	126
Tabla 7: Resumen de los sustratos fluorogénicos y las sondas utilizadas para determinar ROS y RNS.	132
Tabla 8: Resumen de los reactivos utilizados para determinar viabilidad celular.	134
Tabla 9: Resumen de los xenobióticos y moléculas de control utilizadas.	137
Tabla 10: Características de los fluorocromos empleados en las células Jurkat. Abreviaturas: dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF).	142
Tabla 11: Características de los fluorocromos empleados en los ensayos citómicos las células N13.	146
Tabla 12: Características de los xenobióticos empleados en los ensayos citómicos las células N13.	147
Tabla 13: Características y concentraciones de los fluorocromos empleados en los cultivos bacterianos.	151
Tabla 14: Resumen de los cocientes de fluorescencia de las fluorocromos solos y combinados.	199
Tabla 15: Resumen de los cocientes de fluorescencia de las fluorocromos solos y combinados.	202
Tabla 16: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	203
Tabla 17: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	206
Tabla 18: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	209

Índice de tablas y figuras

Tabla 19: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	211
Tabla 20: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	213
Tabla 21: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	216
Tabla 22: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	217
Tabla 23: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.	219
Tabla 24: Sensibilidad de las diferentes cepas a oxidantes exógenos en el test de inhibición de crecimiento. Los resultados son la media \pm SD (n=3).	220
Tabla 25: Porcentajes del análisis de los fluorocromos SYTO9 vs PI y DiBAC ₄ (3) vs PI de la cepa IC188 expuesta con diferentes dosis de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3).	232
Tabla 26: Porcentajes del análisis de los fluorocromos SYTO9 vs PI y DiBAC ₄ (3) vs PI de la cepa IC5233 expuesta con diferentes dosis de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3).	233
Tabla 27: Resumen de las concentraciones empleadas en los ensayos citómicos en las células Jurkat.	255
Tabla 28: Comparación entre la lipofiliidad (Kow) de los compuestos modelo empleados y su citotoxicidad en células Jurkat y en las cepas de <i>E.coli</i> WP2. Los valores del coeficiente de reparto se expresan en forma logarítmica (Log P).	265
Tabla 29: Resumen semicuantitativo de los valores de ratio para cada pareja sonda fluorescente/oxidante en función de los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo de tiempo final sobre las células Jurkat. Símbolos: (-): Ratio de 1 a 2; (+): Ratio de 2 a 5; (++) : Ratio de 5 a 15; (+++) : Ratio de 15 a 30; (++++): Ratio de 30 a 60.	269
Tabla 30: Resumen semicuantitativo de los valores de ratio para cada pareja sonda fluorescente/oxidante en función de los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo de tiempo final sobre las cepas bacterianas IC188 (Control), IC203 (deficiente en <i>oxyR</i>) e IC5233 (deficiente en <i>oxyR</i> , <i>sodA</i> y <i>sodB</i>). Símbolos: (-): Ratio de 1 a 2; (+): Ratio de 2 a 5; (++) : Ratio de 5 a 15; (+++) : Ratio de 15 a 30; (++++): Ratio de 30 a 60. ND: No determinado.	269
Tabla 31: Características de un marcador fluorescente ideal para detectar ROS (Woolley	

et al., 2013). 285

Tabla 32: Resumen de recomendaciones para el diseño de paneles de estudio in vitro de estrés oxidativo, basadas en los resultados obtenidos sobre células Jurkat, N13 y cepas de *E. coli* WP2. 290



Abreviaturas, siglas y acrónimos

$^1\text{O}_2$: singlete oxígeno molecular

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol

4-HNE: 4-hidroxinonenal

AhpCF: alquil hidroperóxido reductasa

AP-1: proteína activadora 1

APD: fotodiodos de avalancha

Arc: control de la respiración aeróbica

ARE: elemento de respuesta antioxidante

Bfr: bacterioferritina

Br: bromo atómico

BrO: hipobromito

Ccp: peroxidasa periplásmica del citocromo c

CHP: hidroperóxido de Cumeno

Cl: cloro atómico

ClO: hipoclorito

CMF: citometría de flujo

COVID-19: coronavirus 2019

COX: ciclooxigenasa

Crp: proteína del receptor cAMP

CuZnSOD: superóxido dismutasa de cobre y zinc

CYP: citocromo P450

Cys: cisteína

DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato

Abreviaturas, siglas y acrónimos

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEA NONOato: NONOato de Dietilamina

DETC: sodio dietilditiocarbamato

DHDCF: 2',7'- diclorodihidrofluoresceína Diacetato

DHR123: dihidrorodamina

DiBAC₄(3): bis-(ácido 1,3-dibarbitúrico)-trimetina oxonol

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DNIC: dinitrosil-hierro-ditiol unidos a proteínas

E. coli: Escherichia coli

ECSOD: superóxido dismutasa extracelular

eNOS: NOS endotelial

EPA: ácido eicosapentaenoico

EPR: resonancia paramagnética electrónica

ETC: cadena de transporte de electrones

EV: vesículas extracelulares

FCCP: carbonilo cianuro- 4 - (trifluorometoxi) fenilhidrazona

FeSOD: superóxido dismutasa de hierro

Fnr: regulador de la reducción de fumaratos y nitratos

FSC: Foward Scatter

Fur: regulador de absorción férrica

G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

Grx: glutarredoxina

GSH: glutatión

GSSH: glutatión oxidado

H₂O: agua

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H₂S: sulfuro de hidrógeno

HO₂·: hidroperoxilo

HE: hidroetidina

HOCl: ácido hipocloroso

HPI: hidropoxidasa I

HPH: hidropoxidasa II

IHF: factor huésped de integración

iNOS: NOS inducible

Keap1: proteína 1 asociada a ECH-Kelch

LA: LB agar

LB: Luria Broth

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MarA: resistencia múltiple a antibióticos

MnSOD: superóxido dismutasa de manganeso

MPO: mieloperoxidasa

mtNOS: NOS mitocondrial

Abreviaturas, siglas y acrónimos

NAC: N-acetilcisteína

NarL/P: proteínas reguladoras de la respuesta de nitrato/nitrito

NiSOD: superóxido dismutasa de níquel

nNOS: NOS neuronal

NO: óxido nítrico

NO⁻: anión nitroxilo

NO₂: dióxido de nitrógeno

NO₂⁻: nitrito

NO₃⁻: nitrato

NOD: NO⁻ dioxigenasa

NOR: reductasa de NO⁻

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: factor de transcripción nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

O₂⁻: anión superóxido

O₂: oxígeno

O₂NOO⁻: peroxinitrato

O₃: ozono

OH: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrito

ONOOCO₂⁻: nitrosoperoxicarbonato

ONOOH: ácido peroxinitroso

PI: yoduro de propidio

PMT: fotomultiplicadores

Prx: peroxirredoxina

RCS: especies reactivas de carbonilo

RES: especies reactivas electrofílicas

RNHCl: cloraminas

RNS: especies reactivas de nitrógeno

RO: radical alcoxilo

ROO: radical peroxilo

ROOH: hidroperóxido

ROS: especies reactivas de oxígeno

RS: radical tilo

RS: tiolato

RSeS: especies reactivas de selenio

RSH: tiol

RSO_3^- : sulfonato

RSS: especies reactivas de azufre

RSSR: disulfuro

RT-CMF: citometría de flujo en tiempo real

SeCys: selenocisteína

SeMet: selenometiomina

SeO_3^{2-} : selenito

SeO_4^{2-} : selenato

Sheath: líquido envolvente

Abreviaturas, siglas y acrónimos

SIN-1: 3-morfolionosinonimina-N-etilcarbamida

SOD: superóxido dismutasa

SSC: Side Scatter

t-BOOH: tert-butil hidroperóxido

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

Trx: tiorredoxina

TrxR: tiorredoxina reducida

UFC: unidades formadoras de colonias

XO: xantina oxidasa

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) presentan un destacado interés para diversos contextos de la medicina experimental y clínica. Ambas especies desempeñan una doble función en los sistemas biológicos aerobios, ya que favorecen tanto procesos metabólicos como celulares, mientras que, dada su acción oxidante, han sido asociadas con numerosas enfermedades, así como con el proceso de envejecimiento. A pesar de la poderosa y compleja maquinaria antioxidante de los organismos superiores, cuando la capacidad de estos mecanismos protectores es superada por la intensidad o duración de los procesos oxidativos, se produce una situación denominada estrés oxidativo, que se define como una alteración en el equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, produciendo daño oxidativo.

El estudio experimental de la actividad y el estrés oxidativo es un aspecto complicado debido a la complejidad de los procesos bioquímicos implicados y por la limitada vida media de las diferentes ROS y RNS que participan en los mismos. La citometría de flujo (CMF) se utiliza con gran frecuencia para el estudio cuantitativo de la generación intracelular de ROS y RNS gracias a la disponibilidad de diversos tipos de sustratos fluorogénicos y fluorocromos. El uso de sondas fluorescentes parece un enfoque simple y fácil para la detección y cuantificación de la producción de ROS y RNS en sistemas celulares. Sin embargo, hay muchas limitaciones y artefactos en esta metodología. Es por ello, que el objetivo principal del presente estudio es evaluar los problemas de especificidad de las sondas fluorescentes y la participación de diferentes ROS en diversas condiciones de estrés oxidativo.

Los estudios citómicos se han desarrollado sobre células eucariotas (líneas celulares Jurkat y N13) y células procariotas (cepas de *Escherichia coli* B deficientes en la defensa antioxidante) con diferentes sustratos fluorogénicos y combinaciones de estos. Para ello se emplean diversos xenobióticos generadores de ROS y RNS. Se desarrollan ensayos por CMF que permiten detectar e interpretar posibles interferencias entre sustratos fluorogénicos y de los sustratos fluorogénicos con el sistema biológico que pueden limitar la aplicabilidad de ensayos multiparamétricos de estrés. Además, para abordar fenómenos temporales relacionados con la generación de ROS y RNS, se emplea la CMF en tiempo real.

Se presenta un estudio en el que ha sido posible diseñar y desarrollar en diferentes modelos experimentales, ensayos por CMF que permiten medir la generación de ROS

y RNS con diferentes sustratos fluorogénicos en suspensiones celulares tratadas con diversos xenobióticos. Ello nos ha permitido evaluar de forma objetiva las ventajas y limitaciones de una serie de sondas fluorescentes de relevancia en estudios experimentales de estrés oxidativo o nitrosativo. Aunque existen discrepancias en los ensayos multiparamétricos se propone una serie de recomendaciones para el diseño de paneles por CMF de estrés oxidativo.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (NOS) are of outstanding interest in various areas of experimental and clinical medicine. Both species have a dual role in aerobic biological systems, supporting both metabolic and cellular processes, while, given their oxidative action, they have been associated with numerous diseases, as well as with the ageing process. Despite the powerful and complex antioxidant machinery of higher organisms, when the capacity of these protective mechanisms is exceeded by the intensity or duration of oxidative processes, a condition known as oxidative stress occurs, which is defined as an alteration in the balance between ROS production and antioxidant defences, causing oxidative damage.

The experimental study of oxidative stress and activity is complicated by the complexity of the biochemical processes involved and by the limited half-life of the different ROS and RNS that are involved. Flow cytometry is widely used for the quantitative study of intracellular generation of ROS and RNS due to the availability of various types of fluorogenic substrates and fluorochromes. The use of fluorescent probes is a simple and easy approach for the detection and quantification of ROS and RNS production in cellular systems. However, there are many limitations and artefacts in this methodology. Therefore, the main objective of the present study is to evaluate the specificity issues of fluorescent probes and the involvement of different ROS in various oxidative stress conditions.

Cytomics studies have been performed on eukaryotic cells (Jurkat and N13 cell lines) and prokaryotic cells (*Escherichia coli* B strains deficient in antioxidant defence) with different fluorogenic substrates and combinations of these. Various ROS- and RNS-generating xenobiotics are used for this approach. Flow cytometry assays are developed to detect and interpret possible interferences between fluorogenic substrates and of the fluorogenic substrates with the biological system that may limit the applicability of multi-parametric stress assays. In addition, real-time flow cytometry is used to investigate temporal phenomena related to the generation of ROS and RNS.

We present a study in which it has been possible to design and develop, in different experimental models, flow cytometry assays to measure the generation of ROS and RNS with different fluorogenic substrates in cell suspensions treated with different xenobiotics. This has allowed us to objectively assess the advantages and limitations

of several fluorescent probes of relevance in experimental studies of oxidative or nitrosative stress. Although discrepancies exist in multi-parametric assays, a guideline for the design of flow cytometry panels for oxidative stress is proposed.



Introducción

1. Radicales libres y especies reactivas

Por definición, un radical libre es una especie molecular que presenta uno o más electrones desapareados en su orbital más externo y que sea, a su vez, capaz de existir de forma independiente. Esta configuración electrónica, también conocida como paramagnética, es altamente inestable lo que justifica una reactividad muy elevada y una vida media muy corta. A ello se debe, entre otras razones, la tendencia que presentan estas especies reactivas a reaccionar con otras moléculas cercanas, captando o cediendo algún electrón, desestabilizándolas estructural y funcionalmente (Halliwell and Gutteridge, 2015; Pryor, 1976).

Los radicales libres fueron descritos por primera vez por Moses Gomberg hace más de un siglo (Gomberg, 1900). En la década de 1930, Leonor Michaelis propuso que los radicales libres participaban en la mayoría, si no en todas, las reacciones de oxidación que involucraban moléculas orgánicas (Michaelis, 1939). Aunque esta afirmación era errónea, centró el interés en la intervención de los radicales libres en diferentes transformaciones químicas. En 1950, los radicales libres se encontraron en sistemas biológicos (Commoner et al., 1954) e inmediatamente se propuso su implicación en diversas patologías como envejecimiento (Harman, 1956).

1.1. Especies reactivas del Oxígeno

La aparición de la vida en la Tierra ha sido siempre un enigma científico importante. La ausencia de vida, así como de moléculas orgánicas e inorgánicas importantes, caracterizó los primeros estadios de la formación del planeta. La vida ha evolucionado creando organismos que necesitan oxígeno (O_2) para vivir. La mayoría los seres vivos dependen del O_2 para obtener grandes cantidades de energía metabólica a partir de la oxidación de biomoléculas (Lane, 2002). El O_2 constituye casi el 21% de la atmósfera de la Tierra y, en términos de masa, es la tercera molécula más abundante en el universo (Taverne et al., 2018).

La gran paradoja del O_2 radica en que las funciones del O_2 esenciales para los seres vivos dependen de una propiedad química peligrosa para ellos. La molécula de O_2 en sí es un radical, y debido a la presencia de dos electrones desapareados se conoce como biradical (Halliwell, 2015). El O_2 molecular puede aceptar electrones individuales para generar formas moleculares muy inestables y altamente reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fridovich, 1998). La denominación de ROS es un término general que incluye una variedad de radicales

Introducción

libres y no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Egea et al., 2017; Halliwell and Whiteman, 2004; Hideg, 2004). Las ROS son subproductos inevitables del metabolismo aeróbico (Imlay, 2008), por lo que su generación es un proceso fisiológico que implica la existencia de mecanismos bioquímicos complejos para regular todo el proceso (Pruchniak et al., 2016).

Gran parte del comportamiento del O_2 molecular y sus especies parcialmente reducidas se deriva de sus potenciales de reducción y estructuras orbitales (Imlay, 2003). El O_2 o dióxígeno es una molécula de pequeño tamaño y no polar, y se difunde a través de las membranas biológicas tan rápido como a través del agua (Ligeza et al., 1998). La estructura orbital del O_2 lo limita a aceptar electrones de uno en uno, y su desfavorable potencial de reducción univalente (-0,16 V) asegura que solo sea un aceptor de electrones univalente débil. Así, el O_2 en un sistema biológico donde la mayoría de las moléculas orgánicas son dadores de electrones univalentes débiles, no tiene capacidad para oxidar eficientemente la mayoría de los componentes celulares, como aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos (Imlay, 2003).

La secuencia de reducción de cuatro electrones del O_2 molecular esquematizada en la Figura 1 muestra cómo la adición de electrones consecutivos genera las principales ROS: anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Imlay, 2008). Sus potenciales de reducción dictan en términos termodinámicos, que son oxidantes univalentes mucho más fuertes que el O_2 (Imlay, 2003).

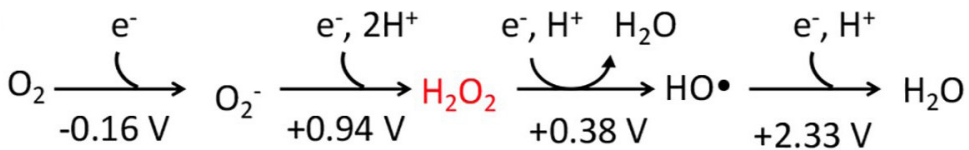


Figura 1: Los estados redox del O_2 con potenciales de reducción estándar. La concentración estándar de O_2 se consideró como 1 M. Tomada de Sen and Imlay, 2021.

El H_2O_2 es capaz de reaccionar con moléculas orgánicas, incluso puede generar, a través de diferentes reacciones químicas, radicales libres (Imlay, 2008). El coeficiente de permeabilidad de las membranas para el H_2O_2 es de $\sim 1,6 \times 10^{-3}$ cm/s, permitiendo la formación de un gradiente de H_2O_2 a través de la membrana citoplasmática cuando el H_2O_2 extracelular está presente (Seaver and Imlay, 2001a). El O_2^- no puede cruzar membranas a pH fisiológico (Korshunov and Imlay, 2002), y debido a

su carga negativa, es poco efectivo como oxidante de especies ricas en electrones. El intermediario más reactivo es el $\text{OH}\cdot$ que reacciona incluso a velocidades limitadas por la difusión con la mayoría de las biomoléculas (Imlay, 2003).

Las ROS desempeñan un doble papel en los sistemas vivos: son subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico, que causan daño oxidativo y disfunción tisular en las biomoléculas tales como los lípidos, las proteínas, el ADN y los hidratos de carbono (Halliwell and Gutteridge, 2015; Valko et al., 2007) y sirven como señales moleculares que activan respuestas beneficiosas al estrés oxidativo (Di Meo and Venditti, 2020). Asimismo, las ROS jugarían un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades como patologías cardiovasculares (Djordjević, 2004; Halliwell, 1989; Rahman et al., 2012), enfermedades reumáticas (Hitchon and El-Gabalawy, 2004), enfermedades gastrointestinales (Kim et al., 2012), cáncer (Valko et al., 2004), diabetes (Rahman et al., 2012), envejecimiento (Garaschuk et al., 2018; Viña et al., 2013), entre otras.

Igualmente, las ROS pueden ser clave en la patogénesis de coronavirus 2019 (COVID-19) debido a su significativo papel en la respuesta a las infecciones (Aykan et al., 2021; Delgado-Roche and Mesta, 2020). Se ha demostrado que la infección viral se asocia con una disminución de la defensa antioxidante, además de una elevada infiltración de neutrófilos y liberación de ROS (Derouiche, 2020; Laforge et al., 2020). Los estudios revelan el incremento de la generación de especies reactivas de ROS (Miripour et al., 2020) y la presencia de niveles más altos de peroxidación lipídica en pacientes con COVID-19 (Martín-Fernández et al., 2021).

Las vesículas extracelulares (EV), incluidas las microvesículas y los exosomas, están estrechamente relacionadas con ROS, no solo porque las vesículas pueden producir ROS, sino también porque las ROS están involucradas en su formación (Chiaradia et al., 2021). Además, las EV pueden proteger a las células mediante la transferencia de enzimas y moléculas antioxidantes que actúan como eliminadores de ROS (Borras et al., 2020).

El efecto de las EV sobre las ROS depende tanto de las condiciones de la célula que producen estas vesículas como de las de la célula diana, así como de las condiciones ambientales (Bodega et al., 2019). De hecho, condiciones prooxidantes parecen inducir la liberación de EV (Benedikter et al., 2018). Las EV también pueden servir como un mecanismo alternativo para eliminar las proteínas oxidadas (Yarana and St. Clair, 2017).

1.2. Otras proteínas reactivas

Además de las ROS, otras especies reactivas importantes tienen impactos notables en la biología redox y, en consecuencia, en el estrés oxidativo.

- Especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) o el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) (del Río, 2015). El $\text{NO}\cdot$ es una molécula lábil que puede difundirse a través de la membrana plasmática (Nathan and Shiloh, 2000). La producción de RNS depende del entorno redox local y también está mediada por la presencia de ROS (Fang, 2004). ROS y RNS interactúan produciendo especies altamente citotóxicas como el $\text{ONOO}\cdot$ (Szabó, 2003).
- Especies reactivas de cloro y de bromo (Sies et al., 2017). Destaca el ácido hipocloroso (HOCl), que es un poderoso oxidante que interactúa con la mayoría de las macromoléculas celulares (Gray et al., 2013).
- Especies reactivas de azufre (RSS) se definen como aquellas moléculas que contienen al menos un átomo de azufre redox activo o un grupo funcional que contiene azufre en su estructura y son capaces de oxidar o reducir biomoléculas en condiciones fisiológicas (Giles et al., 2017). Incluyen especies como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) (DeLeon et al., 2016; Giles et al., 2001).
- Especies reactivas de carbonilo (RCS) derivadas de la oxidación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Incluyen una gran cantidad de compuestos biológicos con uno o más grupos carbonilos como varias formas de aldehídos generados metabólicamente y acroleína, entre otros (Semchyshyn, 2014; Sies, 1986).
- Especies reactivas de selenio (RSeS) que incluyen selenocisteína y selenometionina (Kuršvietienė et al., 2020; Labunskyy et al., 2014).
- Además, se pueden definir las especies reactivas electrofílicas (RES) (Parvez et al., 2018; Ursini et al., 2016).

Las diversas especies reactivas de diferente naturaleza química en base a Sies et al., 2017 se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: Especies reactivas. Adaptada de Sies et al., 2017.

Especies reactivas de oxígeno	
Radicales libres	No radicales libres
Anión superóxido (O_2^-)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo (OH)	Hidroperóxido (ROOH)
Radical peroxilo ($ROO\cdot$)	Singlete oxígeno molecular (1O_2)
Radical alcoxilo (RO)	Ozono (O_3)
Especies reactivas de nitrógeno	
Radicales libres	No radicales libres
Óxido nítrico (NO)	Nitrito (NO_2^-)
Dióxido de nitrógeno (NO_2^-)	Nitrato (NO_3^-)
	Peroxinitrito (ONOO)
	Peroxinitrato (O_2NOO^-)
	Nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$)
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
Especies reactivas de cloro/bromo	
Radicales libres	No radicales libres
Cloro atómico (Cl)	Hipoclorito (ClO^-)
Bromo atómico (Br)	Cloraminas (RNHCl)
	Hipobromito (BrO^-)
	Ácido hipocloroso (HOCl)
Especies reactivas de azufre	
Radicales libres	No radicales libres
Radical tiilo ($RS\cdot$)	Tiol (RSH), tiolato (RS^-)
	Disulfuro (RSSR)
	Sulfonato (RSO_3^-)
	Sulfuro de hidrógeno (H_2S)

Tabla 1: (continuación).

Especies reactivas de carbonilo	
Radicales libres	No radicales libres
	Acetaldehído
	Acroleína
	Metilglioxal
	4-Hidroxinonenal (4-HNE)
	Carbonilos excitados electrónicamente
Especies reactivas de selenio	
Radicales libres	No radicales libres
	Selenito (SeO_3^{2-})
	Selenato (SeO_4^{2-})
	Selenocisteína (SeCys)
	Selenometionina (SeMet)

1.3. Fuentes celulares de ROS y RNS

Las células durante su normal metabolismo aeróbico están sujetas a una exposición continua de los diferentes tipos de especies reactivas. Las fuentes pueden dividirse en endógenas y exógenas (Sies, 2019).

1.3.1. Fuentes endógenas

Las ROS y RNS se generan en numerosos compartimentos y por múltiples enzimas dentro de la célula como se muestra en la Figura 2 (Di Meo et al., 2016). Las fuentes endógenas están asociadas a procesos oxidativos, como la cadena de transporte de electrones (ETC) y la actividad de diversas enzimas como NADPH oxidasa (NOX) y óxido nítrico sintasa (NOS) (Pruchniak et al., 2016; Snezhkina et al., 2019). Además, diversos componentes celulares solubles, incluidos tioles, hidroquinonas, catecolaminas y flavinas contribuyen a la producción intracelular de ROS, ya que pueden sufrir reacciones redox (Freeman and Crapo, 1982).

La ETC mitocondrial puede considerarse como la principal fuente endógena de ROS. Aproximadamente el 90% del consumo de O_2 se destina a la fosforilación oxidativa y el 3-5% del O_2 que respiramos puede dar lugar a la formación de ROS (Andreyev

et al., 2005; Dröge, 2002; Schulz et al., 2014). Las mitocondrias de los mamíferos poseen once sitios conocidos que producen $O_2^{\cdot-}$, como el complejo I y III de la ETC (Brand, 2016).

Durante la respiración aeróbica, las mitocondrias generan ATP a través de la ETC utilizando O_2 (Murphy, 2008). La ETC contiene los complejos I-IV, así como los transportadores de electrones ubiquinona y citocromo c. Hay dos vías de transporte de electrones, una que incluye los complejos I/III/IV con NADH como sustrato y otra con los complejos II/III/IV con succinato como sustrato. El flujo de electrones se combina con la generación de un gradiente de protones a través de la membrana interna y la energía acumulada en el gradiente de protones es utilizada por el complejo V (ATP sintasa) para producir ATP (Tahara et al., 2009; Zhao et al., 2019).

Los grupos de Fe-S que se encuentran dentro de los complejos respiratorios están altamente conservados entre las bacterias y las mitocondrias de las células eucariotas. Dentro de la ETC, los grupos de Fe-S desempeñan un papel crítico en el transporte de electrones a través de los complejos. Los electrones donados por NADH y $FADH_2$ se transfieren a través de numerosos grupos de Fe-S que se encuentran en los complejos I, II y III. Los grupos de Fe-S también se localizan entre los sitios de unión de los inhibidores mitocondriales, como la rotenona, y desempeñan también un papel importante en la producción de ROS (Read et al., 2021).

Además de la ETC, otras enzimas mitocondriales, en particular flavoproteínas, generan $O_2^{\cdot-}$ (Andreyev et al., 2005; Massey, 1994; Messner and Imlay, 2002). La piruvato y la α -cetoglutarato deshidrogenasa se encuentran en la matriz y poseen la misma subunidad de flavina que constituye la fuente de $O_2^{\cdot-}$ (Starkov et al., 2004; Tretter and Adam-Vizi, 2004). La aconitasa es también una enzima de la matriz empleada como marcador de los niveles de oxidación mitocondrial debido a que el $O_2^{\cdot-}$ puede oxidar sus racimos de Fe-S generando OH^{\cdot} (Vásquez-Vivar et al., 2000).

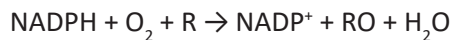
Las enzimas de la superficie externa de la membrana mitocondrial interna pueden contribuir a la liberación de ROS en el espacio intermembranoso. La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa presenta un papel claro como fuente de $O_2^{\cdot-}$ en el espacio intermembrana (Tahara et al., 2009). Por otro lado, la monoaminoxidasa puede generar H_2O_2 lo que desencadena daño en el ADN mitocondrial (Kunduzova et al., 2002).

Introducción

Las diferentes ROS liberadas por las mitocondrias interactúan no solo con otras mitocondrias sino también con otros orgánulos celulares, propagando eventualmente el aumento de ROS a toda la célula (Di Meo et al., 2016). Teniendo en cuenta las diversas y cuantitativamente significativas fuentes de oxidantes en el microambiente mitocondrial, se necesitan mecanismos antioxidantes efectivos para mantener la función mitocondrial y celular (Cardoso et al., 2012).

Las enzimas del retículo endoplásmico como el citocromo P450 (CYP) favorecen la formación de ROS. Las enzimas CYP son un grupo diverso de hemoproteínas catalíticas que desempeñan un papel crucial en el metabolismo o la biotransformación de fármacos y xenobióticos, pero también en la biosíntesis de esteroides, ácidos grasos, eicosanoides, vitaminas, etc. Están ampliamente distribuidos por todo el organismo, si bien el hígado es el órgano con mayor expresión de estas enzimas (Veith and Moorthy, 2018).

La mayoría de las oxidaciones catalizadas por CYP son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y para las que utiliza O_2 . En la reacción se muestra la oxigenación de un sustrato orgánico y la reducción simultánea del O_2 :



Durante el ciclo catalítico, se pueden generar especies reactivas en las denominadas reacciones de desacoplamiento (Hrycay and Bandiera, 2015; Veith and Moorthy, 2018). Existen evidencias de que las diferentes isoformas de CYP presentan diversas tasas de vías de desacoplamiento, por ejemplo, CYP1B1 y CYP1D1 de *Danio rerio* poseen altas tasas de reacción de desacoplamiento en comparación con otras isoformas como CYP1A1/1C1/1C2, lo que indica que CYP1B1/1D1 son más propensos a generar ROS debido al desacoplamiento de la reacción (Harskamp et al., 2012).

Las enzimas CYP pueden aumentar las ROS y alterar el equilibrio redox a través de su ciclo catalítico y contribuir al desarrollo de diversas patologías. Además, algunos sustratos modificados por las enzimas CYP, también pueden favorecer al desarrollo de enfermedades (Parke, 1994; Veith and Moorthy, 2018).

La NADPH oxidasa de los fagocitos, NOX2, constituye la primera isoforma de NOX identificada (Gabig and Babior, 1979). La familia NOX consta de siete isoformas y aunque todas las isoformas comparten homología estructural, difieren según su

distribución celular y tisular, mecanismo de activación o sistema regulador (Vermot et al., 2021). Estas enzimas producen grandes cantidades de ROS como mecanismo para combatir a los microorganismos (Weiss and LoBuglio, 1982). La producción estimulada de ROS por las células fagocíticas se llamó originalmente “el estallido respiratorio” debido al mayor consumo de O_2 por parte de estas células (Babior et al., 1973). Esta enzima cataliza la conversión de O_2 en O_2^- en la reacción:



El complejo enzimático multicomponente de NOX posee dos componentes de membrana y tres citosólicos. Los diversos factores se mantienen físicamente disociados en un estado inactivo en ausencia de infección microbiana. Tras la activación, las subunidades reguladoras se translocan a la membrana, donde se ensamblan. Este mecanismo proporciona una regulación estricta de la actividad de NOX y evitan la producción excesiva de O_2^- y la oxidación perjudicial de macromoléculas biológicas (Babior et al., 2002).

NOX1 constituye la isoforma predominante en el colon, próstata, útero y células vasculares. NOX2 está presente en las células endoteliales y fagocíticas y NOX3 se expresa generalmente en el oído interno. NOX4 se encuentra principalmente en el riñón, osteoclastos, fibroblastos y células endoteliales y es responsable de la producción basal de H_2O_2 . NOX5, identificado en tejidos linfáticos inmaduros humanos y células endoteliales, también genera H_2O_2 de un modo dependiente de Ca^{2+} (Vermot et al., 2021). Las oxidasas duales (DUOX1 y DUOX2), originalmente aisladas de la tiroides, producen H_2O_2 y no necesitan estar asociadas con factores citosólicos para estar activas (Rigutto et al., 2009).

Casi todas las células eucariotas son capaces de producir H_2O_2 . El sitio principal de producción de ROS se localiza en peroxisomas. Las funciones importantes realizadas por los peroxisomas incluyen la α y β oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de aminoácidos y glicoxilatos y la síntesis de compuestos lipídicos. La mayoría de las enzimas que catalizan estos procesos producen ROS durante su actividad (Antonenkov et al., 2010). Los sustratos lipídicos peroxisomales cumplen importantes funciones fisiológicas pero, como fuente de combustible metabólico, son menos relevantes (Van Veldhoven and Mannaerts, 1999).

La principal fuente de producción de H_2O_2 en los peroxisomas son las oxidasas que transfieren hidrógeno de sus respectivos sustratos al O_2 . Las diferentes enzimas

Introducción

peroxisomales que producen H_2O_2 son acil-CoA oxidasa, D-aminoácido oxidasa, L- α -hidroxioxidasa, urato oxidasa y D-aspartato oxidasa. Los peroxisomas también contienen xantina oxidasa (XO) y NOS que producen $O_2^{\cdot-}$ y $NO\cdot$ respectivamente (Schrader and Fahimi, 2004).

La enzima XO o xantina oxidoreductasa es una molibdoenzima capaz de catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina, entre otros sustratos. La xantina oxidoreductasa puede existir en dos formas intercambiables: XO y xantina deshidrogenasa (Hille and Massey, 1981; Nishino et al., 2008). En condiciones normales, la xantina deshidrogenasa oxida la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico, no produciendo especies reactivas, puesto que el NAD^+ actúa como aceptor de electrones (Engerson et al., 1987). En condiciones de hipoxia, la xantina deshidrogenasa sufre una conversión a XO que cataliza la misma reacción, pero el O_2 actúa como aceptor de electrones con la reducción del O_2 y formación de $O_2^{\cdot-}$ en primera instancia y H_2O_2 en segunda (Valko et al., 2004).

Las otras fuentes endógenas de ROS incluyen síntesis de prostaglandinas, autooxidación de adrenalina, riboflavina reducida, activación de células inmunitarias, inflamación, estrés mental, ejercicio excesivo, infección, cáncer, envejecimiento, isquemia, etc (Cheeseman and Slater, 1993).

La mayor parte del $NO\cdot$ producido se debe a la enzima NOS. Esta enzima cataliza la oxidación dependiente de O_2 y NADPH de L-arginina a $NO\cdot$ y L-citrulina, en una reacción compleja que requiere FAD, FMN, tetrahidrobiopterina, Ca^{2+} y calmodulina (Alderton et al., 2001). La familia NOS contiene tres isoformas, NOS neuronal (nNOS, NOS I), NOS endotelial (eNOS, NOS III) y la forma inducible, (iNOS, NOS II). nNOS y eNOS se expresan constitutivamente y están reguladas por la interacción de Ca^{2+} con calmodulina. En cambio, iNOS es inducida en respuesta a infección o inflamación y no está regulada por Ca^{2+} (Knowles and Moncada, 1994).

nNOS se expresa constitutivamente en las neuronas centrales y periféricas y en algunos otros tipos de células. iNOS se encuentra en muchos tipos de células en respuesta a lipopolisacáridos, citoquinas u otros agentes, contribuyendo a la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias y el shock séptico. eNOS se expresa principalmente en las células endoteliales (Förstermann and Sessa, 2012). Las formas activas de todas las isoenzimas NOS son homodiméricas. En relación con las isoformas constitutivas, iNOS tiene una producción de $NO\cdot$ de alrededor de cinco veces mayor (Sun et al., 2010).

La producción mitocondrial de NO^\cdot es catalizada por NOS mitocondrial (mtNOS). Esta enzima tiene los mismos requisitos de cofactor y sustrato que otras NOS. En condiciones fisiológicas, la producción de NO^\cdot por las mitocondrias tiene una implicación importante para el metabolismo celular. El NO^\cdot inhibe reversiblemente el consumo de O_2 y la síntesis de ATP mediante la inhibición competitiva de la citocromo c oxidasa (Haynes et al., 2004).

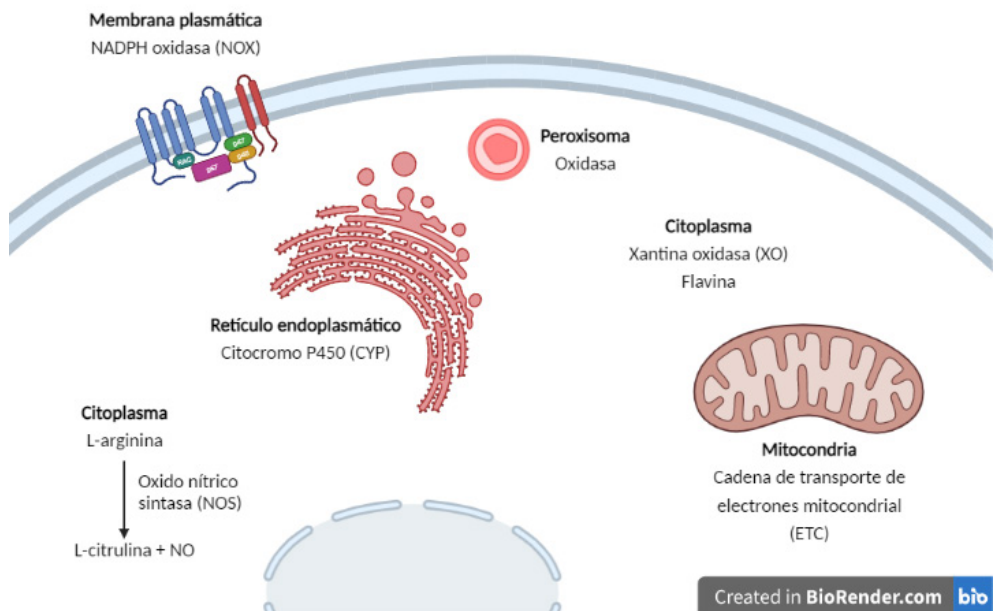


Figura 2: Fuentes celulares de producción de ROS y RNS. Los diferentes orgánulos y componentes celulares contribuyen a la producción de una amplia variedad de especies reactivas.

1.3.2. Fuentes exógenas

Los desencadenantes ambientales como la exposición al humo del cigarrillo, la radiación, el ozono, los alérgenos, los aerosoles, los fármacos, los pesticidas, la contaminación del aire y el agua, los solventes químicos, el alcohol, los metales pesados o de transición pueden contribuir al aumento de la producción de ROS en las células (Dröge, 2002; Jakober et al., 2008; Schröder and Krutmann, 2005; Valko et al., 2005).

La radiación ionizante representa la fuente más importante y conocida de ROS y RNS,

Introducción

que desencadena las situaciones más extremas, agresivas y nocivas para la salud (Di Meo and Venditti, 2020). La exposición celular a la radiación ionizante conduce a eventos oxidantes que alteran la estructura atómica a través de interacciones con macromoléculas o a través de productos de la radiólisis del agua. Los cambios oxidativos pueden continuar durante días y meses después de la exposición inicial, posiblemente debido a la generación continua de especies reactivas a través de la estimulación de oxidasas y NOS. Estos procesos ocurren no solo en las células irradiadas sino también en su progenie desencadenando una amplia gama de daños oxidativos, incluida la carbonilación de proteínas, la peroxidación lipídica y el aumento de las tasas de mutaciones genéticas espontáneas (Azzam et al., 2012).

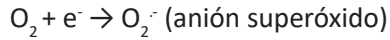
Los metales pesados juegan un papel esencial en la producción de radicales libres (Ściskalska et al., 2014). El hierro (Fe) y el cobre (Cu) pueden inducir radicales libres por reacciones de tipo Fenton o Haber-Weiss. El cadmio, el níquel, el arsénico y el plomo inducen la generación de ROS a través de diferentes mecanismos indirectos, como estimular la actividad de NOX, desplazar cationes esenciales de sitios de unión específicos de enzimas e inhibir las actividades enzimáticas por su afinidad por los grupos -SH en la enzima (Sharifi-Rad et al., 2020). El plomo provoca peroxidación lipídica y altera el equilibrio del glutatión (GSH), lo que genera que las células sean más propensas al daño oxidativo. Como parte de su toxicidad, el arsénico induce $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} que interrumpen varias vías de señalización celular. Las especies reactivas interactúa con macromoléculas biológicas, lo que lleva a daño en el ADN, peroxidación lipídica y alteración de los niveles de enzimas antioxidantes (Jan et al., 2015).

La mayoría de los quimioterapéuticos elevan los niveles intracelulares de ROS, y muchos pueden alterar la homeostasis redox de las células cancerosas. El mecanismo de acción de muchos quimioterapéuticos contra el cáncer implica la apoptosis mediada por ROS (Yang et al., 2018). Además, algunas clases de antibióticos estimulan la producción de OH^{\cdot} a través de la reacción de Fenton, contribuyendo a la muerte celular (Kohanski et al., 2007).

1.4. Propiedades químicas de ROS y RNS

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ es un radical resultante de la reducción univalente del O_2 (Fridovich, 1995).

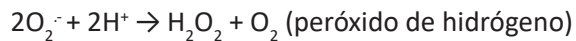


Se considera la ROS “primaria” y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS “secundarias”, ya sea directa o indirectamente a través de procesos catalizados por enzimas o metales (Fridovich, 1986). Se genera principalmente dentro de las mitocondrias (Cadenas and Sies, 1998) y entre las enzimas que pueden producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ se incluyen XO, lipooxigenasa, ciclooxigenasa (COX) y NOX (Kontos et al., 1985; Kuppasamy and Zweier, 1989). Además, muchas células inflamatorias pueden producir cantidades significativas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ como mecanismo de protección contra organismos invasores (Fridovich, 1978).

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es un radical inusual porque, a pesar de su alto potencial de reducción, su reactividad con las biomoléculas es baja (Bielski et al., 1983). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ está cargado negativamente y es relativamente impermeable a las membranas celulares (Fridovich, 1995). Sin embargo, la protonación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) ocurre a pH fisiológico y estos radicales pueden cruzar las membranas celulares (Bielski and Cabelli, 1995). HO_2^{\cdot} es un oxidante más fuerte, pero debido a que constituye menos del 1% del $\text{O}_2^{\cdot-}$ a pH neutro, su impacto es más limitado (Winterbourn, 2020).



En comparación con muchos radicales libres, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ tiene un tiempo de vida media relativamente largo que permite la difusión dentro de la célula y, por tanto, el número de dianas celulares sobre las que actuar se incrementa (Bergendi et al., 1999). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con otro $\text{O}_2^{\cdot-}$ en una reacción de dismutación, en la que un radical se oxida a O_2 y otro se reduce a H_2O_2 . La reacción es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) (Desideri and Falconi, 2003; Fridovich, 1997):

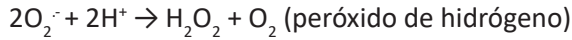


Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

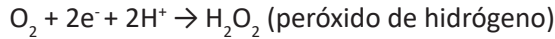
El H_2O_2 no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados (Sies et al., 2017). El H_2O_2 es estable, pero posee una gran facilidad para difundirse a través de las membranas y una vida media relativamente larga (Bergendi et al., 1999). Se puede formar a partir de diferentes reacciones:

- Por dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ por SOD (Fridovich, 1997):

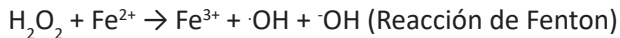
Introducción



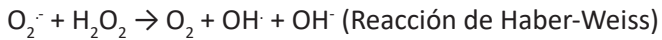
– Por reducción directa de una molécula de O_2 por dos electrones (Hoffstein et al., 1985):



En términos químicos, el H_2O_2 es poco reactivo, puede actuar como un oxidante leve o como un agente reductor leve, pero no oxida la mayoría de las moléculas biológicas fácilmente, incluidos los lípidos, el ADN y las proteínas (Halliwell et al., 2000). La citotoxicidad del H_2O_2 se debe principalmente a su capacidad para generar $\text{OH}\cdot$ a través reacciones catalizadas por metales, tales como la reacción de Fenton (Liochev, 1999):



En biología celular esta reacción es importante como parte de la reacción de Haber-Weiss donde el Fe (o Cu) se mantiene en un estado reducido por el O_2^- y, por lo tanto, catalizan la formación del $\text{OH}\cdot$ a partir de H_2O_2 (Kehrer, 2000):



Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

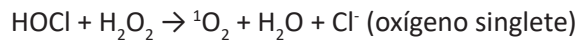
El $\text{OH}\cdot$ es la forma neutra del ion hidróxido y es un radical libre altamente reactivo (Bedwell et al., 1989). Puede reaccionar fuertemente con moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos, por lo que son las ROS potencialmente más dañinas (Halliwell, 1987). El $\text{OH}\cdot$ no atraviesa la membrana y por ello generalmente, daña moléculas cercanas a su sitio de producción (Bergendi et al., 1999).

Este radical se produce por distintas reacciones, siendo la más importante en su formación la reacción de Fenton en presencia de compuestos metálicos (Liochev, 1999). Otra reacción a través de la que puede producirse es la reacción de Haber-Weiss, a partir del H_2O_2 y del O_2^- (Kehrer, 2000).

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

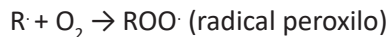
El $^1\text{O}_2$ es una forma electrónicamente excitada de O_2 , pero no es un radical, al no contener electrones desapareados (Sies et al., 2017). Tiene una vida media muy

corta aunque presenta gran capacidad de difusión y es permeable a las membranas (Bergendi et al., 1999; Kanofsky, 1989). Es un agente oxidante altamente potente que puede causar daño al ADN (Sies and Menck, 1992). Se puede generar por la activación de neutrófilos (Hampton et al., 1998) y eosinófilos (Kanofsky, 1989) en respuesta a la inflamación. Algunos ejemplos de formación enzimática de $^1\text{O}_2$ son los catalizados por lactoperoxidasa, dioxigenasas y lipoxigenasas (Agnéz-Lima et al., 2012).



Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)

Los radicales peroxilos son posiblemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, no siendo tan reactivos como otras especies de ROS. Se originan a partir de la adición de O_2 a cualquier radical hidrocarbonado (De Grey, 2002). Este radical presenta una vida media relativamente larga (Cadenas, 1989).



Ozono (O_3)

El O_3 es un poderoso oxidante, producido por la vía de oxidación del H_2O catalizada por anticuerpos, que juega un papel importante en la inflamación (Lerner and Eschenmoser, 2003). Puede formar radicales libres y otros intermediarios reactivos oxidando moléculas biológicas, así como generar peroxidación lipídica (Goldstein et al., 1969).

Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

$\text{NO}\cdot$ es una pequeña molécula generada en los tejidos por diferentes NOS que convierten la L-arginina en L-citrulina (Andrew and Mayer, 1999).



El $\text{NO}\cdot$ es un radical libre, pero con una reactividad baja. Tiene una vida media relativamente larga y se difunde fácilmente a través del citoplasma y la membrana plasmática (Chiueh, 1999). Constituye un importante segundo mensajero intracelular que estimula a la guanilato ciclasa y a las proteínas quinasas para ayudar en la relajación del músculo liso en los vasos sanguíneos (Ignarro et al., 1987). Además, puede actuar como un importante regulador redox celular (Wink and Mitchell,

Introducción

1998) y controla la actividad enzimática mediante la nitrosilación de las proteínas (Stamler, 1994). También está involucrado en muchas actividades biológicas como la regulación de la presión arterial, la neurotransmisión, los mecanismos defensivos y la regulación inmune (Phaniendra et al., 2015).

Peroxinitrito (ONOO⁻)

El ONOO⁻ no es un radical y se forma a partir del O₂⁻ y el NO[•] (Beckman et al., 1990).

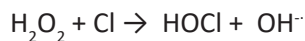


La formación de ONOO⁻ se produce tres veces más rápido que la dismutación del O₂⁻ para producir H₂O₂ e incluso más rápido que la reacción de NO[•] con proteínas hemo. De ello se desprende que ésta es la reacción primaria cuando están presentes O₂⁻ y NO[•]. Es altamente tóxico y puede reaccionar directamente con CO₂ para formar nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO₂⁻) que se descompone para producir NO₂⁻, CO₃⁻ y CO₂⁻ (Beckman and Koppenol, 1996; Giles et al., 2001).

El ONOO⁻ (o su forma protonada ONOOH) es un fuerte agente oxidante que reacciona con una variedad de biomoléculas que incluyen proteínas, lípidos y ADN (Szabó, 2003). Puede conducir a la depleción de los grupos tiol, fragmentación del ADN y nitración de proteínas (Douki and Cadet, 1996). Los residuos de nitrotirosina se consideran como marcadores de daño celular inducido por peroxinitrito (Ischiropoulos and Al-Mehdi, 1995).

Ácido hipocloroso (HOCl)

Es un poderoso oxidante generado por neutrófilos. La enzima hemo mieloperoxidasa (MPO) cataliza la formación de HOCl a partir de H₂O₂ y cloruro (Winterbourn and Kettle, 2000):



El HOCl interactúa con la mayoría de las macromoléculas celulares y participa tanto en reacciones de oxidación como de cloración. Los compuestos que contienen azufre como la cisteína, la metionina o el GSH reaccionan 100 veces más rápidamente con HOCl que cualquier otro componente celular (Gray et al., 2013).

Puede oxidar también tioles y otras moléculas biológicas que incluyen ascorbato, urato, nucleótidos de piridina y triptófano. El HOCl clora varios compuestos como

las aminas para dar cloraminas (Phaniendra et al., 2015).

Tabla 2: Características de las diferentes especies reactivas de O_2 y N_2 . Adaptada de Phaniendra et al., 2015.

Especie reactiva	Radical libre	Vida media (seg)	Reactividad
$O_2^{\cdot-}$	Si	10^{-6}	Baja
H_2O_2	No	Estable	Baja
OH^{\cdot}	Si	10^{-10}	Alta
1O_2	No	10^{-6}	Alta
ROO^{\cdot}	Si	17	Baja
O_3	No	Segundos	Baja
NO^{\cdot}	Si	Segundos	Baja
$ONOO^{\cdot}$	No	10^{-3}	Alta
$HOCl$	No	Estable	Alta

1.5. Efectos lesivos de las ROS y RNS sobre estructuras y funciones celulares

Altas concentraciones de ROS pueden ser mediadores importantes del daño al ADN, lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Valko et al., 2006). El orden de preferencia para el daño oxidativo depende de una serie de factores, como la ubicación de la producción de ROS, la capacidad relativa de la biomolécula para oxidarse y la disponibilidad de iones metálicos (Evans et al., 2004). El daño oxidativo constituye una consecuencia inevitable del metabolismo celular (Cooke et al., 2003; Valko et al., 2006).

El ADN es una de las dianas biológicamente más importantes de ROS (Lindahl, 1993). Se han identificado alrededor de cien tipos diferentes de daños en el ADN (Engwa et al., 2020). El OH^{\cdot} es el oxidante de ROS más potente, reacciona con el ADN por adición de dobles enlaces en los carbonos de las bases de ADN y genera un gran número de productos. Las modificaciones producidas por ROS en las bases pueden ser mutagénicas, lo que lleva a un apareamiento incorrecto de las bases, o citotóxicas si se produce una detención de la replicación (Gros et al., 2002).

Debido a su naturaleza electrofílica, OH^{\cdot} se une preferentemente al sitio con la

Introducción

mayor densidad de electrones. El modo de reacción principal radica en la adición de OH^\cdot a nivel de los carbonos C4, C5 y C8 en las purinas. Los aductos formados en las purinas difieren en sus propiedades redox, siendo los radicales de aductos en C4 oxidantes y los aductos en C5 y C8 son principalmente reductores (Evans et al., 2004; Fujita and Steenken, 1981; Halliwell and Gutteridge, 2015).

En el caso de la citosina, la adición ocurre en el C5 en una medida del 87%, mientras que aproximadamente el 10% de OH^\cdot se agrega al C6. El porcentaje de adición de OH^\cdot en la timina es de un 60% en el C5 y un 30% en el C6. Aproximadamente el 10% reacciona por abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo metilo de la timina (Evans et al., 2004; Hazra and Steenken, 1983; Steenken, 1987).

La lesión más estudiada es la formación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Kasai and Nishimura, 1984). Se ha utilizado ampliamente en muchos estudios no solo como un biomarcador para la medición del daño oxidativo endógeno del ADN, sino también como un factor de riesgo para muchas enfermedades (Valavanidis et al., 2009). La modificación permanente del material genético resultante representa el primer paso involucrado en la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento (Evans et al., 2004; Hanes et al., 2006).

Cuando un radical libre reacciona con una desoxirribosa del ADN, se genera una rotura de la cadena. Sin embargo, la cadena complementaria, que permanece intacta, puede mantener unidos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. Los principales aductos inducidos por radicales libres de la fracción de azúcar en el ADN incluyen ácido glicólico, 2-desoxitetrodialdosa, eritrosa, lactona de ácido 2-desoxipentónico y 2-desoxipentosa-4-ulosa (Cooke et al., 2003; Dizdaroglu et al., 2002).

Por otro lado, el ONOO^\cdot interactúa con la guanina para producir lesiones en el ADN como la 8-nitroguanina. La 8-nitroguanina formada es químicamente inestable y puede eliminarse espontáneamente. Pero la adenina puede emparejarse con la 8-nitroguanina durante la síntesis de ADN, formando una lesión mutagénica (Hiraku et al., 2010).

El ADN mitocondrial es particularmente susceptible a las ROS generadas por la cadena respiratoria, debido a su proximidad, a pesar de estar empaquetado con proteínas protectoras similares a las de la cromatina nuclear. Sus mutaciones pueden conducir a una variedad de enfermedades, así como al procesos de envejecimiento

y patologías asociadas con la edad avanzada (Juan et al., 2021; Theurey and Pizzo, 2018).

Los ácidos nucleicos son más resistentes a la oxidación en comparación con los lípidos y las proteínas, además, hay que tener en cuenta que cualquier daño causado por ROS se repara rápidamente. Las células han desarrollado procesos complejos para hacer frente al daño en el genoma. Dependiendo de la naturaleza de la lesión en el ADN, se activan vías específicas para facilitar la identificación de las regiones dañadas y su posterior reparación (Goldstein and Kastan, 2015; Sancar et al., 2004).

Los lípidos de membrana, especialmente los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son los más susceptibles a la oxidación por radicales libres (Siems et al., 1995). La peroxidación lipídica es muy significativa debido a su implicación en diversas patologías. Se inicia cuando cualquier radical libre ataca y abstrae un hidrógeno de un grupo metileno (CH_2) en un ácido graso (LH) dando lugar a un radical lipídico (L). El radical lipídico puede reaccionar con el O_2 para formar un radical peroxilo lipídico (LOO). El radical peroxilo lipídico resultante se somete a un reordenamiento a través de una reacción de ciclización para formar endoperóxidos, que finalmente dan malondialdehído (MDA) y 4-hidroxilo nonenal (4-HNA), los productos finales tóxicos de la peroxidación lipídica que producen daño al ADN y a las proteínas (Halliwell, 1991; Mao et al., 1999; Marnett, 1999). La peroxidación inducida por radicales libres conduce a alteraciones en las propiedades biofísicas de la membrana, como el grado de fluidez y puede llevar a la inactivación de los receptores o enzimas unidos a la membrana, lo que a su vez, puede afectar a la normal función celular (Gutteridge and Halliwell, 1990).

Los biomarcadores más precisos de la peroxidación lipídica son los isoprostanos junto con sus metabolitos. Son marcadores químicamente estables, que se forman in vivo y presentan importantes implicaciones para la medicina (Montuschi et al., 2004). El F2-isoprostano formado por la peroxidación del ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado que se encuentra en los fosfolípidos de la membrana celular y es uno de los objetivos de ROS (Morrow et al., 1990).

Los radicales libres son capaces de oxidar a todos los aminoácidos presentes en las proteínas al tener residuos susceptibles, sobre todo a nivel del grupo carbonilo, lo que deriva en la desnaturalización y en pérdida de la actividad enzimática de la proteína (Butterfield et al., 1998; Chevion et al., 2000). La presencia de grupos carbonilo en las proteínas ha sido considerada como un marcador de oxidación

Introducción

mediada por ROS (Chevion et al., 2000). Las proteínas pueden modificarse oxidativamente de tres maneras:

- Modificación oxidativa de aminoácidos específicos.
- Escisión peptídica mediada por radicales libres.
- Formación de enlaces cruzados proteína-proteína.

Las proteínas que contienen aminoácidos como la L-metionina, la L-cisteína, la L-arginina y la L-histidina son especialmente sensibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS (Stadtman, 2004).

En algunos casos, pueden ocurrir modificaciones reversibles de proteínas, como S-glutacionilación, S-nitrosación y sulfoxidación de L-metionina. Aunque, a menudo se produce la formación de grupos carbonilo adicionales en la cadena polipeptídica. Esta reacción irreversible, no enzimática, es introducida por una variedad de vías oxidativas (Dalle-Donne et al., 2006; Lushchak, 2007).

Los radicales libres generan un daño oxidativo menor a los hidratos de carbono que a otras moléculas. Sin embargo, los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres, alterando sus funciones celulares, tales como la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores (Duan and Kasper, 2011).

2. Sistemas antioxidantes

La tensión oxidativa cada vez mayor hizo necesario la evolución de sistemas antioxidantes. Las formas más tempranas de estos sistemas pueden haber sido pequeñas moléculas y metales (Fischer et al., 2016) como el Mn (Latour, 2015), complejos de azufre (Fahey, 2013) y carotenoides (Sedoud et al., 2014); algunos de éstos siguen siendo partes importantes de los sistemas antioxidantes en procariotas y eucariotas. Las defensas más importantes surgieron con la evolución de las enzimas que degradan directamente O_2^- y H_2O_2 (Khademian and Imlay, 2021).

Con objetivo de prevenir los efectos lesivos de la producción in vivo de ROS y RNS, la evolución ha dotado a los organismos de un sistema de defensa antioxidante complejo y eficaz. Este sistema está formado por un grupo de sustancias que, al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente su oxidación, funcionando como eliminadoras (scavengers) y reparadoras del daño producido (Gutteridge and Halliwell, 2018;

Halliwell, 2012; Sies, 1997).

Un antioxidante es una molécula lo suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad de daño. Estos antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular principalmente a través de la eliminación de radicales libres (Halliwell, 1995). Los antioxidantes que actúan en los sistemas de defensa intervienen a diferentes niveles como preventivo, de eliminación de radicales, de reparación, así como también de adaptación (Halliwell, 2013; Lobo et al., 2010). En el entorno intracelular y extracelular existen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para desintoxicar las especies reactivas (Frei et al., 1988).

2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

Las principales enzimas antioxidantes directamente implicadas en la neutralización de ROS y RNS son: SOD, catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y la familia de tiorredoxina (Trx) (Figura 3) (Pham-Huy et al., 2008).

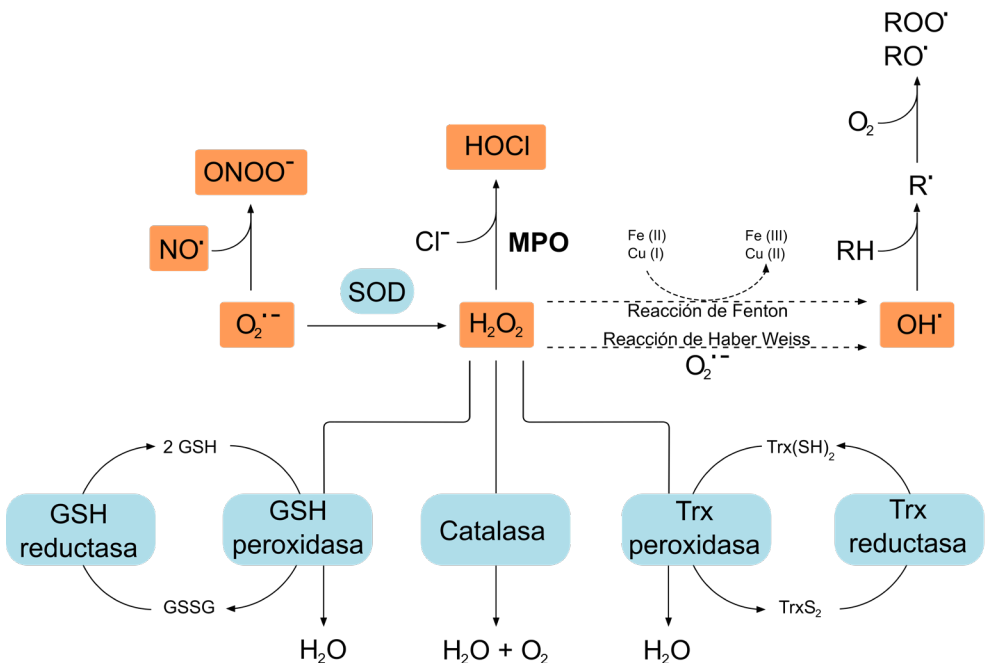


Figura 3: Enzimas involucradas en la generación e inactivación de ROS y RNS. El $O_2^{\bullet-}$ se puede convertir en H_2O_2 mediante la SOD. El H_2O_2 puede dar lugar al OH^\bullet a través de la reacción de Fenton. El OH^\bullet puede generar RO^\bullet y ROO^\bullet . El H_2O_2 se puede desintoxicar a través de la GPx, la catalasa o Trx. La enzima MPO puede usar H_2O_2 para oxidar el cloruro a HOCl.

Superóxido dismutasa (SOD)

La primera SOD fue descubierta hace medio siglo (McCord and Fridovich, 1969a). Las SOD son metaloenzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en células procariotas y eucariotas (Fridovich, 1995). Constituyen la primera línea de defensa contra los radicales libres ya que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 (Bannister et al., 1987) y la gran mayoría de los organismos que viven en presencia de O_2 poseen SOD (Staerck et al., 2017).

Existen diferentes formas de esta enzima antioxidante, según el grupo prostético ligado a ella como Cu, Zn, Mn o Fe (Wang et al., 2018). La SOD de hierro (FeSOD) se encuentra principalmente en procariotas, excepto en algunos parásitos protozoarios, mientras que la SOD de manganeso (MnSOD) y la cobre/zinc SOD (CuZnSOD) se localizan tanto en procariotas como en eucariotas (Maurya and Namdeo, 2021). La SOD que contiene níquel (NiSOD) fue descubierta en *Streptomyces* y cianobacterias. Es una pequeña proteína de 117 aminoácidos sin homología de secuencia a otras SOD (Barondeau et al., 2004).

En bacterias, MnSOD y FeSOD se encuentran en el citosol y CuZnSOD en el espacio periplasmático. La diferencia entre las tres SOD radica en su localización celular y en su regulación, lo que conlleva diferencias en cuanto a la procedencia del $O_2^{\cdot -}$ que van a detoxificar, así como el momento en que se va a requerir su actuación. La formación de $O_2^{\cdot -}$ periplasmático se ha detectado durante el crecimiento exponencial, pero aparentemente no es lo suficientemente dañino como para justificar la síntesis de SOD periplásmica, ya que la CuZnSOD solo se sintetiza cuando las células entran en fase estacionaria (Korshunov and Imlay, 2006).

En 1974 se aisló por primera vez CuZnSOD de una bacteria, *Photobacterium leiognathi*, un simbiote del pez pony (Puget and Michelson, 1974). La estructura de esa enzima era similar a la SOD de células eucariotas, e inicialmente se sospechó que el gen se había transferido lateralmente del huésped al simbiote. Sin embargo, las CuZnSODs se han descubierto desde entonces en todos los grupos de Proteobacterias y en miembros secuenciados de varios otros fillos bacterianos (Forest et al., 2000).

Las primeras investigaciones sobre las SOD periplásmicas bacterianas se centraron en la posibilidad de que pudieran defender contra el $O_2^{\cdot -}$ del huésped y es un factor de virulencia documentado para muchas bacterias (Farrant et al., 1997; Tatum et

al., 1992). Sin embargo, varias observaciones sugieren que este no puede ser el único papel de la enzima, por ejemplo, las SOD periplásmicas se encuentran en cepas no patogénicas de *E. coli* (Benov et al., 1995) y en bacterias de vida libre, como *Caulobacter* (Steinman, 1993).

La tasa de formación de O_2^- periplásmico es bastante alta, alrededor de 3 $\mu\text{M}/\text{seg}$, cuando se normaliza al volumen periplásmico estimado. Ese valor es comparable a los 5 $\mu\text{M}/\text{seg}$ que se han considerado para la formación de O_2^- en el citosol (Imlay and Fridovich, 1991). Este último compartimento requiere la protección de MnSOD y/o FeSOD, ya que los mutantes que carecen de estas SOD son deficientes en el metabolismo aeróbico y en la biosíntesis, debido a la inactivación de enzimas clave (Carlioz and Touati, 1986). Por el contrario, no se ha observado ningún defecto de crecimiento en mutantes de CuZnSOD (Gort et al., 1999).

En eucariotas se han definido las siguientes SOD: la MnSOD en la matriz mitocondrial; la extracelular SOD (ECSOD) y la CuZnSOD que se localiza en el citosol, espacio intermembranoso mitocondrial y núcleo (Johnson and Giulivi, 2005; Miao and St. Clair, 2009). De acuerdo con la teoría de la endosimbiosis de la evolución mitocondrial, el origen de las enzimas SOD en la matriz mitocondrial es equivalente al citosol bacteriano que alberga MnSOD, mientras que CuZnSOD están en el espacio intermembrana mitocondrial y citosol en eucariotas, equivalente a periplásmico/extracelular bacteriano (Broxton and Culotta, 2016).

La CuZnSOD o SOD1 está presente como un homodímero con un peso molecular de 32,5 kDa. Funciona como una bimetaloenzima, que requiere Cu para la catálisis y Zn para mejorar la eficiencia catalítica y estabilizar la proteína (Marklund, 1982). Por otro lado, las SOD de solo cobre están ampliamente distribuidos por todo el reino fúngico y son extracelulares (Robinett et al., 2018).

La MnSOD o SOD2 es una proteína homotetrámera con un peso molecular de 96 kDa. SOD2 supone la primera línea de defensa contra el O_2^- generado en la ETC mitocondrial. En modelos animales, el knockout completo de MnSOD no tiene ningún efecto sobre el desarrollo embrionario, pero conduce a la muerte poco después del nacimiento por miocardiopatía dilatada (Li et al., 1995). Ratones con una reducción del 50% en la actividad de la enzima MnSOD, presentan un aumento en el daño oxidativo del ADN y un incremento en la incidencia de cáncer en comparación con los controles de tipo salvaje (Van Remmen et al., 2003).

Introducción

La ECSOD es una glicoproteína tetramérica con un peso molecular de 135 kDa. Posee también Cu y Zn en su sitio activo y confiere protección antioxidante al espacio extracelular debido a su alta expresión en los vasos sanguíneos, corazón, pulmón y placenta. La enzima se establece en la matriz extracelular, con una alta afinidad por ciertos glicosaminoglicanos como la heparina (Marklund, 1984). Su regulación en los tejidos de mamíferos ocurre principalmente de una manera coordinada por citoquinas, más que como una respuesta de células individuales a los oxidantes (Valko et al., 2006).

El H_2O_2 dismutado por SOD, se convierte inmediatamente en un sustrato para la enzima catalasa y otras enzimas catalizadoras de H_2O_2 como la GPx y la familia de Trx (Johnson and Giulivi, 2005).

Catalasa

La importancia del H_2O_2 fue sugerida por primera vez por el descubrimiento en 1900 de una enzima dedicada a degradarla: la catalasa. Su descubridor, Oscar Loew, dedujo que se encuentra en prácticamente todos los tejidos e hizo la inferencia de que el H_2O_2 probablemente era un subproducto del metabolismo que, si no se elimina, debe ser tóxico para las células (Loew, 1900).

La catalasa es una enzima homotetrámera localiza principalmente en los peroxisomas. En cada monómero de 62,5 kDa contiene un grupo hemo responsable de la actividad enzimática. La catalasa humana pertenece a la familia de las catalasas típicas, que catalizan predominantemente la dismutación del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Aebi, 1974; Maehly and Chance, 1954). Además de su actividad catalítica dominante, también puede descomponer el $ONOO^-$ (Gebicka and Didik, 2009) y oxidar el NO^- a NO_2^- (Brunelli et al., 2001).

La catalasa es una de las enzimas más eficientes conocidas, una molécula de catalasa puede convertir alrededor de 6 millones de moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 cada minuto (Valko et al., 2006). El exceso de H_2O_2 es perjudicial para casi todos los componentes celulares, por lo que su rápida y eficiente eliminación es esencial para los organismos aeróbicos (Zamocky et al., 2008). La expresión alterada de la catalasa se ha asociado con varias enfermedades y su frecuencia está disminuida en tejidos tumorales humanos y de roedores en comparación con los tejidos normales del mismo origen (Glorieux et al., 2015).

Glutación peroxidasa (GPx)

La GPx es una enzima que cataliza la reducción del H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos en H_2O y alcohol respectivamente. La GPx es la enzima clave del ciclo redox del GSH: cuando se produce daño oxidativo, el glutatión reducido o GSH se oxida a glutatión oxidado o GSSG mediante la reacción catalizada por la GPx. El GSSG formado se reduce inmediatamente a GSH por medio de la glutatión reductasa (GR), la cual es dependiente de NADPH (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013; Maiorino et al., 1995).

En humanos se han identificado ocho isoformas diferentes de GPx que varían en la ubicación celular y la especificidad del sustrato. No todas estas enzimas tienen en su estructura SeCys, algunas de ellas tienen cisteína (Cys). GPx1, GPx2 GPx3 GPx4 y GPx6 contienen Se en su estructura (Kuršvietienė et al., 2020). La GPx1 es la forma predominante, que se encuentra en el citoplasma y en la mitocondria. Es una enzima antioxidante crucial involucrada en la prevención de la acumulación dañina de H_2O_2 intracelular (Lubos et al., 2011). La GPx4, que se localiza en la membrana plasmática, es capaz de detoxificar los peróxidos lipídicos hasta alcoholes, por lo que es muy importante para el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas biológicas (Thomas et al., 1990).

Familia tiorredoxina

La familia de las Trx consiste en un pequeño grupo de proteínas redox presentes en todos los organismos y compuestas por Trx, glutarredoxina (Grx) y peroxirredoxina (Prx) (Mahmood et al., 2013).

El sistema de Trx contiene Trx y tiorredoxina reductasa (TrxR) que utiliza los electrones de NADPH para restablecer el sistema mediante la reducción de Trx oxidada. Se encuentran en eucariotas y procariotas y están ampliamente distribuidas en las células de los mamíferos (Nordberg and Arnér, 2001). En estado reducido, las Trxs contienen dos grupos sulfhidrilo (-SH) que sufren oxidación con la formación de un puente disulfuro mixto (Lu and Holmgren, 2014).

En los mamíferos, la familia de TrxR consta de tres miembros: TrxR1, TrxR2, TrxR3. La TrxR1 se encuentra en el citosol, la TrxR2 en la mitocondria y la TrxR3 en los testículos. Las TrxR pertenecen a la clase de las oxidorreductasas. Reducen la Trx, el GSSG, el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos. Se sabe que las enzimas de la familia TrxR participan en diferentes etapas de la carcinogénesis, desde la iniciación hasta la

Introducción

metástasis (Kuršvietienė et al., 2020).

Las Grx son oxidorreductasas versátiles que se caracterizan por utilizar GSH como cofactor. En comparación con las Trx que son reducidas por la TrxR, las Grx se reducen por la oxidación del GSH. El GSSG se regenera por la GR. En conjunto, estos componentes forman el sistema del GSH (Lillig et al., 2008). Las Grx poseen un centro activo formado por un puente disulfuro. Este centro existe tanto en una forma oxidada como en una forma reducida, donde dos residuos de Cys se encuentran enlazados en un puente disulfuro intramolecular (Ströher and Millar, 2012).

Las Prxs son una familia ubicua de enzimas peroxidasas dependientes de Cys que desempeñan un papel dominante en la regulación de los niveles de H_2O_2 , ONOO⁻ y peróxidos orgánicos. Hay tres clases de Prx, que se distinguen por el número y la ubicación de las Cys catalíticas: 2-Cys Prx típica, 2-Cys Prx atípica y 1-Cys Prx. Todas las Prxs comparten el mismo mecanismo catalítico, en el que una Cys del sitio activo, es oxidada a un ácido sulfénico por el sustrato de peróxido. El reciclaje del ácido sulfénico de nuevo a un tiol es lo que distingue las tres clases de enzimas (Perkins et al., 2015; Wood et al., 2003).

2.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos se dividen en antioxidantes metabólicos y antioxidantes nutritivos. Los antioxidantes metabólicos, pertenecientes a los antioxidantes endógenos, son productos del metabolismo del cuerpo, como el ácido lipóico, GSH, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metales, transferrina, etc (Haider et al., 2020; Willcox et al., 2004). Mientras que los antioxidantes nutritivos, antioxidantes exógenos, son compuestos que no se pueden producir en el organismo y deben ser aportados a través de alimentos o suplementos, como vitamina E, vitamina C, carotenoides, metales traza (Se, Mn, Zn), flavonoides, ácidos grasos omega-3 y omega-6, etc (Lobo et al., 2010; Pham-Huy et al., 2008; Pizzino et al., 2017).

Los antioxidantes de nuestra dieta juegan un papel importante en ayudar a los antioxidantes endógenos para la neutralización del estrés oxidativo. La deficiencia de nutrientes antioxidantes es una de las causas de numerosas patologías crónicas y degenerativas. Cada nutriente es único en términos de su estructura y función antioxidante (Donaldson, 2004; Rahal et al., 2014; Willcox et al., 2004).

Glutati6n (GSH)

El GSH es un trip6ptido (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina), presente en todos los tejidos de mam6feros a concentraciones de 1-10 mM como el tiol no proteico m6s abundante que defiende contra el estr6s oxidativo. Se puede encontrar en dos formas: como GSH, o bien, como GSSG al estar compuesto por dos mol6culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las Cys. En las c6lulas, el GSH se mantiene en la forma reducida y representa el 98% del GSH total (Lu, 2013).

El GSH es sintetizado en el citosol a partir de sus amino6cidos precursores y es catalizado secuencialmente por dos enzimas, γ -glutamilciste6na sintetasa (GCS) y GSH sintetasa. Esta v6a ocurre en pr6cticamente todos los tipos de c6lulas, siendo el h6gado el principal productor y exportador de GSH. El grupo γ -carboxilo del glutamato reacciona con el grupo amino de la Cys para formar un enlace γ pept6dico, que protege al GSH de la hidr6lisis por peptidasas intracelulares. Aunque γ -glutamilciste6na puede ser un sustrato para la γ -glutamilciclotransferasa, la s6ntesis de GSH se ve favorecida en las c6lulas animales debido a la mayor afinidad y actividad de la GSH sintetasa (Meister and Anderson, 1983). A diferencia de la s6ntesis que ocurre en el citosol, la degradaci6n de GSH ocurre exclusivamente en el espacio extracelular (Ballatori et al., 2009).

La s6ntesis de GSH s6lo ocurre en el citoplasma, no obstante, en las c6lulas eucariotas, GSH se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, incluyendo el n6cleo (Garc6a-Gim6nez et al., 2013). Existen tres reservorios principales de GSH. El 80-85% del GSH celular se encuentra en el citosol, el 10-15% est6 en las mitocondrias y un peque6o porcentaje est6 en el ret6culo endopl6smico (Lu, 2013). La mayor parte de GSH sintetizado por las c6lulas es exportado al espacio extracelular a trav6s de transportadores presentes en la membrana plasm6tica (Ballatori et al., 2009).

El GSH es una mol6cula multifuncional que tiene una participaci6n clave en varios procesos celulares, siendo fundamental para la supervivencia celular. Es un determinante clave de la se6alizacion redox, la desintoxicaci6n de xenobi6ticos, la eliminaci6n de radicales libres, la proliferaci6n celular, la apoptosis, la funci6n inmune y la producci6n de citoquinas (Wu et al., 2004).

Melatonina

La melatonina, tambi6n conocida qu6micamente como N-acetil-5-metoxitriptamina,

Introducción

es una hormona natural que se encuentra en animales y en algunos otros organismos vivos, incluidas las algas. Es un poderoso antioxidante que puede atravesar fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefálica. A diferencia de otros antioxidantes, la melatonina, una vez oxidada, no puede reducirse a su estado anterior porque forma varios productos finales estables al reaccionar con los radicales libres (Pham-Huy et al., 2008; Tan et al., 2000).

Vitamina E (α -tocoferol)

La vitamina E es una vitamina liposoluble con alta potencia antioxidante. Es un compuesto quiral con ocho estereoisómeros: α , β , γ , δ tocoferol y α , β , γ , δ tocotrienol. Solo α -tocoferol es la forma más bioactiva en los seres humanos. Debido a que es soluble en grasa, el α -tocoferol protege a las membranas celulares del daño causado por los radicales libres. Su función antioxidante reside principalmente en la protección contra la peroxidación lipídica (Herrera and Barbas, 2001; Traber and Atkinson, 2007).

Vitamina C (ácido ascórbico)

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, es una vitamina hidrosoluble en agua. Es esencial para la biosíntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores. Posee propiedades importantes para la salud: antioxidantes, antiaterogénicas, anticancerígenas e inmunomoduladoras. Es uno de los potentes agentes reductores y eliminadores de radicales libres en los sistemas biológicos. Las ROS son reducidas a H_2O , mientras que las formas oxidadas del ascorbato son relativamente estables y poco reactivas. Además, en el interior de las células, la vitamina C refuerza la acción de la vitamina E y del GSH, regenerando sus formas activas, después de que hayan reaccionado contra las especies reactivas (Padayatty et al., 2003).

3. Estrés oxidativo

La investigación sobre el estrés oxidativo y la biología redox tiene una larga tradición que se remonta al comienzo de la bioquímica moderna a principios del siglo XX (Figura 4). El término “estrés” ha sido empleado en física desde tiempos desconocidos, ya que aparece en la definición de la ley de Hooke de 1658, pero su primer uso en la ciencia biológica se remonta a 1936 (Estevam et al., 2015). Hans Selye propuso el concepto de “estrés” en el estudio de las respuestas adaptativas suprarrenales (Selye, 1936). Años después definió el estrés como la respuesta

inespecífica del cuerpo a cualquier demanda (Selye, 1976).

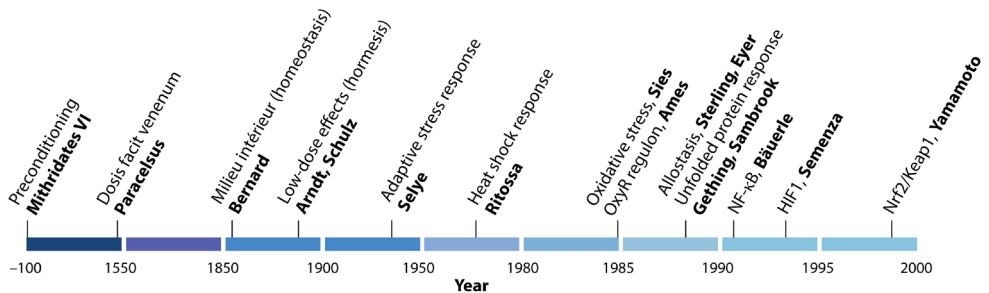


Figura 4: Cronograma de los conceptos de estrés y respuestas adaptativas al estrés. Tomada de Sies et al., 2017.

3.1. Definición de estrés oxidativo

El concepto de estrés oxidativo se introdujo para la investigación en biología y medicina redox, en el capítulo introductorio del libro de 1985 titulado *Estrés oxidativo* como “una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero” (Sies, 1985). Una revisión exhaustiva titulada *Bioquímica del estrés oxidativo* presentó el conocimiento sobre los prooxidantes y antioxidantes y sus fuentes endógenas y exógenas (Sies, 1986). El concepto de estrés oxidativo se actualizó para incluir el papel de la señalización redox (Jones, 2006), que culminó con la siguiente definición: desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que lleva a una interrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular (Sies and Jones, 2007).

Desde entonces, ha habido un enorme desarrollo dentro del campo más amplio de la biología redox y la medicina. El estrés oxidativo es un concepto global, que dada la gran variedad y gama de enzimas, así como de compuestos prooxidantes y antioxidantes, se puede clasificar en distintas categorías (Sies, 2015; Sies and Jones, 2007). Asimismo, se propone la clasificación de estrés oxidativo en función de su intensidad. Los niveles de oxidantes en estado estacionario fluctúan dentro de un cierto rango fisiológico y bajo determinadas condiciones, éstos pueden aumentar o disminuir (Lushchak, 2016, 2014).

La investigación sobre el estrés oxidativo y temas relacionados comenzó con la química y la toxicología, pero de forma más reciente se centra en los procesos redox biológicos (Sies, 2019). El descubrimiento del regulón OxyR marca el inicio del campo de la señalización redox (Christman et al., 1989). Los principales “reguladores

maestros” en eucariotas son Nrf2-Keap1 (Itoh et al., 1997) y NF-κB/IκB (Schreck et al., 1992). Las respuestas adaptativas al estrés oxidativo son una característica sobresaliente del desafío oxidativo, que contribuyen a mantener la homeostasis redox (Sies, 2020a).

El conjunto de principios que subyacen a la organización del metabolismo redox constituye el “código redox” (Jones and Sies, 2015). El estrés oxidativo se produce a partir de una pleiotropía de fuentes endógenas y exógenas. Los intentos de identificar biomarcadores redox para el estrés oxidativo llevaron a la comprensión de que no se puede identificar un solo biomarcador para las diversas patologías relacionados con el estrés oxidativo (Sies, 2020a, 2020b).

3.2. El estrés oxidativo como mecanismo de regulación celular

En condiciones normales, los niveles de ROS fluctúan dentro de un cierto rango llamado estado estacionario. Un cambio de condiciones (por ejemplo, la aplicación de un oxidante externo) puede aumentar los niveles de ROS. Si la eficiencia de la defensa antioxidante es lo suficientemente alta, los niveles de ROS pueden volver al rango inicial en cuestión de minutos. Dicho estrés se denomina “estrés oxidativo agudo”. Sin embargo, cuando los niveles de ROS se mantienen durante más tiempo, se genera un estrés llamado “estrés oxidativo crónico” y generalmente implica la expresión de varios genes asociados al estrés. La situación inversa, cuando las concentraciones de ROS en estado estacionario disminuyen en relación con el nivel inicial, se ha denominado “estrés reductivo” (Figura 5) (Lushchak and Storey, 2021).

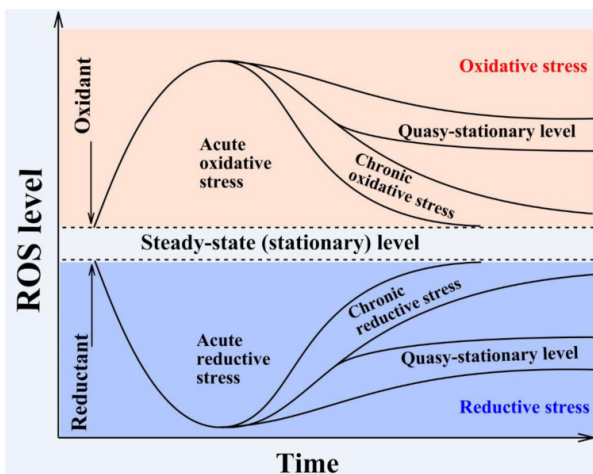


Figura 5: Representación esquemática de la clasificación de las tensiones oxidativas basadas en el tiempo. Tomada de Lushchak and Storey, 2021.

El resultado de las ROS puede ser perjudicial o beneficioso debido a que funcionan como moléculas de señalización (D'Autréaux and Toledano, 2007; Sies and Jones, 2020). Las ROS están íntimamente involucradas y son requeridas para la función biológica normal (Finkel, 2003; Halliwell and Gutteridge, 2015). Dos especies reactivas, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$, son agentes clave de la señalización redox (Weidinger and Kozlov, 2015). Además, otras especies reactivas están involucradas, por ejemplo, NO^{\cdot} y lípidos oxidados. Los recientes avances metodológicos permiten la evaluación de las interacciones de determinadas moléculas de ROS con objetivos específicos en las vías de señalización redox. En consecuencia, se han producido importantes avances en la comprensión del papel de estos oxidantes en la fisiología y la enfermedad, incluido el sistemas nervioso, cardiovascular e inmunológico, el músculo esquelético y la regulación metabólica, así como en el envejecimiento y el cáncer (Sies, 2018; Sies and Jones, 2020).

El H_2O_2 surgió como el principal metabolito implicado en la detección, la señalización y la regulación redox (Figura 6) (Marinho et al., 2014; Thannickal and Fanburg, 2000). A pesar de una distribución espacial en células y tejidos no uniforme, el rango intracelular fisiológico abarca hasta aproximadamente 100 nM (Antunes and Cadenas, 2000).

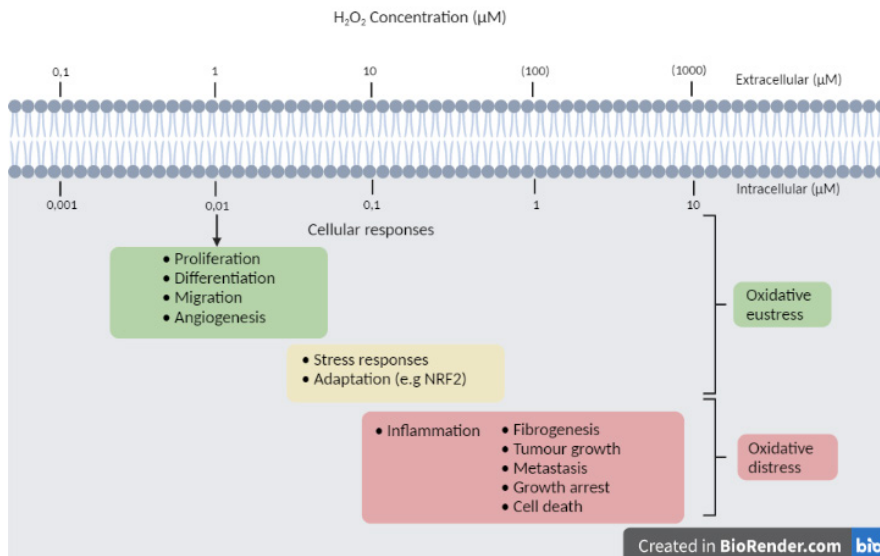


Figura 6: Concentraciones estimadas de H_2O_2 con respecto a las respuestas celulares. La coloración verde y roja denotan respuestas predominantemente beneficiosas (eustress) o perjudiciales (distress) respectivamente. Adaptada de Sies and Jones, 2020.

Introducción

La generación de H_2O_2 es estimulado por señales metabólicas o por diversos factores estresantes, como factores de crecimiento, quimiocinas o factores estresantes físicos (Parvez et al., 2018). Las concentraciones más altas desencadenan respuestas inflamatorias y otras que, en última instancia, conducen a la detención del crecimiento y la muerte celular (Sies, 2017). En cambio, dosis bajas de H_2O_2 generan respuestas relacionadas con la proliferación celular (Chen et al., 2004), la migración celular (Y. Wang et al., 2011) y la angiogénesis (Bretón-Romero and Lamas, 2014), entre otras (Weidinger and Kozlov, 2015).

La detección de ROS por vías reguladoras basadas en grupos [Fe-S] solo se ha encontrado en bacterias, no en eucariotas hasta la fecha. Tales grupos están presentes en diversas proteínas eucariotas como las hidratasas, pero no forman parte de ninguna vía conocida para regular la expresión génica (Lushchak and Storey, 2021). En *E. coli* la respuesta frente al estrés oxidativo está regulada principalmente por dos regulones, OxyR y SoxRS (Imlay, 2008). La respuesta desencadenada por OxyR y SoxRS presenta mecanismos comunes (Mendoza-Chamizo et al., 2018):

- La inducción de enzimas desintoxicantes como catalasa y peroxidasas en el caso de OxyR y de SOD en el caso de SoxRS.
- La reducción del Fe disponible, entre otros aspectos induciendo la expresión del regulador de transcripción Fur.
- La expresión de isoenzimas resistentes a la oxidación.

Aunque en eucariotas no hay homólogos aparentes de OxyR o SoxRS, existen otros factores de transcripción que desempeñan un papel en la regulación de sus genes antioxidantes (Scandalios, 2002). Por otro lado, en levaduras los reguladores transcripcionales de los genes antioxidantes incluyen ACE1, MAC1, YAP1, YAP2, HAP1 y HAP2/3/4 (Ruis and Schüller, 1995). Por otra parte, además de la inducción o represión de genes relacionados con la defensa antioxidante, se sabe que las ROS afectan de manera similar la expresión de una variedad de otros genes involucrados en diferentes vías de señalización en bacterias, levadura, plantas y animales (Scandalios, 2002).

En eucariotas, varios sistemas regulan las respuestas de protección contra el estrés oxidativo inducible por ROS (Sies and Jones, 2020). La vía Keap1-Nrf2 es el principal regulador de las respuestas protectoras a las tensiones endógenas y exógenas

causadas por ROS (Yamamoto et al., 2018). Las proteínas clave de la vía son el factor de transcripción nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) que se une junto con a las proteínas Maf al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en las regiones reguladoras de los genes diana y la proteína 1 asociada a ECH-Kelch (Keap1), una proteína represora que se une a Nrf2 y promueve su degradación por la vía del proteasoma de ubiquitina (Kansanen et al., 2013).

En condiciones no estresantes, las concentraciones de Nrf2 son bajas y la proteína se retiene en el citoplasma debido a su asociación con Keap1. La proteína Keap1 alberga varios residuos de Cys que pueden estar sujetos a oxidación (Fourquet et al., 2010). Se ha demostrado que tres de estos residuos C151, C273 y C288 desempeñan un papel clave al alterar la conformación de Keap1 que conduce a la translocación nuclear de Nrf2 en respuesta al estrés oxidativo. Se une al ARE e impulsa la expresión de genes diana de Nrf2 (Kansanen et al., 2013; Taguchi et al., 2011). Entre los genes regulados incluyen los que codifican enzimas antioxidantes como SOD y catalasa o enzimas involucradas en la biosíntesis de antioxidantes como la GCS, enzima clave de la biosíntesis de GSH (Figura 7) (Lushchak, 2014).

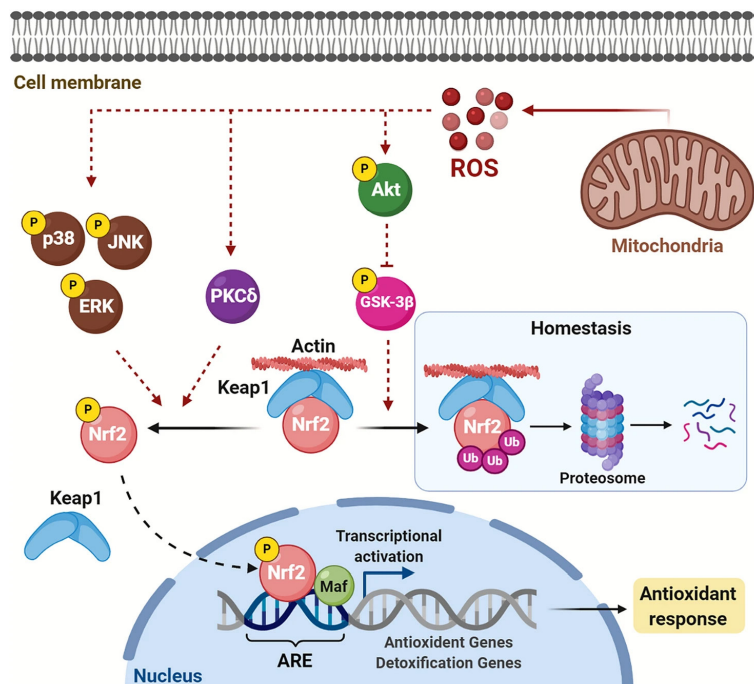


Figura 7: Mecanismo de Keap1-Nrf2. En condiciones de estrés oxidativo, las ROS desencadenan la activación de múltiples vías que inducen la expresión de Nrf2 para impulsar la transcripción de genes antioxidantes. Tomada de Rahman et al., 2021.

Introducción

El factor de transcripción NF- κ B está sujeto a una regulación compleja, con muchas moléculas reguladoras involucradas (Karin, 2009). Se relaciona con procesos de supervivencia, diferenciación, inflamación y crecimiento celular (Chen et al., 2001; Klaunig and Kamendulis, 2004). La activación de NF- κ B consiste en la liberación del factor de transcripción libre de su complejo citosólico con el inhibidor de NF- κ B, I κ B, para permitir su importación nuclear y la activación génica. En ausencia de estímulos, los dímeros de NF- κ B están estrechamente asociados a I κ B (Russell and Cotter, 2015).

NF- κ B puede desempeñar un papel protector en condiciones de estrés oxidativo al suprimir la acumulación de ROS. La inhibición de la activación de NF- κ B deriva en un aumento en la producción de ROS inducida por factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (Lingappan, 2018). NF- κ B también se ha demostrado que tiene muchos objetivos antioxidantes. Uno de los objetivos bien conocidos es la MnSOD (Morgan and Liu, 2011). Además, el H₂O₂ citosólico puede modular la vía NF- κ B (Schreck et al., 1991; Sies, 2014).

Probablemente, el estrés oxidativo de intensidad leve es detectado por el sistema Keap1-Nrf2. Las respuestas al estrés oxidativo de intensidad intermedia están coordinadas por al menos tres sistemas reguladores NF- κ B, proteína activadora 1 (AP-1) y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Estos sistemas también regulan la expresión de enzimas antioxidantes, pero igualmente estimulan la expresión de ciertos genes de inflamación, así como reprograman funciones celulares generales (Lushchak, 2014).

4. Estrés oxidativo en bacterias: *Escherichia coli*

La vida microbiana evolucionó hace 3800 millones de años en un mundo desprovisto de O₂ y rico en hierro reducido (Anbar, 2008), lo que tuvo un profundo efecto en las estrategias catalíticas disponibles para los primeros microbios y que han sido heredadas por los organismos contemporáneos (Imlay, 2013; Imlay et al., 2019). *E. coli* posee 140 enzimas que utilizan grupos de Fe-S como centros catalíticos (Rocha and Dancis, 2016). La posterior oxigenación de la atmósfera y los océanos por parte de los organismos fotosintéticos permitió la respiración aeróbica, una forma de metabolismo enormemente exergónica que constituye un factor importante, si no esencial, en la evolución de formas de vida complejas y eucariotas (Catling et al., 2005). En consecuencia, los organismos tuvieron que adaptarse al peligro potencial

de los subproductos dañinos del metabolismo del O_2 (Fasnacht and Polacek, 2021).

Las bacterias no pueden tolerar niveles de O_2 que superen sustancialmente los de sus hábitats nativos, puesto que sufren un crecimiento deficiente, mutagénesis elevada o incluso la muerte. Los organismos aerobios pueden aprovechar los beneficios metabólicos que aporta el oxígeno, aunque ello les ha supuesto el desarrollo de una serie de sistemas de defensa frente a sus efectos adversos (Imlay, 2002). En cambio, en los organismos anaerobios, aunque poseen la mayoría de las defensas antioxidantes y sistemas reguladores que se encuentran en las bacterias anaerobias facultativas y en los aerobios, su evolución queda limitada a nichos anerobios. Esta limitación es debido al daño producido por el O_2 en las enzimas claves, necesarias para la fisiología anaeróbica (Lu and Imlay, 2021; Ślesak et al., 2019).

4.1. Fuentes de ROS en bacterias

En las bacterias aeróbicas, la generación de ROS se acopla a la respiración aeróbica, por lo que la tasa de producción endógena de ROS está estrechamente correlacionada con la actividad respiratoria de las bacterias (Gonzalez-Flecha and Boveris, 1995). También existen múltiples factores estresantes que ejercen sus efectos tóxicos al amplificar la tasa natural de producción de ROS (Figura 8) (Imlay, 2015a).

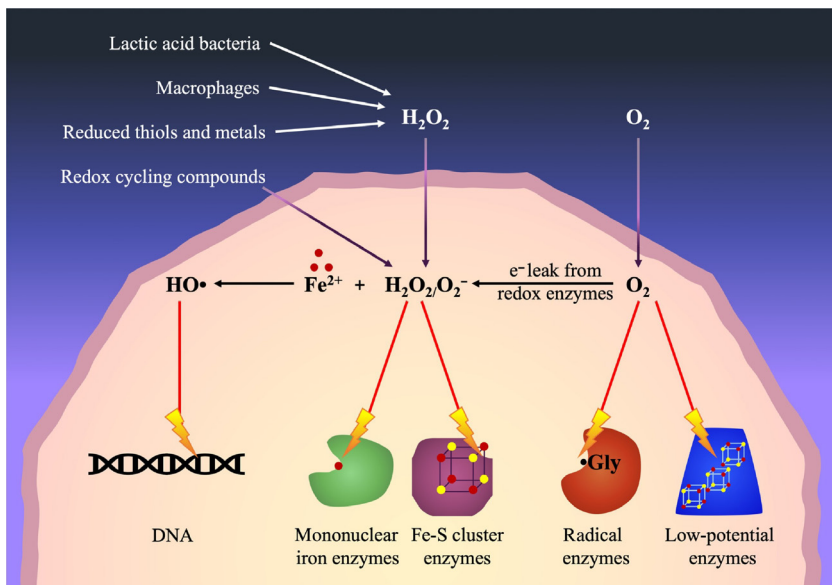


Figura 8: Las fuentes exógenas (bacterias del ácido láctico, macrófagos, tioles y metales reducidos) y las fuentes endógenas (fuga de electrones de enzimas redox y compuestos de redox cycle) generan ROS. Tomada de Khademian and Imlay, 2021.

Por otra parte, la mayoría de las ROS pueden ser generadas exógenamente tanto por otros organismos como por procesos químicos (Imlay, 2019). En *E. coli*, el H_2O_2 se forma como subproducto de las actividades metabólicas de otros microorganismos intestinales como las bacterias del ácido láctico (Pridmore et al., 2008), pero también cuando los macrófagos intentan erradicar las bacterias (Li et al., 2021; Segal, 2005). Plantas y microorganismos igualmente producen moléculas de antibióticos como la plumbagina, que genera la muerte a *E. coli* (Hassan and Fridovich, 1979).

4.2. Efectos lesivos de las ROS en bacterias

Al igual que en las células eucariotas, en las bacterias las ROS pueden ser beneficiosas, pero generalmente se consideran perjudiciales ya que reaccionan con proteínas, ADN, lípidos y otras biomoléculas, lo que lleva a la disfunción enzimática, la mutación genética y la peroxidación lipídica (Imlay, 2003), aunque las ROS son más bien bacteriostáticas que bactericidas (Imlay, 2015a).

Para entender el estrés oxidativo debemos identificar las biomoléculas diana que son más vulnerables a él (Imlay and Linn, 1986). Se han descrito múltiples dianas que las ROS pueden dañar, como: deshidratasa dependientes de Fe-S (Kuo et al., 1987), proteínas mononucleares de Fe (Sobota and Imlay, 2011), ADN (Farr et al., 1986; Park et al., 2005) y lípidos (Bielski et al., 1983).

4.2.1. Efectos lesivos sobre enzimas

Las concentraciones submicromolares de H_2O_2 son suficientes para destruir los grupos enzimáticos de Fe-S. Múltiples vías catabólicas y biosintéticas se interrumpen de este modo (Jang and Imlay, 2007). Durante el estrés oxidativo, el grupo expuesto de las deshidratasa puede ser oxidado por $O_2^{\cdot-}$ dando lugar a la formación de H_2O_2 y a la conversión del clúster a una especie inestable $[4Fe-4S]^{3+}$ que posteriormente libera hierro ferroso (Fe^{2+}). La pérdida del átomo catalítico de Fe elimina la actividad enzimática, ejemplos de tales enzimas son: la dihidroxiácido deshidratasa, la aconitasa y la fumarasa (Flint et al., 1993), por lo que el ciclo de Krebs pierde función durante el estrés oxidativo (Imlay, 2003).

El H_2O_2 inactiva las mismas enzimas a través de un proceso similar. La oxidación del átomo de Fe ocurre divalentemente, probablemente en un proceso de dos pasos y libera hierro férrico (Fe^{3+}) para generar la especie $[3Fe-4S]$ (Jang and Imlay, 2007). Tras el daño, por cualquiera de los oxidantes, el grupo resultante $[3Fe-4S]$ puede

reactivarse in vitro e in vivo mediante reducción y remetalización. Las constantes de velocidad de oxidación para las reacciones por O_2^- y H_2O_2 son aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$ y $10^4 M^{-1} s^{-1}$ respectivamente. Siendo lo suficientemente altas como para sugerir que el daño en las enzimas deshidratasa ocurre continuamente incluso en células aeróbicas de tipo salvaje, con un ciclo de oxidación cada 30-60 minutos. Debido a que los eventos de oxidación no dañan el polipéptido, las células pueden reparar los grupos proporcionando hierro y electrones, con un medio tiempo de ~5 minutos (Gort and Imlay, 1998).

No obstante, los grupos de algunas enzimas pueden degradarse más allá del estado [3Fe-4S] y el grupo debe reconstruirse totalmente (Djaman et al., 2004). Durante la exposición al H_2O_2 , *E. coli* induce el complejo alternativo de ensamblaje de clústeres Suf que, a diferencia de la maquinaria Isc, puede ensamblar nuevos grupos en un entorno oxidante (Figura 9A) (Jang and Imlay, 2010).

Otras tácticas protectoras incluyen la inducción de isoenzimas de deshidratasa libres de metales, aunque con una pérdida de eficiencia enzimática (Liochev and Fridovich, 1992; Woods et al., 1988). Algunos organismos se han ajustado a los hábitats oxidantes mediante la evolución de deshidratasa, cuyos sitios activos utilizan $[2Fe-2S]^{2+}$ en lugar de grupos $[4Fe-4S]^{2+}$ (Flint and Emptage, 1988).

El Fe es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y se considera esencial para la mayor parte de la vida en el planeta (Frey and Reed, 2012). Las ROS también atacan las enzimas mononucleares de Fe. Tales enzimas incluyen algunas epimerasas, deshidrogenasas, deformilasas y deaminasas. El O_2^- oxida y libera los átomos de Fe de las enzimas, pero el polipéptido no resulta dañado. Sin embargo, si el proceso se repite continuamente, la proteína puede unirse a un metal competidor, como el Zn, aunque no es tan catalíticamente eficiente como el Fe en estas enzimas (Anjem and Imlay, 2012; Sobota and Imlay, 2011).

La reacción de las enzimas Fe (II) con el H_2O_2 genera un OH. Esta especie altamente reactiva se libera en el sitio activo, donde puede oxidar el polipéptido e inactivar irreversiblemente la enzima. En el caso de la ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, después del daño enzimático por H_2O_2 , la enzima oxidada puede reactivarse en gran medida mediante la adición de Fe^{2+} , pero una fracción de alrededor del 20% se inactiva irreversiblemente debido al daño covalente. Los ciclos de reparación y reoxidación provocan progresivamente la pérdida de toda actividad (Figura 9B) (Sobota and Imlay, 2011).

Introducción

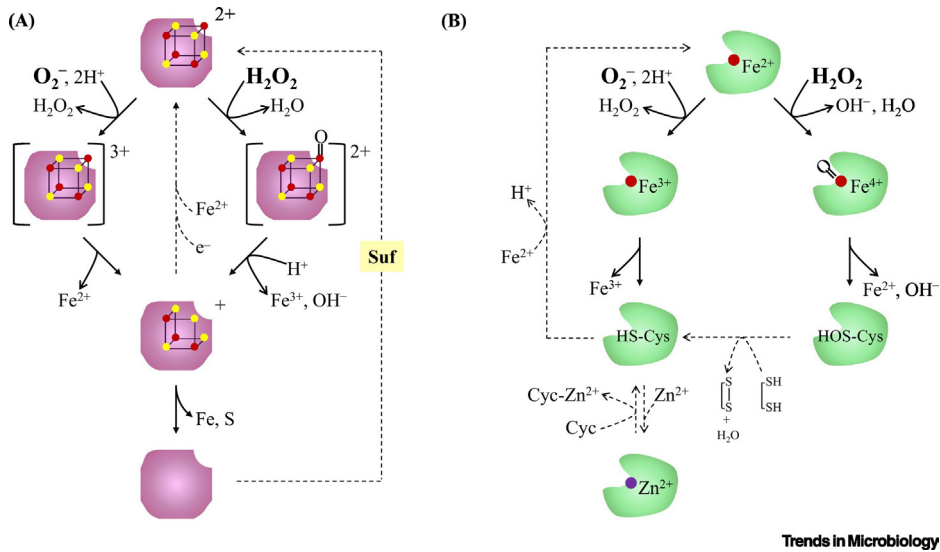


Figura 9: El daño oxidativo y la reparación de enzimas: (A) deshidratasas dependientes de Fe-S y (B) mononucleares de Fe. Tomada de Khademian and Imlay, 2021.

Otras enzimas, como treonina deshidrogenasa y péptido deformilasa, utilizan un residuo de Cys como uno de los ligandos coordinadores del Fe. Al no liberar el OH⁻, se protege el polipéptido (Imlay, 2013). Algunas bacterias resisten el estrés por H₂O₂ mediante la importación de Mn para reemplazar el Fe en enzimas mononucleares. El Mn es catalíticamente menos efectivo que el Fe, pero no reacciona con el H₂O₂ y, por lo tanto, permite que la actividad enzimática persista incluso en ambientes oxidantes (Anjem et al., 2009). El desplazamiento gradual del Fe por el Mn puede haber sido una característica importante de la evolución después de la oxigenación atmosférica (Latour, 2015).

4.2.2. Mutagénesis y su reparación

El impacto más importante del estrés oxidativo es la mutagénesis (Farr et al., 1986; Park et al., 2005). En el caso del H₂O₂, su reacción con la reserva citoplasmática de Fe²⁺ genera OH⁻, que oxidan una variedad de biomoléculas, como el ADN, dando lugar a una amplia diversidad de lesiones (Dizdaroglu et al., 1991; Hutchinson, 1985). Las modificaciones en las bases del ADN producidas por ROS pueden ser mutagénicas, si hay un apareamiento incorrecto de las bases, o citotóxicas, si se produce un bloqueo en la replicación. Un producto común es la 8-hidroxiguanina, que es altamente mutagénica debido a su capacidad para emparejar con adenina

de una manera que elude el sistema intrínseco de detección de errores de la ADN polimerasa (Hogg et al., 2005).

Por el contrario, la oxidación de la timina produce lesiones que tienen más probabilidades de no codificar; tales lesiones bloquean la progresión de la polimerasa y tienden a ser letales en lugar de mutagénicas (Demple et al., 1986). Igualmente, la oxidación de las partes de ribosa genera roturas de una sola hebra que bloquean la polimerasa con residuos de glicolato de 3' 5' a la rotura. Estos residuos deben eliminarse antes de la reparación (Imlay, 2013).

Cuando se produce daño en el ADN, la reparación es esencial. Los mutantes bacterianos que carecen de mecanismos recombinacionales y de reparación pueden sobrevivir en ambientes anóxicos, pero mueren por oxigenación (Morimyo, 1982). La glicosilasa FAPY (también conocida como MutM y Fpg), la endonucleasa IV y la endonucleasa VIII inician la escisión de bases oxidadas (Jiang et al., 1997; Saito et al., 1997). Además, la exonucleasa III y la endonucleasa IV suprimen las partes de ribosa fracturadas y restauran un cebador de 3' para la síntesis de la reparación impulsada por ADN polimerasa I (Demple et al., 1986).

Los procesos de reparación del ADN se distinguen de otras funciones defensivas en que la reparación debe continuar después de que el estrés oxidativo en sí haya disminuido (Imlay, 2013). El regulón SOS constituye un sistema de respuesta global al daño del ADN, que continúa induciendo proteínas de reparación mientras persistan las lesiones de replicación (Little, 1996). La inducción de la respuesta de SOS persiste hasta 45-60 minutos después del tratamiento de las bacterias con agentes inductores de SOS y luego cesa abruptamente. En ese tiempo, la mayoría de las lesiones han sido reparadas (Janion, 2008).

Cuando *E. coli* está expuesta a una alta concentración de H_2O_2 , el efecto inicial es una suspensión del crecimiento y del metabolismo debido a la inactivación enzimática. Sólo después de la eliminación del estrés oxidativo por las actividades de peroxidasas y catalasas se puede reanudar el metabolismo, y en este punto se activa el sistema SOS abordando el daño en el ADN (Imlay, 2013).

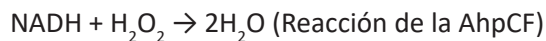
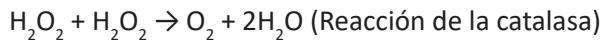
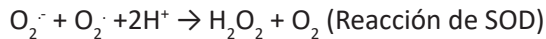
4.2.3. Peroxidación lipídica

El proceso de peroxidación lipídica no es de esperar en la mayoría de las bacterias, ya que sus membranas generalmente están formadas por ácidos grasos saturados y

monoinsaturados (Bielski et al., 1983). No obstante, trabajos recientes han sugerido que el daño por peroxidación de las membranas en varias bacterias, incluida *E. coli* (Yoon et al., 2002). Es importante destacar que cepas de *E. coli* modificadas en la producción de ácidos eicosapentaenoico (EPA), han mejorado significativamente la resistencia al H_2O_2 (Nishida et al., 2006). Se propone que los compuestos poliinsaturados, como el EPA, pueden afectar a la permeabilidad de la membrana, reduciendo la tasa de difusión del H_2O_2 a través de la membrana (Okuyama et al., 2007).

4.3. Sistemas antioxidantes en bacterias

La bacteria modelo *E. coli* contiene en su citoplasma FeSOD y MnSOD y en su periplasma la CuZnSOD (Imlay, 2013). En su citoplasma también se encuentra una alquil hidroperóxido reductasa (AhpCF) y dos catalasas (Seaver and Imlay, 2001b). Algunas de estas enzimas aprovechan el hecho de que el Fe puede reaccionar con O_2^- y H_2O_2 . La SOD original era probablemente una dependiente de Fe y la mayoría de las catalasas usan hemo para degradar el H_2O_2 . Mirando más ampliamente, sistemas de barrido similares se distribuyen a través de todos los reinos biológicos y en la mayoría de los compartimentos celulares, incluidas las mitocondrias, los peroxisomas y el citoplasma de eucariotas (Sen and Imlay, 2021).



Las SOD citoplasmáticas son lo suficientemente abundantes como para mantener el estado estacionario O_2^- a una concentración subnanomolar (Imlay and Fridovich, 1991). Los experimentos confirman que una leve disminución en SOD provoca defectos enzimáticos y de crecimiento (Gort and Imlay, 1998). La MnSOD, codificada por el gen *sodA*, es un dímero con localización citosólica y regulada por múltiples factores. Además de la respuesta al estrés oxidativo, mediado por O_2^- que depende de SoxRS, la regulación depende de Arc (control de la respiración aeróbica) que acopla la expresión de MnSOD a la respiración y Fur que regula la MnSOD en función de la concentración intracelular de Fe (Tardat and Touati, 1991).

La célula parece ajustar las cantidades relativas de las diferentes SOD para adaptarse a su estado de nutrición y crecimiento. El gen *sodB* codifica la FeSOD

y es la única de las tres enzimas de *E. coli* que utiliza Fe en su sitio activo (Miller, 2012). Las dos isoenzimas (FeSOD y MnSOD) están reguladas coordinadamente en respuesta a los niveles de Fe. Cuando el Fe es limitante, es más útil para la célula emplear una enzima que no dependa de dicho elemento. De hecho, mientras que *sodB* está regulado positivamente por Fur, *sodA* está regulado negativamente (Compan and Touati, 1993; Dubrac and Touati, 2000). Además, *sodB* está regulado por un mecanismo indirecto, a través de un ARN no codificante, RyhB (Massé and Gottesman, 2002). La CuZnSOD de *E. coli* (Benov et al., 1995) está codificada por el gen *sodC* (Imlay and Imlay, 1996). Este gen es reprimido anaeróbicamente por Fnr (regulador de la reducción de fumaratos y nitratos) e inducido en fase estacionaria por RpoS (Gort et al., 1999).

Varios patógenos producen catalasa para defenderse de los ataques de H_2O_2 , una respuesta comúnmente utilizada por el sistema inmunológico del huésped (Staerck et al., 2017). *E. coli* posee tres enzimas principales: AhpCF, catalasa G y catalasa E. Estas son capaces de eliminar tanto los peróxidos intracelulares como peróxidos orgánicos (Seaver and Imlay, 2001b).

Las catalasas, hidropoxidasa I (HPI) codificada por *katG* y hidropoxidasa II (HP II) codificada por *katE*, catalizan la dismutación del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Loewen et al., 1985). La primera catalasa-peroxidasa HPI de *E. coli* fue purificada y caracterizada en 1979 (Claiborne and Fridovich, 1979) y en 1988 la secuencia de su gen codificador, *katG*, proporcionó la primera secuencia de la catalasa-peroxidasa y demostró la estrecha relación filogenética con las peroxidases de las plantas (Triggs-Raine et al., 1988).

La HPI es una enzima de 337 KDa formada por cuatro subunidades que contiene dos grupos hemo, esta enzima presenta las siguientes funciones. La actividad catalasa que cataliza la transformación de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O y una de O_2 y la actividad peroxidasa de amplio espectro que cataliza la transformación de H_2O_2 en H_2O utilizando diferentes compuestos como reductores (Johnsson et al., 1997). Solo se expresa débilmente en células exponenciales, pero cuando se genera estrés por H_2O_2 se induce la transcripción a través del regulador transcripcional OxyR (Visick and Clarke, 1997).

En lo que respecta a la catalasa HP II, es un tetrámero de 312 KDa que carece de actividad peroxidasa, pero su actividad catalasa es seis veces superior a la de HPI (Loewen and Switala, 1986). La síntesis de la enzima HP II no es inducida por el

H_2O_2 y es regulada positivamente por RpoS, lo que supone una defensa antioxidante expresada únicamente en fase estacionaria (Figura 10) (Schellhorn, 1995).

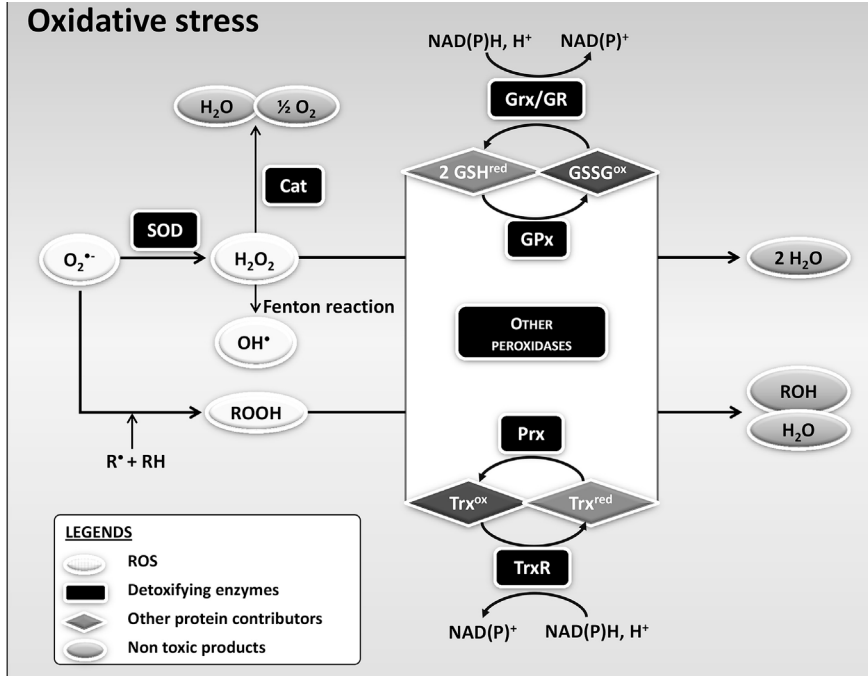


Figura 10: Mecanismos enzimáticos de degradación de ROS. Además de SOD y catalasa, otros sistemas enzimáticos intervienen para desintoxicar los radicales como el sistema de GSH y el sistema de Trx. Tomada de Staerck et al., 2017.

Ambas enzimas funcionan con concentraciones elevadas de H_2O_2 , a diferencia de la AhpCF, codificada por el operón formado por los genes *ahpC* y *ahpF*. Por su parte, AhpCF es cinéticamente un eliminador más eficiente con niveles bajos de H_2O_2 que la catalasa y, por lo tanto, es probable que sea el principal eliminador de H_2O_2 endógeno para mantener sus niveles dentro de límites fisiológicamente seguros (Mishra and Imlay, 2012; Seaver and Imlay, 2001b).

Las bacterias también han desarrollado varias tácticas para minimizar el problema del exceso de Fe limitando el tamaño de sus depósitos de Fe intracelulares, a causa de que varios factores de transcripción detienen su adquisición (O'Brian, 2015). Un estudio de *E. coli* revela que las células en crecimiento exponencial contienen una proporción significativa de Fe en estado reducido, formando un "escudo" que bloquea parcialmente el O_2 para penetrar en el citosol. En la fase estacionaria la

actividad metabólica disminuye y el escudo se desactiva, por lo que el citosol se vuelve más oxigenado (Wofford et al., 2019).

El mayor número de ferritinas codificadas en los genomas bacterianos en comparación con los de los animales, refleja una mayor necesidad de las células bacterianas de responder a una variedad de tensiones ambientales relacionadas con el Fe, desde la privación de Fe hasta el estrés oxidativo inducido por ROS y RNS (Bradley et al., 2020). El Fe adicional se almacena como cristales de hidróxido férrico en las ferritinas, un proceso que utiliza O_2 como coreactivo (Andrews, 2010).

Las células de *E. coli* contienen diferentes tipos de ferritinas que almacenan Fe en condiciones de agotamiento como FtnA y bacterioferritina (Bfr) (Abdul-Tehrani et al., 1999). Además, durante el estrés por H_2O_2 , una miniferritina adicional, Dps, es inducida y utiliza el H_2O_2 como coreactivo; el efecto es reducir el depósito de Fe suelto y, por lo tanto, evitar la química de Fenton (Chiancone and Ceci, 2010). Por otro lado, el transportador de hierro FieF, codificado por el gen *yjiP* de *E. coli*, media en la disminución de la acumulación celular de Fe y por lo tanto, aliviar el estrés (Grass et al., 2005).

4.4. Regulación de la repuesta al estrés en *E. coli*

4.4.1. Regulación de la respuesta al estrés general

La bacteria aeróbica facultativa *E. coli* ajusta su ciclo celular a las condiciones ambientales. Debido a su estilo de vida, la bacteria tiene que equilibrar el uso de O_2 con los posibles efectos letales de sus derivados dañinos (Mendoza-Chamizo et al., 2018). Dependiendo de las condiciones de nutrientes, *E. coli* puede crecer con un tiempo de generación de varias horas o menos de 20 minutos (Cooper and Helmstetter, 1968).

A pesar de que las bacterias tienen sistemas eficientes de eliminación y de reparación, la investigación siempre emergente en el campo del estrés oxidativo ha demostrado que todos los pasos del dogma central de la biología molecular son susceptibles al daño oxidativo (Fasnacht and Polacek, 2021). Para mitigar el daño del estrés oxidativo en la biología celular, dependiendo del tipo de factor estresante, se activan diferentes regulones de respuesta al estrés en las bacterias. Entre los reguladores globales destacan: Arc (Loui et al., 2009), Fnr (Unden and Schirawski, 1997), Crp (proteína del receptor cAMP) (Basak and Jiang, 2012) e incluso RpoS

Introducción

(Mulvey and Loewen, 1989).

Mientras que Arc y Fnr han sido implicados en la resistencia a ROS, Fnr es el regulador primario que controla la transición respiratoria en *E. coli*. Posee un $[4Fe-4S]^{2+}$ y se cree que participa en la respuesta al estrés oxidativo (Crack et al., 2004; Green and Paget, 2004). El sistema de transducción de señales de dos componentes Arc (ArcA y ArcB) actúa en el control de la transición del crecimiento aeróbico a anaeróbico en *E. coli* y sus miembros están involucrados principalmente en el ciclo de krebs y en el metabolismo energético. En comparación con Fnr, el sistema Arc está implicado en la respuesta al estrés oxidativo de manera más amplia y profunda (Green and Paget, 2004).

RpoS o σ_s , una subunidad sigma de la ARN polimerasa de *E. coli*, juega un papel importante en la adaptación celular al controlar la expresión de un gran conjunto de genes en fase estacionaria (Lange and Hengge-Aronis, 1991) y en muchas condiciones de estrés incluido: el shock osmótico (Cheung et al., 2003), el estrés oxidativo (Sammartano et al., 1986), la inanición (Hengge-Aronis, 2002), la radiación ultravioleta (Sammartano et al., 1986) y la hiperosmolaridad (Hengge-Aronis, 2002). RpoS también es importante para la respuesta al daño del ADN (Khil and Camerini-Otero, 2002), la mutagénesis adaptativa (Lombardo et al., 2004) y la formación de biopelículas (Lombardo et al., 2004). Además, se ha detectado regulación por RpoS de genes implicados en la muerte programada en *E. coli*, un sistema eficiente que sacrifica una parte de la población para mantener el resto en condiciones de deficiencia de nutrientes, característico de entrada en fase estacionaria (Nyström, 2004).

En *E. coli*, alrededor de 400 genes están regulados positivamente por RpoS en fase estacionaria y en respuesta al estrés (Eisenstark et al., 1996; Patten et al., 2004), de hecho, los mutantes *rpoS* son más susceptibles a los efectos letales del H_2O_2 exógeno (Loewen and Triggs, 1984). Al entrar en la fase estacionaria, los niveles de RpoS aumentan sustancialmente (Ron, 2013). Igualmente, múltiples ARNs reguladores, en los que cada uno presenta una función en respuesta a una señal diferente, regulan positivamente la traducción de la respuesta general al estrés llevada a cabo por RpoS (Gottesman, 2019). Solo el 16% de los genes dependientes de RpoS en fase estacionaria están también regulados por RpoS en fase exponencial (Dong et al., 2008).

Un sistema toxina-antitoxina, MqsR-MqsA, regula los niveles de *rpoS* durante

el estrés oxidativo. En condiciones normales de crecimiento, MqsA se une a la secuencia palindrómica 5'-ACCTTGACAGGT-3', impidiendo la transcripción de *rpoS*. No obstante, bajo estrés oxidativo, la expresión de la proteasa Lon aumenta, degradando MqsA y permitiendo la transcripción (Wang et al., 2011)

Los genes regulados por RpoS importantes para la resistencia al estrés oxidativo son: *dps*, *katE*, *xthA* (exonucleasa III) (Barth et al., 2009) y *sodC* (Gort et al., 1999). Si bien la HPII contribuye poco a la resistencia del H₂O₂ durante el crecimiento exponencial, es la principal forma de catalasa durante la fase estacionaria (González-Flecha and Demple, 1997a), esto sugiere que la actividad de OxyR disminuye con un aumento concomitante en la actividad de RpoS, lo que reduciría el gasto de energía innecesario cuando los nutrientes son bajos y el crecimiento ha disminuido.

Además, el control preciso de estos regulones superpuestos impide la regulación redundante de genes compartidos (Altuvia et al., 1997), ya que diferentes genes están regulados en común por OxyR y RpoS (Mukhopadhyay and Schellhorn, 1997; Weber et al., 2005). Posiblemente, la respuesta específica de OxyR es preferible cuando la célula se encuentra con estrés oxidativo durante el crecimiento exponencial y la respuesta de RpoS se emplea solo cuando se induce RpoS en respuesta a la transición de fase estacionaria y/u otra tensión (Battesti et al., 2011).

4.4.2. Regulación de la respuesta al estrés oxidativo

E. coli regula de forma precisa y específica la expresión de genes diana dependiendo de las condiciones de crecimiento (aeróbico frente a anaeróbico), además de la disponibilidad de aceptores de electrones (nitrato, fumarato, dimetilsulfóxido u óxido de trimetilamina) (Unden and Bongaerts, 1997). Debido a que el estrés oxidativo es concomitante con el metabolismo aeróbico, los genomas bacterianos codifican mecanismos elaborados para lograr la homeostasis redox. Diferentes respuestas inducibles son críticas para proteger *E. coli* del daño causado por el estrés oxidativo (Seo et al., 2015).

Los dos principales sistemas de defensa en condiciones de estrés oxidativo son: el regulón SoxRS que responde al O₂⁻ (Nunoshiba et al., 1992) y el regulón OxyR que responde al H₂O₂ y al NO[•] (Zheng et al., 1998). La inducción de estos sistemas no se produce de forma aislada y sin interferencias entre ellos, ya que hay especies reactivas que afectan a más de un regulón, o especies cuya interacción con diferentes componentes celulares puede dar lugar a otras especies que inducen otro regulón,

e incluso se puede dar el caso en que una misma función sea diana de más de un sistema de regulación (Müller et al., 2019).

OxyR, presente en Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria, es probable que tenga un origen evolutivo más temprano que SoxRS y RpoS, que están presentes en Proteobacteria, pero no en los filos relacionados de forma más distante, como Bacteroidetes y Actinobacteria. Es notable que, a pesar de la gran diversidad genómica de las bacterias y la presencia de otros reguladores del estrés oxidativo en las bacterias, como PerR, los reguladores de *E. coli* se conservan funcionalmente en muchas especies bacterianas de diversos nichos (Chiang and Schellhorn, 2012).

4.4.2.1. Regulador SoxRS de la respuesta al estrés por superóxido

El regulón SoxRS constituye un sistema de respuesta en condiciones de estrés, exclusivo de las bacterias entéricas (Sheplock et al., 2013), que detecta rápidamente los cambios en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y modula la expresión génica en *E. coli*. La activación de los genes diana de SoxRS hace que la bacteria sea resistente no solo a los agentes generadores de $O_2^{\cdot-}$ (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990), sino también a diferentes antibióticos (Chou et al., 1993), al NO^{\cdot} (Nunoshiba et al., 1993), a solventes orgánicos y metales pesados (Nakajima et al., 1995). Ello conlleva que la respuesta de SoxRS sea versátil, sensible y bien adaptada (Touati, 2000).

Las primeras investigaciones descubrieron que compuestos como paraquat, piocianina o plumbagina aumentan la producción intracelular de $O_2^{\cdot-}$. La respuesta celular fue el incremento en más de diez veces la biosíntesis de la MnSOD (Hassan and Fridovich, 1979). Posteriormente, se demostró que esta respuesta es impulsada por el sistema SoxRS, que está inactivo durante el crecimiento, pero éste se vuelve altamente activo cuando las células están expuestas a una amplia variedad de compuestos de redox cycle (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990).

La exposición de *E. coli* a dosis no tóxicas de agentes generadores de $O_2^{\cdot-}$, como el paraquat y la menadiona, provoca que las bacterias sean resistentes a dosis más altas de estos agentes. Además de la síntesis de proteínas del regulón OxyR, los agentes de redox cycle también provocaron la síntesis de al menos otras 33 proteínas diferentes que forman parte de una respuesta específica al $O_2^{\cdot-}$ (Greenberg and Demple, 1989).

La resistencia inducible a los agentes generadores de $O_2^{\cdot-}$ depende de la integridad

del locus *soxRS*. Los genes *soxR* y *soxS* son adyacentes y se transcriben de manera divergente en *E. coli*. El promotor *soxS* está dentro de la región intergénica de 85 nucleótidos, mientras que el promotor *soxR* está dentro de *soxS*. Los genes *soxR* y *soxS* codifican una proteína de 17 kDa y de 13 kDa respectivamente, ambas proteínas presentan dominios de unión al ADN (Amábile-Cuevas and Demple, 1991; Wu and Weiss, 1991).

Las proteínas codificadas por estos genes constituyen un sistema regulador de dos etapas, cuando SoxR se activa, induce la expresión de *soxS*, que inicia la transcripción de varios genes importantes del regulón SoxRS para responder al estrés redox (Demple and Amábile-Cuevas, 1991). Aunque *soxR* se distribuye ampliamente (y es muy similar a nivel de aminoácidos) entre las Proteobacterias Gram negativas y las Actinobacterias Gram positivas, *soxS* está presente exclusivamente en las enterobacterias. Un extenso análisis bioinformático de genomas deficientes en *soxS* predijo que, en los no entéricos, *soxR* se une directamente a la región promotora de cada uno de los miembros del regulón (Dietrich et al., 2008; Kobayashi and Tagawa, 2004).

Muchos otros agentes de estrés oxidativo (H_2O_2 , rayos γ , choque térmico, etc.) no lograron inducir SoxS, mientras que el crecimiento aeróbico de las bacterias deficientes en SOD desencadenó la expresión de SoxS dependiente de SoxR. Estos resultados indican la necesidad de una señal redox específica para la inducción de *soxS* (Nunoshiba et al., 1992). Estudios recientes descubrieron que SoxR activado estimula, además de SoxS, a otros genes diana (Seo et al., 2015).

SoxR es una proteína reguladora homodimérica que contiene un grupo sensorial [2Fe-2S] por subunidad (Hidalgo et al., 1995). La estructura primaria de SoxR presenta un motivo de hélice-giro-hélice en el extremo amino de unión al ADN y un grupo de residuos de Cys cerca del extremo carboxilo. El grupo [2Fe-2S] está coordinado a 4 residuos de Cys (Cys119, Cys122, Cys124 y Cys130) (Figura 11). La arquitectura general del complejo SoxR-DNA es similar a la de las proteínas de la familia MerR (Amábile-Cuevas and Demple, 1991; Kobayashi et al., 2011).

SoxS pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC / XylS (Gallegos et al., 1997). La proteína SoxS está estrechamente relacionada con MarA (resistencia múltiple a antibióticos) (Aleksun and Levy, 1999). Presenta un 41% de identidad y 67% de similitud, aunque ligeramente más corta en longitud (107 aminoácidos) (Duval and Lister, 2013). SoxS carece del dominio de dimerización de proteínas

Introducción

similares a AraC y se une a una secuencia de 20 pb (*soxbox*) como un monómero (Fawcett and Wolf, 1994; Li and Demple, 1994).

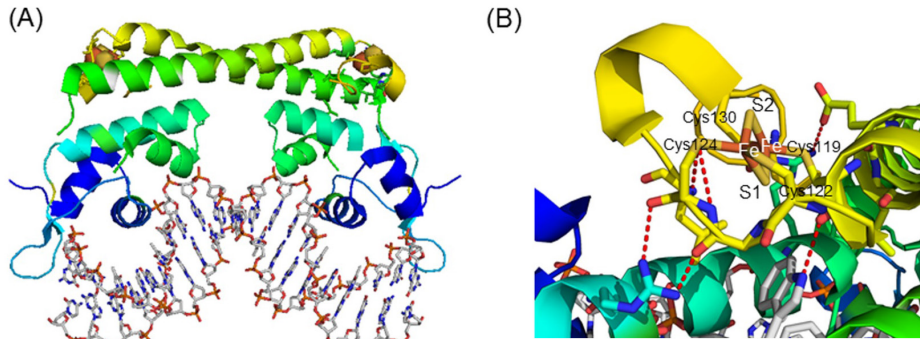


Figura 11: (A) Estructura de rayos X del complejo promotor *SoxR* – *soxS*. (B) Estructura cristalográfica de *SoxR*. Se muestra el clúster [2Fe-2S]. Tomada de Fujikawa et al., 2012.

La proteína SoxS se encuentra en dos formas; una que contiene Fe (Fe-SoxR) y otra que carece de metales (apo-SoxR) y ambas formas se unen al promotor *soxS* con igual afinidad. Sin embargo, solo Fe-SoxR estimula la transcripción *in vitro* del promotor *soxS* (Hidalgo and Demple, 1994). Además, el papel biológico de los centros [2Fe-2S] se demuestra mediante la mutación de los residuos de Cys en SoxR. Dichas mutaciones producen una proteína dimerica estable (apo-SoxR) que carece de grupos [2Fe-2S], pero que aún se une fuertemente al ADN. Estas alteraciones eliminan la activación de SoxR por el estrés oxidativo (Bradley et al., 1997). Por lo tanto, los centros metálicos no son necesarios ni para el plegamiento inicial de SoxR ni para mantener su estructura y su afinidad de unión al ADN (Pomposiello and Demple, 2001).

Tanto SoxR reducido como oxidado se unen aguas arriba del gen *soxS*, pero solo la forma oxidada estimula la transcripción (Gaudu and Weiss, 1996). La oxidación de los dos centros induce la expresión de SoxS hasta 100 veces (Hidalgo and Demple, 1994). Las estructuras cristalinas revelan que el grupo [2Fe-2S] de SoxR está completamente expuesto a solventes, lo que crea un ambiente con carga asimétrica y un posible cambio conformacional en SoxR (Watanabe et al., 2008). Cuando el centro [2Fe-2S] de SoxR está en estado oxidado (Fe^{3+} - Fe^{3+}), SoxR puede activar la transcripción de *soxS*. Cuando se reduce en un electrón (Fe^{2+} - Fe^{3+}), se pierde la capacidad de la transcripción (Ding et al., 1996). Por lo tanto, el grupo Fe-S sirve como un elaborado interruptor sensible a la oxidación de SoxR para modular la transcripción del gen *soxS* (Koo et al., 2003).

SoxR actúa mediante un mecanismo inusual de control positivo, la proteína se une al promotor *soxS* entre elementos de consenso cercano a -10 y -35 que están separados por 19 pb inusualmente largos (frente a los 17 pb óptimos) (Figura 12) (Hidalgo and Demple, 1997). La reducción de la longitud del espaciador a 16-18 pb provoca que la expresión basal de *soxS* aumente drásticamente in vivo e in vitro y elimine prácticamente la activación adicional de SoxR en respuesta al paraquat. Acortar el espaciador convirtió a SoxR de un activador, en un represor independientemente del tratamiento con paraquat (Watanabe et al., 2008). Esto, junto con la estructura cristalina SoxR-soxS, sugiere que el espaciador del promotor *soxS* es reestructurado por SoxR oxidado para inducir la transcripción por la ARN polimerasa (Hidalgo and Demple, 1997).

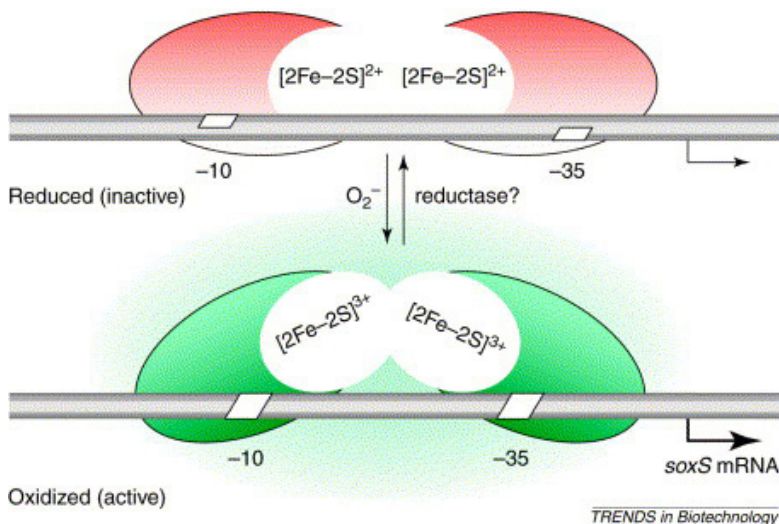


Figura 12: Mecanismo de activación de SoxR por O_2^- . Tomada de Pomposiello and Demple, 2001.

En ausencia de estrés, SoxR reducido se une al promotor *soxS* sin iniciar la transcripción. Tras la exposición a agentes generadores de O_2^- , los grupos $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ se oxidan y SoxR activado estimula la ARN polimerasa para formar un complejo abierto (Figura 12). El modelo para la activación de *soxS* propone un cambio conformacional en SoxR que modifica la topología del ADN en el promotor y compensa un espacio disfuncional entre los elementos promotores (Pomposiello and Demple, 2001).

Los grupos $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ en SoxR pueden sufrir oxidación y reducción reversible de un electrón (Wu et al., 1995). La proteína SoxR con centros reducidos es la forma predominante presente en las células antes del estrés oxidativo, según lo determinado por la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Introducción

en bacterias de *E. coli* que sobreexpresan la proteína SoxR (Gaudu et al., 1997). Tras la exposición de las bacterias al paraquat u otros compuestos de redox cycle, la señal reducida desaparece rápidamente (< 2 minutos) y reaparece en unos pocos minutos al eliminar el estrés oxidativo (Ding and Demple, 1997).

La proteína SoxR de *E. coli* gobierna una respuesta global contra los agentes generadores de O_2^- y el $NO\cdot$ y proporciona una amplia resistencia a los antibióticos. Además, elevados niveles de H_2O_2 también activan SoxRS (Manchado et al., 2000; Semchysyn et al., 2005). Asimismo, compuestos como el azul de metileno activan el regulón SoxRS por redox cycle intracelular (Kaur and Benov, 2020). Tras la transcripción mediada por SoxR oxidado, la proteína SoxS actúa entonces como un factor de transcripción secundario, modulando la expresión de 130 genes (Tabla 3) (Blanchard et al., 2007; Demple, 1996; Pomposiello and Demple, 2001).

Tabla 3: Genes inducidos por SoxRS Tomada de *Imlay et al 2008*.

Enzimas deshidratasas resistentes a la oxidación	
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnB</i>	Aconitasa A
Reparación del clúster	
<i>yggX</i>	Proteína de reparación del cluster Fe-S
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD)
<i>fpr</i>	NADPH: flavodoxina/ferredoxina oxidorreductasa
<i>fldA</i>	Flavodoxina A
<i>fldB</i>	Flavodoxina B
Eflujo de drogas y/o resistencia	
<i>acrAB</i>	Transportador eflujo de fármacos
<i>tolC</i>	Componente OMP de los transportadores de eflujo de fármacos
<i>micF</i>	ARN antisentido de OmpF
<i>marAB</i>	Operón de resistencia múltiple a antibióticos
<i>nfnB</i>	Nitrorreductasa
<i>rimK</i>	Modificación de la proteína S6 ribosomal
Otros	
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>fur</i>	Proteína reguladora de la captación del Fe
<i>sodA</i>	MnSOD
<i>ribA</i>	GMPc hidrolasa

La mayoría de los miembros de SoxRS se encuentran también sujetos a la modulación de la transcripción por los homólogos de SoxS, MarA y Rob, que activan los operones estrechamente relacionados *marRAB* y *rob*, implicados en la resistencia a múltiples antibióticos y la tolerancia a disolventes orgánicos respectivamente (Aleksun and Levy, 1997; Bennik et al., 2000).

Una cuestión por resolver es cómo se reduce rápidamente SoxR oxidado al eliminar la condición de estrés oxidativo y cómo se mantiene el estado reducido de SoxR contra la autooxidación durante el crecimiento aeróbico. Se ha planteado que el sensor se mantiene en un estado reducido e inactivo por la actividad de las reductasas SoxR, que emplean NADPH como donante de electrones (Liochev and Fridovich, 1992). Se aisló una proteína purificada que sirve como un sistema de reducción dependiente de NADPH para SoxR (Kobayashi and Tagawa, 1999). La regulación positiva de las flavodoxinas y NADPH: flavodoxina/ferredoxina oxidoreductasa por SoxR sugiere que estas proteínas podrían ser reductasas de SoxR. Sin embargo, las mutaciones en estos genes no alteran la expresión basal o activada por paraquat (Gaudu and Weiss, 2000). Se ha descrito que los productos génicos *rsxABCDGE* y *rseC* son necesarios para mantener el estado reducido de SoxR (Koo et al., 2003; Spielmann et al., 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que la inestabilidad intrínseca de SoxS ($T_{1/2} \sim 2$ minutos) y la degradación de SoxS, principalmente a través de la proteasa Lon y, en menor medida por la proteasa FtsH, son responsables del rápido retorno del sistema SoxRS al estado inactivo cuando los estímulos que inician el sistema ya no están presentes (Griffith et al., 2004).

Una disminución de la relación NADPH/NADP⁺ en las bacterias provoca la conversión de SoxR reducido inactivo en SoxR oxidado activo (Krapp et al., 2011; Liochev and Fridovich, 1992). La capacidad de respuesta a la disponibilidad de NADPH se debe presumiblemente al hecho de que SoxR está sujeto a la autooxidación permanente en condiciones aeróbicas, pero las reductasas dependientes de NADPH lo mantienen en estado reducido (Koo et al., 2003). Una mayor demanda de NADPH de la célula contrarresta la reducción de SoxR y aumenta la expresión de *soxS* (Siedler et al., 2014).

A pesar de la gran cantidad de conocimiento sobre los componentes de la respuesta de SoxRS y su mecanismo de acción, todavía no está claro cómo la proteína SoxR detecta la condición de estrés oxidativo. SoxR se activa, directa o indirectamente,

Introducción

por los radicales $O_2^{\cdot -}$ (Liochev et al., 1999a; Tsaneva and Weiss, 1990), pero el alcance de su activación en respuesta a los radicales $O_2^{\cdot -}$ no está claro (Dietrich and Kiley, 2011; Gu and Imlay, 2011; Liochev and Fridovich, 2011). Parecía razonable presumir que el oxidante directo del cluster SoxR es el $O_2^{\cdot -}$ en sí, ya que el $O_2^{\cdot -}$ es producido por agentes de redox cycle (Walkup and Kogoma, 1989). Además, la inducción de SOD es una parte destacada de la respuesta. De hecho, los mutantes SOD de *E. coli* exhibieron una elevada expresión de *soxS* y de miembros del regulón (Liochev et al., 1999a).

Sin embargo, Mianzhi Gu y James A. Imlay demostraron que los agentes de redox cycle activan directamente el factor de transcripción SoxR de *E. coli* y causan toxicidad celular independiente de la producción de $O_2^{\cdot -}$. Por lo tanto, la visión emergente es que el regulón SoxRS quizás se interprete mejor como un sistema defensivo contra las drogas de redox cycle en lugar de contra el $O_2^{\cdot -}$ (Gu and Imlay, 2011). El apoyo adicional de que SoxR no es un sensor fisiológicamente relevante de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ proviene de estudios previos de Amy Strohmeier Gort y James A. Imlay. En conjunto, estos resultados indicaron que el $O_2^{\cdot -}$ no era suficiente ni necesario para la activación de SoxRS (Gort and Imlay, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que las altas concentraciones de O_2 activan SoxR en ausencia de fármacos de redox cycle potencialmente, a través de la disminución de NADPH (Baez and Shiloach, 2013).

La sensibilidad de la ruta permite que el sistema responda no solo al estrés oxidativo directo sino también a una amplia gama de cambios ambientales e intracelulares indicativos de un posible estrés oxidativo. Aunque SoxRS puede ser activado por múltiples factores, se necesitan más estudios sobre la naturaleza de su activación para dilucidar su papel en la protección contra el $O_2^{\cdot -}$ (Fujikawa et al., 2012; Gaudu et al., 2000; Liochev and Fridovich, 2011; Singh et al., 2013).

Entre los componentes del regulón centrados en limitar los niveles intracelulares de los fármacos de redox cycle destacan los genes *acrAB*, *micF*, *ompF* y *waaYZ*. La capacidad de controlar la permeabilidad de moléculas a través de la membrana externa es un factor importante en la supervivencia de la célula en condiciones de estrés ambiental (Gu and Imlay, 2011). El gen *acrAB* codifica un sistema de flujo de fármacos (Ma et al., 1995), el gen *micF* controla postranscripcionalmente la expresión del gen *ompF* de la porina de la membrana externa, a través de un ARN antisentido (Aiba et al., 1987; Delihans and Forst, 2001), mientras que *waaYZ* codifica una función de modificación de LPS (Lee et al., 2009).

En conjunto, la inducción de estos genes, colaboran para suprimir la velocidad a la que los antibióticos de redox cycle se acumulan dentro de la célula. Otras proteínas inducidas, NfsA, YgfZ y NfnB, desintoxican los fármacos redox al modificarlos químicamente (Liochev et al., 1999b; Rau and Stolz, 2003). El aumento de la expresión de *soxS* junto con *marA* regulan la actividad del flujo de salida para permitir la defensa de la bacteria de tales drogas (Holden and Webber, 2020).

Otros genes contribuyen a reducir los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y son genes de respuesta al estrés oxidativo. El gen *sodA*, que codifica la enzima SOD que contiene Mn, defiende a la célula contra el $O_2^{\cdot-}$ (Fridovich, 1995). El gen *yggX* ayuda a reparar los grupos de Fe-S, ya sea que el daño esté mediado por $O_2^{\cdot-}$ o directamente por los propios compuestos (Gu and Imlay, 2011). También SoxS activa directamente enzimas del ciclo de Krebs, como la aconitasa A, que se sabe que es más estable y resistente a la oxidación in vivo que la isoenzima AcnB (Varghese et al., 2003). AcnA es una enzima aeróbica de fase estacionaria que es específicamente inducida por el hierro y el estrés redox (Cunningham et al., 1997). Además, actúa modulando la traducción positiva del transcrito *sodA* (Tang et al., 2002). AcnA, junto con el gen *fumC* (Liochev and Fridovich, 1992), otro componente de la respuesta de SoxRS, codifican isoenzimas resistentes a oxidantes que reemplazan las deshidratasas dañadas (Imlay, 2008).

Dado que el agotamiento de NADPH es una consecuencia probable del redox cycle, parece plausible que SoxRS induzca respuestas metabólicas como la activación de *zwf*, que codifica G6PD, para restaurar la reserva de NADPH y promover la defensa antioxidante al mediar la reducción de Trx y Grx (Giró et al., 2006; Kobayashi et al., 2015).

4.4.2.2. OxyR, regulador de peróxido de hidrógeno

OxyR es un regulador transcripcional de tipo LysR, que regula positivamente genes diana importantes para la defensa contra el peróxido y regula negativamente la expresión de su propio gen *oxyR* (Kullik et al., 1995b). Aunque OxyR se encuentra generalmente en las bacterias Gram-negativas, se sabe que se localiza también en algunas bacterias Gram-positivas (Morikawa et al., 2006; Oh et al., 2007).

OxyR participa en muchos procesos fisiológicos incluidos la protección frente al estrés térmico (Christman et al., 1985), UV (Kramer and Ames, 1987), peroxidación lipídica (Yoon et al., 2002), 1O_2 (S. Y. Kim et al., 2002) y muerte mediada por

Introducción

neutrófilos (Staudinger et al., 2002).

El tratamiento de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* con dosis bajas de H_2O_2 da como resultado la detención del crecimiento inmediato y la inducción de 30 proteínas (Christman et al., 1985). La expresión de nueve de las proteínas inducibles con H_2O_2 , incluidas las enzimas antioxidantes catalasa, GR y AphCF están controladas por el regulador OxyR (Storz and Tartaglia, 1992). Mutantes que expresan constitutivamente altos niveles de OxyR son resistentes a la muerte por dosis altas de H_2O_2 , en cambio, mutantes en el gen *oxyR* se vuelven hipersensibles (Storz et al., 1990a).

En respuesta al H_2O_2 o nitrosotioles, OxyR induce la expresión de múltiples genes que protegen del estrés oxidativo (Christman et al., 1989) y nitrosativo (Hausladen et al., 1996). Además, OxyR regula positivamente la síntesis de un pequeño ARN no codificante de 109 nucleótidos, *oxyS*. Esta molécula juega un papel importante en la integración de la respuesta al estrés oxidativo con otras respuestas celulares y ayuda a proteger a las células contra el daño oxidativo modulando la expresión de hasta 40 genes (tabla 4) (Altuvia et al., 1997). *OxyS* actúa postranscripcionalmente inhibiendo *rpoS* (Zhang et al., 1998) y regula la expresión de *fhIA* que protege a las células contra la mutagénesis (Altuvia et al., 1998). El ARN *oxyS* se sintetiza rápidamente, un minuto después del tratamiento con H_2O_2 y presenta una vida media de 10 a 30 minutos (Altuvia et al., 1997). En la limitación de la producción de H_2O_2 , el gen *oxyS* tiene funciones independientes respecto a *oxyR* (Tabla 4) (González-Flecha and Demple, 1999).

Tabla 4: Genes inducidos por *oxyS*. Tomada de Altuvia et al., 1997.

Gen	Función
<i>fhIA</i>	Activador del operón <i>hyp</i>
<i>yhiV</i>	Transportador de resistencia a metales / nodulación / división celular
<i>yhiM</i>	Transportador
<i>uhpT</i>	Transportador de hexosa fosfato
<i>pqqL</i>	Homología con endopeptidasas
<i>dps</i>	Proteína de unión a ADN inespecífica
<i>gadB</i>	Glutamato descarboxilasa
<i>rpsS</i>	σ^s

OxyR controla un regulón de casi 40 genes, que protegen a la célula de la toxicidad del H_2O_2 (Tabla 5) (Zheng et al., 2001). Muchos de los genes tienen funciones claras en la defensa antioxidante de la célula, como la eliminación de H_2O_2 por parte de la catalasa y la protección de ADN frente al daño oxidativo por la proteína Dps (Pomposiello and Demple, 2001). Aunque existen diferencias significativas, los regulones OxyR de otros organismos tienden a incluir clases similares de genes (Harrison et al., 2007; Seib et al., 2007). No obstante, hay casos encontrados en algunas bacterias donde OxyR actúa como un represor para evitar la transcripción de estos genes en condiciones no estresadas (Heo et al., 2010; Sen and Imlay, 2021; Teramoto et al., 2013).

Tabla 5: Genes regulados por OxyR. Tomada de Sen and Imlay, 2021.

Regular el H_2O_2	
<i>katG</i>	Catalasa/HPI
<i>ahpCF</i>	AhpCF
Minimizar el nivel de Fe libre	
<i>dps</i>	Miniferritina
<i>fur</i>	Represor del transporte de Fe
<i>yaaA</i>	Metabolismo del Fe
Activación de enzimas mononucleares	
<i>mntH</i>	Transportador de Mn
Activación enzimas Fe-S	
<i>clpSA</i>	Chaperona
<i>sufABCDSE</i>	Proteína de ensamblaje de racimos Fe-S
Metabolismo de tioles	
<i>gorA</i>	GR
<i>trxC</i>	Trx2
<i>grxA</i>	Grx1
Síntesis de Hemo	
<i>hemF</i>	Coproporfirinogeno III oxidasa
<i>hemH</i>	Ferroquelatasa
Otros	
<i>yhjA</i>	Ccp
<i>oxyS</i>	ARN no codificante
<i>isrC</i>	ARN no codificante
<i>flu</i>	Antígeno 43
<i>fhuF</i>	Hierro férrico reductasa

Introducción

En *E. coli*, el gen *oxyR* consta de 305 aminoácidos y codifica una proteína de 34,4 kDa que forma un homotetrámero (Christman et al., 1989). De los seis residuos de Cys por monómero en OxyR, solo Cys199 es esencial para la actividad. El dominio N-terminal contiene un motivo de unión a ADN de hélice-bucle-hélice y está conectado al dominio regulador y de oligomerización C-terminal (residuos 80-305) mediante un enlazador flexible, que es sensible a la digestión proteolítica. El dominio C-terminal contiene las cisteínas activas redox (Cys199 y Cys208) que median el cambio conformacional dependiente de redox (Kullik et al., 1995b, 1995a). Los estudios de mutagénesis aleatoria muestran que los residuos importantes para la oligomerización también se encuentran en el dominio C-terminal (Kullik et al., 1995a). El residuo de arginina contribuye a la reducción del pKa de Cys199 para hacerlo particularmente susceptible a modificaciones redox (Choi et al., 2001).

El nivel de proteína OxyR no cambia en las células tratadas con H_2O_2 , una indicación de que se activa postraduccionalmente (Storz et al., 1990b). OxyR es sensible a la oxidación y a la reducción y solamente OxyR oxidado puede activar la transcripción de sus genes diana (Kullik et al., 1995a). Los estudios genéticos y bioquímicos revelan que la activación de OxyR comienza con la oxidación del residuo Cys199 a ácido sulfénico y la formación de un enlace disulfuro intramolecular con Cys208 (Åslund et al., 1999; Kóna and Brinck, 2006; Zheng et al., 1998). Los residuos de Cys son esenciales para la activación transcripcional de los genes diana tras la exposición al estrés por H_2O_2 . Además, dichos residuos de Cys se conservan entre los homólogos de OxyR identificados en otras especies bacterianas (Zheng et al., 1998). La formación del enlace de disulfuro es una de las pocas oxidaciones de aminoácidos que son reversibles (Imlay, 2015b).

Aunque existen evidencias, la presencia del enlace disulfuro ha seguido siendo controvertida (S. O. Kim et al., 2002). Sin embargo, mediante análisis de espectrometría de masas y ensayos de marcado in vivo se demuestra que en la oxidación de OxyR se forma un enlace de disulfuro específico entre Cys199 y Cys208 en la proteína de tipo salvaje (C. Lee et al., 2004; Zheng et al., 1998).

Las Cys199 con detección redox se encuentra en un bucle entre la α -hélice y la hebra $\beta 8$. Debido a que las Cys199 y Cys208 están separados por 17 Å en la estructura cristalina de la enzima reducida, no es obvio cómo estos residuos se contactan entre sí después de la oxidación (Figura 13). Sin embargo, la Cys199 presenta un entorno cargado positivamente que aumenta la reactividad del átomo de azufre de

la Cys y explica la alta sensibilidad de OxyR al H_2O_2 . Mientras, en la forma oxidada, el entorno de la Cys redox activa cambia por completo, lo que permite que OxyR permanezca en el estado activado durante un tiempo prolongado (Choi et al., 2001).

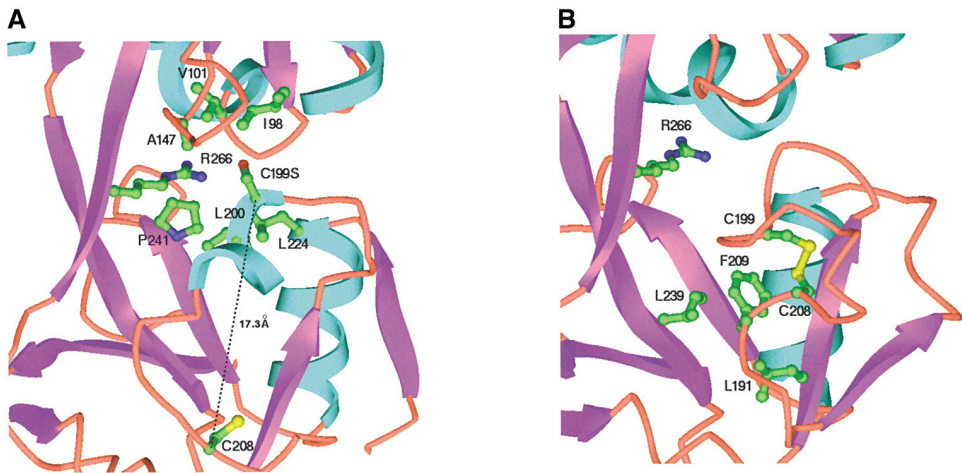


Figura 13: (A) Forma reducida y (B) oxidada de OxyR. Tomada de Choi et al., 2001.

La conversión entre las dos formas de OxyR es rápida y reversible (Storz et al., 1990b). La activación de OxyR ocurre a una velocidad de $9,7 \text{ s}^{-1}$ (C. Lee et al., 2004). Además, los análisis cinéticos indicaron que la formación del enlace disulfuro es rápida y transitoria, se oxida dentro de los 30 segundos y se reduce nuevamente a los 5 minutos posteriores de la adición de H_2O_2 en la cepa de tipo salvaje (Tao, 1999).

Las estructuras cristalinas revelan que la formación del enlace de disulfuro reversible en la forma oxidada, entre cisteínas ubicadas distantemente, introduce grandes cambios estructurales dentro del dominio regulador (Figura 13) (Choi et al., 2001). Aunque OxyR oxidado y OxyR reducido se unen al ADN, interactúan de manera diferente con las secuencias promotoras. Estas propiedades sugieren que la oxidación de la proteína OxyR provoca un cambio conformacional que conduce a la activación de la ARN polimerasa (Storz and Altuvia, 1994).

OxyR reducido se une al ADN en dos pares de surcos principales separados por una vuelta helicoidal. En cambio, OxyR oxidado reconoce cuatro elementos ATAG

Introducción

separados por 10 pb en el promotor. La separación de estos elementos permite que las cuatro subunidades de OxyR se unan a cuatro surcos principales adyacentes en un lado de la hélice del ADN. Los dos modos de unión son esenciales para que OxyR funcione como represor y activador in vivo (Tartaglia et al., 1992; Toledano et al., 1994). En condiciones de activación, se une como un tetrámero justo antes de la secuencia del promotor -35 de genes diana, y estimula la transcripción a través del contacto directo con el dominio carboxilo-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (Figura 14) (Tao et al., 1993; Wang et al., 2006).

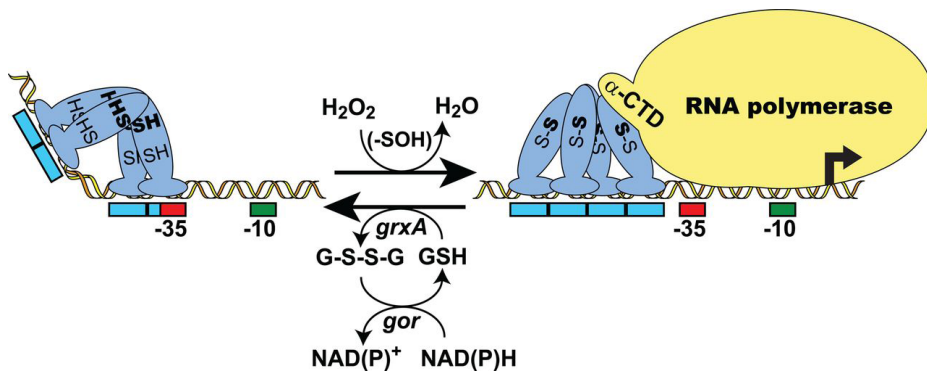


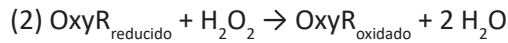
Figura 14: Mecanismo de activación de OxyR por H_2O_2 . Tomada de Dubbs and Mongkolsuk, 2012.

OxyR oxidado se inactiva tras la reducción del enlace disulfuro Cys199-Cys208, lo que indica que OxyR funciona como un interruptor redox celular reversible (Zheng et al., 1998). El proceso de reducción es significativamente más lento que la oxidación, lo que permite que OxyR oxidado permanezca durante un tiempo prolongado en un entorno de reducción general (Åslund et al., 1999; Tao, 1999).

El nivel de activación de OxyR está determinado por el equilibrio entre múltiples procesos: la generación y degradación de H_2O_2 , tanto interno como externo a la bacteria, y la reducción de OxyR por Grx1 y otras reductasas (Tao, 1999). Grx1 reduce rápidamente el enlace disulfuro Cys199-Cys208 a través de reacciones de intercambio de azufre. Dado que la Grx1 y la GR son inducidas por sí mismas como parte de la respuesta OxyR, el sistema comprende un ciclo de retroalimentación negativa que permite que la inducción se produzca rápidamente, pero que sea de magnitud limitada (Zheng et al., 1998).

Las mutaciones en los genes que codifican Grx1 o GR disminuyen la velocidad de la reducción de OxyR en *E. coli* (Tao, 1999). Esta dependencia de la reducción por GrxA

también hace que OxyR sea sensible al estado redox de tior de la célula (Åslund et al., 1999). Un reciclaje reductor similar de OxyR ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, que utiliza un sistema Trx /TrxR que forma parte del regulón OxyR (Wei et al., 2012).



Durante el crecimiento normal, cuando las concentraciones de H_2O_2 son bajas, la velocidad de reacción para la segunda ruta es baja, por lo que la primera ruta domina. En estas condiciones en cepas de tipo salvaje, la relación celular GSH/GSSG favorece la reducción de OxyR. OxyR reducido actúa como un represor de un subconjunto de genes, incluyendo la autorregulación negativa de su propia expresión. Después de la exposición a concentraciones mayores de $5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 externo, la segunda vía predomina (Åslund et al., 1999).

Normalmente OxyR está inactivo cuando la concentración de H_2O_2 intracelular oscila sobre 50 nM . Sin embargo, niveles intracelulares de $\sim 200 \text{ nM}$ es suficiente para que se produzca la oxidación de OxyR (Seaver and Imlay, 2001a). Es apropiado que OxyR esté calibrado para responder a dosis tan bajas, ya que los niveles submicromolares de H_2O_2 intracelular pueden causar un daño sustancial al ADN y a las enzimas (Park et al., 2005).

Los mecanismos exactos de detección de oxidantes por OxyR sigue siendo un tema de investigación activa y ha generado cierto debate (Helmann, 2002). Se ha propuesto además que las modificaciones redox alternativas de OxyR pueden conducir a distintas respuestas transcripcionales, formando así la base de un código redox molecular (S. O. Kim et al., 2002). Por lo tanto, parece que en el caso de *E. coli*, tanto la formación de enlaces disulfuro intramoleculares como las modificaciones de Cys199 por sí solas pueden provocar la activación mediada por OxyR (Dubbs and Mongkolsuk, 2012).

El regulón OxyR juega un papel central en la defensa de *E. coli* contra el daño oxidativo endógeno asociado con el crecimiento aeróbico activo. Bajo el control de la proteína Crp, la transcripción del gen *oxyR* aumenta durante el crecimiento exponencial y disminuye durante la transición a la fase estacionaria bajo el control de *rpoS*. Estos resultados constituyen una de las múltiples estrategias para contrarrestar el estrés oxidativo endógeno en células de *E. coli* en crecimiento activo (González-Flecha and

Introducción

Demple, 1997b).

Durante la fase exponencial las bacterias necesitan hacer frente a un aumento de aproximadamente diez veces la tasa de generación de H_2O_2 . Ello conlleva un incremento de la actividad de la catalasa y de la AhpCF, no solo como una respuesta de emergencia de *E. coli* al estrés oxidativo ambiental, sino también media una regulación homeostática del H_2O_2 producido por el metabolismo aeróbico normal (González-Flecha and Demple, 1997a). Igualmente, los diferentes estados metabólicos generados por la adaptación al estrés por peróxido constituyen una ganancia de mutaciones de la función de *oxyR* (Anand et al., 2020).

Debido a los daños generados por el H_2O_2 , es importante identificar los genes de *E. coli* cuya expresión puede inducir resistencia al H_2O_2 (Figura 15) (Chen et al., 2021). Entre los genes regulados positivamente por OxyR se encuentra *katG* y *ahpCF* (Imlay, 2015b; Tartaglia et al., 1989). El sistema Ahp, que consta de AhpC y AhpF, que realizan reacciones catalíticas y de reactivación de AhpC, respectivamente, es el principal eliminador de H_2O_2 a microescala (Seaver and Imlay, 2001a), mientras que la HPI es una catalasa-peroxidasa responsable de degradar una gran cantidad de H_2O_2 (Storz et al., 1990a).

AhpC contiene dos residuos de Cys conservados para reducir el H_2O_2 mediante la formación de un enlace disulfuro, que posteriormente es reciclado por AhpF usando NADH como equivalente reductor (Poole, 2005). La inactivación frente a altas dosis de H_2O_2 puede ser útil, ya que evita que la enzima agote el NADH celular en un intento infructuoso de degradar dosis abrumadoras de H_2O_2 (Imlay, 2008). Cuando dosis más altas de H_2O_2 saturan AhpCF (Seaver and Imlay, 2001a), la catalasa es fuertemente inducida y se convierte en la principal enzima depuradora.

La HPI exhibe una K_m alta, por lo que no está saturada ni siquiera con dosis milimolares de H_2O_2 (Hillar et al., 2000). Es importante destacar que, debido a que la catalasa dismuta el H_2O_2 , su tasa de renovación no está restringida por la disponibilidad de equivalentes reductores (Imlay, 2008). Aunque AhpCF descompone múltiples peróxidos además del H_2O_2 , no puede compensar completamente la pérdida de catalasa (Wan et al., 2019). En condiciones anaeróbicas, el gen *yhjA* codifica una Ccp, que desempeña un papel en la respuesta al estrés por H_2O_2 , ya que permite que la cadena respiratoria emplee H_2O_2 como oxidante terminal (Khademian and Imlay, 2017). La proteína está regulada tanto por FNR como por OxyR (Figura 15) (Partridge et al., 2007).

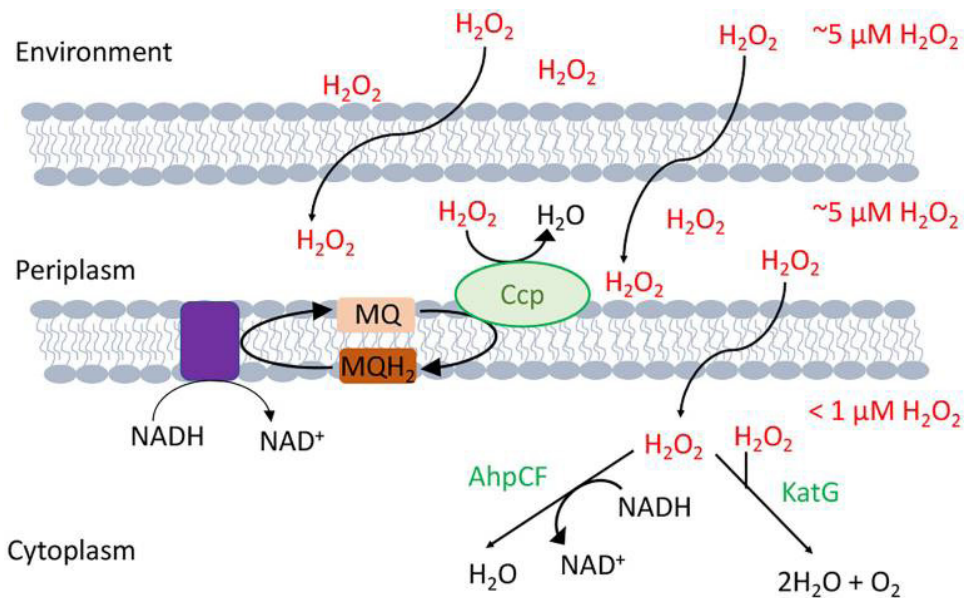


Figura 15: Flujo de H_2O_2 en *E. coli*. El H_2O_2 se difunde gradualmente en el citoplasma, donde es degradado por AhpCF y catalasa. En condiciones hipóxicas, OxyR induce la Ccp, que permite que la cadena respiratoria emplee H_2O_2 como oxidante terminal. Tomada de Sen and Imlay, 2021.

Existe una íntima relación entre el metabolismo del Fe y el estrés oxidativo. En respuesta al estrés oxidativo, OxyR modula los niveles de Fur, que actúa de forma protectora para prevenir la toxicidad por Fe (Zheng et al., 1999). El represor de los genes de importación del Fe se activa al unirse a Fe^{2+} o Fe^{3+} (Mills and Marletta, 2005). La actividad de Fur disminuye cuando se incrementan los niveles de H_2O_2 , indicando que H_2O_2 inactiva la proteína y la inducción de *fur* por OxyR compensaría su inactivación por oxidantes (Varghese et al., 2007). Asimismo, cuando Fur es inducido por estrés oxidativo proporciona protección contra el daño oxidativo y la mutagénesis (Touati et al., 1995).

En *E. coli*, los operones implicados en el ensamblaje de racimos Fe-S son *sufABCDSE* (J.H. Lee et al., 2004) e *iscRSUA* (Schwartz et al., 2001). Si bien ambos son inducidos durante la exposición al H_2O_2 (Zheng et al., 2001), la regulación del operon *isc* (Schwartz et al., 2001) está mediada por IscR, mientras que el operon *suf* requiere de OxyR, IHF (factor huésped de integración), Fur e IscR. La múltiple vía de respuesta al estrés oxidativo y a la limitación del Fe en la regulación de *suf* coincide con el papel especializado del sistema Suf en condiciones oxidativas y condicionadas por Fe (Lee et al., 2008). Un estudio de microarray de ADN en *E. coli* confirma que el operón *suf* es parte del regulón *fur* (McHugh et al., 2003) y es reprimido por la

Introducción

proteína Fur (Outten et al., 2004).

El metabolismo de los metales se altera durante el estrés por H_2O_2 . OxyR induce a la proteína Dps, que se encarga de secuestrar el Fe no incorporado, evitando así daños oxidativos en el ADN (Figura 16) (Almirón et al., 1992; Altuvia et al., 1994; Chiancone and Ceci, 2010; Park et al., 2005). Del mismo modo, las enzimas dependientes del Fe en la vía biosintética del hemo son reemplazadas (HemF) o inducidas (HemH) con el fin de sostener este proceso a medida que el hierro intracelular se vuelve escaso (Mancini and Imlay, 2015). Asimismo, debido a que las enzimas cargadas de Fe son vulnerables a la reacción de Fenton, la sustitución por Mn puede prevenir el daño a las proteínas. El importador de manganeso MntH es inducido por OxyR, para desplazar al Fe como cofactor catalítico de las enzimas mononucleares cuando los niveles de H_2O_2 son elevados (Anjem et al., 2009).

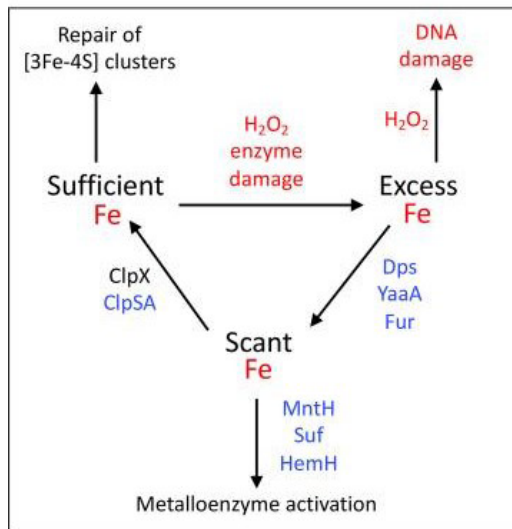


Figura 16: Modelo de respuesta al estrés oxidativo por H_2O_2 . Las proteínas en azul son inducidas por OxyR. Dps, YaaA y Fur colaboran para reducir los niveles de Fe. En cambio, MntH, Suf, y HemH aseguran la activación continua de enzimas Fe-S cuando el Fe es escaso. Tomada de Sen et al., 2020.

YaaA, otra proteína inducida por OxyR, también tiene un papel en el control de los niveles de Fe. Disminuye los niveles celulares de Fe con una función no definida actualmente, pero que se postula que podría interferir en las diferentes vías del metabolismo del Fe, inhibiendo el transporte del Fe al interior de la célula, aumentando el eflujo del Fe, protegiendo las enzimas susceptibles de ser

inactivadas por Fe (clúster Fe-S) o reduciendo el Fe libre incrementando las enzimas que incorporan Fe (Liu et al., 2011).

El objetivo del sistema OxyR no es solo permitir que *E. coli* sobreviva al H₂O₂, sino que permita su crecimiento en su presencia. Para ello, el factor de transcripción OxyR también impulsa la expresión del operón *clpSA* durante el estrés por H₂O₂. Las proteínas Clp aseguran el mantenimiento de los depósitos de Fe como para para que los racimos dañados de Fe-S puedan ser reparados (Figura 16) (Sen et al., 2020).

OxyR también activa los genes *grxA*, *trxC* y *gorA* durante la exposición a H₂O₂ (Imlay, 2008; Tao, 1997). Se ha demostrado que tanto los sistemas de Trx como los sistemas de Grx desempeñan un papel en la determinación del equilibrio tiol-disulfuro en el citoplasma de *E. coli* (Prieto-Álamo et al., 2000). También OxyR detecta azufre de sulfato, activando la expresión de Trx2 y Grx1. Se sabe que las dos enzimas reducen el azufre de sulfato a H₂S, representando un mecanismo para las bacterias para hacer frente al estrés causado por azufre de sulfato (Hou et al., 2019).

Como sensor de H₂O₂ y regulador transcripcional, OxyR además de desencadenar la transcripción de genes antioxidantes, activa otras proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y la síntesis de la pared celular (Seo et al., 2015). La enzima MetE es una metionina sintasa independiente de la cobalamina, codificada por el gen *metE* y activada por OxyR, que cataliza el paso final en la biosíntesis de metionina en *E. coli* en condiciones aeróbicas (Mordukhova and Pan, 2013). Dado que esta enzima es vulnerable al estrés oxidativo, parece que *E. coli* puede tratar de aumentar la expresión de *metE* para superar la escasez de aminoácidos esenciales (Hondorp and Matthews, 2004). Además, OxyR también activa directamente *mepM*, codificando una DD-endopeptidasa, necesaria para una nueva incorporación de peptidoglicano (Singh et al., 2012). Así, la activación daría lugar a un aumento del espesor de la membrana externa, posiblemente para soportar el estrés oxidativo procedente del medio ambiente (Seo et al., 2015).

Mientras que el sistema OxyR está muy extendido entre las bacterias, un mecanismo alternativo de detectar y responder al H₂O₂ existe en muchas bacterias Gram-positivas. PerR es el principal regulador de la respuesta al estrés por peróxido de hidrógeno, una propiedad que lo hace funcionalmente análogo a OxyR (Duarte and Latour, 2010; Dubbs and Mongkolsuk, 2012). Sin embargo, en varios casos, PerR se encuentra junto con OxyR (Hahn et al., 2002). *Bacillus subtilis* PerR es el prototipo de una familia extendida de sensores de peróxido dependientes de metales que

regulan los genes inducibles de defensa de peróxido (Lee and Helmann, 2006).

4.4.3. Regulación de la respuesta al estrés nitrosativo

Los organismos han desarrollado mecanismos para la desintoxicación de NO \cdot . Las reductasas de NO \cdot (NOR) disminuyen el NO a N $_2$ O (Zumft, 1997). Por su parte, los microbios también expresan NO \cdot dioxigenasas (NOD) que utilizan O $_2$ para convertir el NO \cdot a nitrato (Hausladen et al., 1998). Mientras que *E. coli* emplea ambas enzimas, la exposición al NO \cdot provoca la síntesis de dos enzimas metabolizadoras de NO \cdot , NOD y NOR (NorVW) mediante la activación de la transcripción de sus genes correspondientes, *hmp* y *norVW* (Tucker et al., 2004). La contribución respectiva de cada enzima a la desintoxicación de NO \cdot depende principalmente de la disponibilidad del O $_2$ (Vasudevan et al., 1991). Así como NOD es eficaz en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, la actividad de NorVW se restringe a condiciones anaeróbicas o microaeróbicas (Gardner and Gardner, 2002).

NorR es el regulador que controla la transcripción de *norVW* en respuesta al estrés NO (Gardner et al., 2002), contiene un centro mononuclear de Fe no hemo, que se une reversiblemente al NO. La unión al NO \cdot estimula la actividad ATPasa de NorR, permitiendo la activación de la transcripción por la ARN polimerasa (D'Autréaux et al., 2005). En cambio, en condiciones aeróbicas, el NO \cdot reacciona con Fnr, provocando que pierda su actividad represora y permitiendo la transcripción de *hmp* (Gardner et al., 2003).

SoxR exhibe un mecanismo adicional de activación por NO \cdot . La exposición de las células al gas NO puro o al NO \cdot generado por macrófagos da como resultado la activación de la expresión de *soxS* dependiente de SoxR (Nunoshiba et al., 1993). La activación de SoxR por NO \cdot es independiente de la presencia de O $_2$; de hecho, el NO \cdot es un activador más eficaz de SoxR en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. Por tanto, los productos de NO dependientes de O $_2$, como el ONOO \cdot , no participan en la se nalizaci n de SoxR (Pomposiello and Demple, 2001).

Dado que las actividades transcripcionales de SoxR nitrosilado y SoxR oxidado son análogas, el ADN presente en el complejo SoxR nitrosilado puede estar en una conformación similar a la observada en el complejo SoxR oxidado (Kobayashi et al., 2014). La activación de SoxR por NO \cdot ocurre a través de la modificación directa de los centros [2Fe-2S] para formar aductos de dinitrosil-hierro-ditiol unidos a proteínas (DNIC). Los centros oxidados [2Fe-2S] contrastan con las formas nitrosiladas

generadas por el NO; mientras los primeros permanecen intactos, los segundos se destruyen parcialmente. SoxR nitrosilado tiene una vida media de apenas unos min en células intactas, lo que indica que las vías enzimáticas eliminan activamente los centros de Fe-S nitrosilados (Ding and Demple, 2000).

Aunque el H_2O_2 es el activador mejor caracterizado de OxyR, ciertos S-nitrosotioles (RSNO) pueden también activar el regulón. Los paralelos entre las respuestas de H_2O_2 y RSNO son notables. Los RSNO también comprometen los niveles de GSH, pero a través de la S-nitrosación en lugar de la oxidación (Hausladen et al., 1996). La S-nitrosilación parece transmitir un estrés nitrosativo endógeno durante la respiración anaeróbica controlada por el factor de transcripción OxyR, que anteriormente se pensaba que solo operaba en condiciones aeróbicas. Los componentes del regulón inducidos por OxyR S-nitrosilado protegen contra el estrés nitrosativo endógeno y la protección se confiere al menos en parte limitando la S-nitrosilación. Por lo tanto, OxyR detecta tanto eventos oxidativos como nitrosativos (Seth et al., 2012).

La S-nitrosilación endógena en *E. coli* depende de la actividad enzimática de la proteína de agrupación híbrida Hcp e implica el ensamblaje de un interactoma Hcp que incluye: enzimas que generan NO; sintetizan proteínas SNO y propagan la señalización basada en SNO. SNO-Hcp puede entonces S-nitrosilar múltiples proteínas asociadas, incluyendo OxyR (Seth et al., 2018).

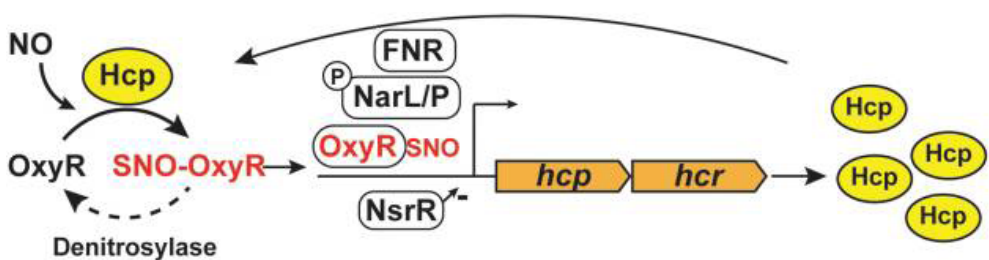


Figura 17: Regulación de la S-nitrosilación de OxyR. Tomada de Seth et al., 2019.

La S-nitrosilación de OxyR por Hcp activa la transcripción mediada por OxyR, que a su vez regula al alza Hcp. En la Figura 17 se muestran los reguladores transcripcionales de *hcp* (FNR, NarL/P y NsrR) (Seth et al., 2019). El factor de transcripción Fnr es

necesario para la expresión de muchos genes necesarios para el metabolismo anaeróbico (Kang et al., 2005), mientras que NarL/P (proteínas reguladoras de la respuesta de nitrato/nitrito) responden a los niveles de nitrato disponibles para inducir los genes necesarios como la nitrato reductasa, NarG (Rabin and Stewart, 1993). Asimismo, en presencia de NO₂, la represión de *hcp* por NsrR disminuye (Filenko et al., 2007). En conjunto, Hcp es parte de la maquinaria de protección contra NO₂, los niveles basales de Hcp están controlados durante la anaerobiosis por Fnr, NarL, NarP y NsrR, mientras que OxyR regula la inducción adicional de Hcp para crear un ciclo de retroalimentación positiva. SNO-OxyR es desnitrosilado por enzimas (denitrosilasas) que aún no han sido identificadas (Seth et al., 2019).

5. Citometría de flujo como método de estudio

En los últimos años el campo de la Citómica se ha convertido en un área de gran impacto, que integra el conocimiento de la genómica y de la proteómica en el estudio de los citomas, entendidos como los sistemas celulares heterogéneos de los organismos pluricelulares (Bernas et al., 2006). Es considerada una disciplina científica de análisis celular cuyo objetivo es definir el fenotipo molecular de las células individuales, como resultado de la interacción entre el genotipo y la exposición a factores internos y externos. El desarrollo de la Citómica ha sido posible gracias a las nuevas y potentes tecnologías basadas en los análisis de células individuales, es decir, citometría de flujo (CMF) (Valet, 2005).

La CMF permite la medición simultánea de emisiones de fluorescencia y dispersión de luz inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección (Shapiro, 1983). Wallace Coulter, en 1954, describió el primer analizador de flujo (Coulter, 1956). Aunque habrá que esperar a 1965 para que se utilizase un citómetro de flujo de dos parámetros para determinar el contenido de ácido nucleico de las células. Este instrumento representó el primer citómetro de flujo multiparamétrico (Kamentsky et al., 1965). En esa misma fecha, el primer sorter fue descrito (Fulwyler, 1965). Posteriormente, en 1983, se introdujeron los citómetro de flujo de uso clínico, ya que la citometría constituye una tecnología de gran importancia en la biología celular y en la medicina clínica, así como en varios otros campos asociados (Brown and Wittwer, 2000; Drouet and Lees, 1993).

La citometría tiene como finalidad medir las características físicas y químicas de las

células o partículas biológicas. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitada por el rayo luminoso (Macey, 2007). La dispersión de la luz es la deflexión de la luz incidente por una partícula. La CMF tiene dos detectores de dispersión de luz diferentes, la dispersión hacia adelante (FSC, Foward Scatter), una medida de tamaño celular y la dispersión en ángulo recto (SSC, Side Scatter) que depende de la complejidad celular y la granularidad (Adan et al., 2017).

Los principales componentes de los citómetros de flujo son: la fluídica, la óptica y la electrónica. Las células se transportan a una corriente de flujo hidrodinámico donde existen dos compartimentos: el líquido que contiene la suspensión celular y el fluido hidrodinámico, denominado envolvente (Sheath), que rodea al líquido que contiene la muestra. El sistema óptico incluye las fuentes de luz de excitación, lentes y filtros que recogen la luz emitida hacia varios detectores (Shapiro, 2005). Los láseres empleados en los citómetros de flujo son 488 nm (azul), 405 nm (violeta), 532 nm (verde), 561 nm (verde-amarillo), 640 nm (rojo) y 355 nm (ultravioleta). Una serie de filtros dicróicos dirigen la luz fluorescente a detectores o fotomultiplicadores (PMT) específicos. Además, existen instrumentos que han sustituido los PMT por fotodiodos de avalancha (APD) para la detección de fluorescencia con el objetivo de aumentar la sensibilidad. El sistema electrónico detecta las señales generadas por los detectores y las convierte en datos digitales. Dichas señales son proporcionales a la cantidad de luz dispersada o a la intensidad de fluorescencia y convierte las señales en un dato digital (Adan et al., 2017; McKinnon, 2018).

La CMF es una tecnología muy poderosa para fenotipar y caracterizar las células a nivel de una sola célula. Permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a una velocidad de adquisición de datos que alcanza los miles de eventos por segundo. La evolución de los nuevos fluorocromos, proteínas fluorescentes, colorantes en tándem y colorantes poliméricos permite trabajar con hasta 30-50 parámetros a la vez (Drescher et al., 2021). Debido a la gran disponibilidad de marcadores fluorescentes y a la multiplicidad de los detectores de fluorescencia, los ensayos citómicos pueden ser considerados como multiparamétricos, policromáticos y multiplexados (O'Connor et al., 2001).

Desde el punto de vista de su aplicabilidad a modelos biológicos, las técnicas

Introducción

citómicas no son invasivas, por lo que las poblaciones celulares examinadas pueden encontrarse en condiciones cuasifisiológicas en el momento de su análisis. Además, presentan la ventaja de requerir pequeños volúmenes de muestra (O'Connor et al., 2001). Así, la CMF se puede aplicar a la monitorización fenotípica de los efectos de fármacos y xenobióticos sobre el organismo entero, proporcionando múltiples biomarcadores de exposición y de efecto (Herrera et al., 2007). Con el rápido desarrollo de citómetros de flujo y reactivos también surgen desafíos durante las diferentes etapas experimentales y analíticas, incluida la elección de reactivos y anticuerpos, la preparación de células a analizar y el análisis final de datos (Cossarizza et al., 2019).

La introducción del parámetro “Tiempo” a principios de la década de 1980, permite medir los cambios de los parámetros celulares a lo largo del tiempo (Martin and Swartzendruber, 1980). El análisis funcional cinético por citometría de flujo reviste unas propiedades especiales de adquisición de datos y generación de resultados, que justifican la proposición del término “In Fluxo” para definir el análisis cinético por citometría de flujo (O'Connor et al., 2005). Desde entonces, las publicaciones que emplean citometría de flujo en tiempo real (RT-CMF) comenzaron a ser reportadas (Dolz et al., 2004; Monteiro et al., 2003, 1999).

El fenómeno biológico de interés sucede y evoluciona mientras las células individuales son analizadas en tiempo real en el citómetro de flujo. Esta característica permite evaluar los cambios que se producen en la muestra con una resolución inferior a un segundo. La duración de los períodos de tiempo de análisis puede ir desde pocos segundos a varios minutos y el número total de células analizadas puede ser muy elevado (Arnoldini et al., 2013). El análisis cinético es ventajoso cuando se abordan fenómenos dinámicos muy rápidos y/o transitorios (O'Connor et al., 2005).

Dada la participación de ROS y RNS en cuestiones fisiológicas y patológicas, la investigación de biomarcadores de estrés oxidativo adquiere un papel esencial para muchos campos biomédicos (Frijhoff et al., 2015). Las estrategias citómicas para el estudio del estrés oxidativo se basan en (O'Connor et al., 2017):

- Detección directa de ROS y RNS, los iniciadores del proceso de estrés oxidativo. Esta tarea es compleja debido a la baja concentración, la corta vida media y extensas interacciones de ROS y RNS, así como por limitaciones intrínsecas de tanto sondas como condiciones experimentales.

- Detección de productos más estables de reacción ROS y RNS con componentes celulares o con sondas exógenas, incluido el análisis de peroxidación lipídica y daño oxidativo al ADN.
- Evaluación de las defensas antioxidantes, principalmente proteínas que contienen GSH y SH. Este enfoque indirecto del estrés oxidativo puede verse limitado por cuestiones relacionadas con la complejidad de la defensa antioxidante por sí misma y a la especificidad de las enzimas requerido para informes fluorescentes del proceso.

El análisis basado en fluorescencia del estrés oxidativo y los procesos relacionados conforman una aplicación citómica importante (Martínez-Pastor et al., 2010; Shehat and Aranjuez-Tigno, 2019). El uso de sondas fluorescentes y sustratos fluorogénicos parece un enfoque simple y fácil para la detección y cuantificación de la producción de ROS y RNS en sistemas celulares (Cottet-Rousselle et al., 2011; Halliwell and Whiteman, 2004). No obstante, hay muchas limitaciones y artefactos en esta metodología (Kalyanaraman et al., 2012). Es fundamental detectar y caracterizar estas especies con precisión para determinar el papel específico de ROS y RNS en el estrés oxidativo (O'Connor et al., 2017).



Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

La CMF se utiliza con gran frecuencia para el estudio cuantitativo de la generación intracelular de ROS y RNS, gracias a la disponibilidad de diversos tipos de sustratos fluorogénicos y fluorocromos. Sin embargo, como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Tesis, múltiples problemas derivados de la selectividad del marcaje, y otros factores biológicos y metodológicos pueden limitar el valor de los resultados obtenidos y conducir a interpretaciones erróneas de los mismos.

Esta Tesis Doctoral se basa en la Hipótesis de que un diseño apropiado de protocolos experimentales para el estudio del estrés oxidativo por CMF puede permitir evaluar tanto la especificidad de detección, como las posibles interferencias con el metabolismo de ROS y RNS de los sustratos fluorogénicos experimentales.

Para responder a esta Hipótesis, se estudiarán diferentes sustratos fluorogénicos y combinaciones de los mismos, sobre diferentes modelos celulares de estrés oxidativo inducido por xenobióticos generadores de ROS y RNS. Se establecerán, además, diferentes tipos de control negativo, con inhibición química o genética de enzimas clave de la defensa antioxidante. Por último, para abordar los fenómenos temporales relacionados con la generación de ROS y RNS, la RT-FCM proporcionará un método muy ventajoso para el estudio multiparamétrico y cinético.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y la aplicación de ensayos multiparamétricos de RT-FCM, que permitan medir la generación de ROS y NOS con sondas fluorogénicas individuales y en combinación, según su compatibilidad espectral.

Para alcanzar este objetivo principal, se proponen una serie de objetivos metodológicos:

1. Poner a punto ensayos citómicos de viabilidad celular para elucidar los efectos citotóxicos y no citotóxicos de los xenobióticos y compuestos de control positivo y negativo.
2. Desarrollar ensayos por CMF con sustratos fluorogénicos para determinar a tiempo final la generación de ROS y RNS en suspensiones celulares tratadas con

Hipótesis y Objetivos

xenobióticos y compuestos inhibidores de enzimas antioxidantes.

3. Desarrollar ensayos por RT-CMF con sustratos fluorogénicos para determinar en tiempo real la generación de ROS y RNS en suspensiones celulares tratadas con xenobióticos.
4. Detectar e interpretar posibles interferencias entre sustratos fluorogénicos y de los sustratos fluorogénicos con el sistema biológico que pueden limitar la aplicabilidad de ensayos multiparamétricos de estrés oxidativo por CMF y RT-CMF, haciendo uso de sondas fluorescentes individuales y combinadas, en las diferentes condiciones experimentales.
5. Evaluar la aplicabilidad en el estudio citométrico de estrés oxidativo y nitrosativo de cepas genéticamente modificadas de *E. coli* B, deficientes en distintas funciones clave de la defensa antioxidante.
6. Establecer criterios objetivos para el diseño racional de paneles citométricos de utilidad para el estudio de la generación intracelular de ROS y RNS.



Material y métodos

1. Material biológico

1.1. Líneas celulares y medios de cultivo rutinario

Las líneas celulares que componen nuestro estudio son Jurkat y N13, descritas a continuación:

- Células Jurkat (ATCC TIB-152): Es una línea celular linfocítica humana derivada de una leucemia linfoblástica aguda T. Fue adquirida de la ATCC (American Type Culture Collection).
- Células N13: Se trata de una línea celular derivada de un hepatoma de rata inducido en una rata Wistar con 4-dimetilaminoazobenceno. Esta línea celular fue generada en el Departamento de Patología de la Universidad de Valencia (Juan et al., 1996).

Las células Jurkat y N13 se mantienen en suspensión en RPMI 1640 (Gibco 11875093) con L-Glutamina, suplementado 1 % de los antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco 15140122) y 10 % suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (Gibco, 16140071).

Las líneas son cultivadas en condiciones estándar a 37°C y 5 % de CO₂ en frascos de 75 cm². Para mantener un crecimiento exponencial, los cultivos se dividieron cada dos o tres días en medio fresco. La densidad celular no debe exceder el valor crítico de 3x10⁶ células/mL y la concentración celular óptima varía entre 1x10⁵ y 1x10⁶ células/mL.

La concentración de células Jurkat empleada en los experimentos de tiempo final es 250.000 células/mL. En los experimentos cinéticos, la concentración celular de las líneas Jurkat y N13 es 500.000 células/mL. Para los diferentes tratamientos se utiliza las células resuspendidas en medio RPMI sin SBF.

1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo rutinarios

Las cepas bacterianas utilizadas en el estudio (Tabla 6) proceden de la colección original del Laboratorio de Toxicología Genética del antiguo Instituto de Investigaciones Citológicas de la Caja de Ahorros de Valencia y fueron donadas amablemente por el Dr. Manuel Blanco Pérez. Se trata de cepas de WP2 de *E. coli* B, que son la base del ensayo de mutagénesis inversa análogo al test de Ames.

Material y métodos

Para aumentar la sensibilidad del modelo bacteriano en la detección de mutaciones inducidas por daño oxidativo, el Laboratorio de Toxicología Genética desarrollo una serie de nuevas cepas deficientes en funciones esenciales para la defensa antioxidante. Las deficiencias introducidas impiden la síntesis inducida por el estrés de enzimas antioxidantes tales como catalasa-peroxidasa, AhpCF y SOD y determinan una mejora en la detección de daños causado por ROS (Blanco et al., 1998b, 1998a; Martínez et al., 2000).

Tabla 6: Cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa	Especie	Genotipo
IC188	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA <i>oxyR</i> ⁺ /pKM101
IC203	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA Δ <i>oxyR30</i> /pKM101
IC5228	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA <i>sodA</i> ⁻ /pKM101
IC5229	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA <i>sodB</i> ⁻ /pKM101
IC5232	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA <i>sodAB</i> ⁻ /pKM101
IC5233	<i>E. coli</i> B	WP2uvrA Δ <i>oxyR30 sodAB</i> ⁻ /pKM101

Los medios de cultivos de las bacterias empleados son:

- Luria Broth (LB): 10 g de Bacto Triptone (Gibco 211705), 5 g de Yeast extract (Gibco 212750), 5g de NaCl (Sigma-Aldrich S9888). Agua destilada 1000 mL. Disolver y autoclavar.
- LB agar (LA): 10 g de Bacto Triptone (Gibco 211705), 5 g de Yeast extract (Gibco 212750), 5 g de NaCl (Sigma-Aldrich S9888), 20 g de Bacto Agar (BD 214010). Agua destilada 1000 mL. Disolver y autoclavar.
- Soft Agar: 6 g de Bacto Agar (BD 214010) y 6g de NaCl (Sigma-Aldrich S9888). Agua destilada 1000 mL. Disolver y autoclavar.

Para los diferentes experimentos se realizan dos tipos de cultivos:

- Cultivo estacionario: Se inoculan 9 mL de medio LB con 100 μ L 100 uL de un cultivo criopreservado. Se incuba a 37°C durante 24 horas aproximadamente.
- Cultivo exponencial: Se inoculan 10 ml de medio LB con 200 μ L de un cultivo

de un cultivo estacionario. Se incubó a 37°C durante 5-6 horas hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6.

2. Reactivos

2.1. Sondas y sustratos fluorogénicos de estrés oxidativo y nitrosativo

El uso de sondas fluorescentes y sustratos sustratos fluorogénicos constituye un enfoque fácil para la detección y cuantificación de la producción de ROS y RNS en células. En este apartado se mencionan las empleadas en dicho trabajo.

2',7'- Diclorodihidrofluoresceína Diacetato (DHDCF)

La DHDCF es la sonda intracelular más utilizada para medir el estrés oxidativo. Presenta ciertas ventajas sobre otras técnicas: fácil de usar, extremadamente sensible a los cambios en el estado redox de una célula, económica y se puede emplear para seguir los cambios en ROS a lo largo del tiempo (Eruslanov and Kusmartsev, 2010).

DHDCF se puede aplicar en estudios celulares debido a su capacidad de difusión a través de la membrana celular, siendo luego hidrolizada enzimáticamente por esterasas intracelulares, generando un producto relativamente polar e impermeable a la membrana celular, 2',7'- diclorodihidrofluoresceína. Esta molécula no fluorescente se acumula intracelularmente y la oxidación posterior genera el producto altamente fluorescente, 2,7-diclorofluoresceína (Halliwell and Whiteman, 2004; LeBel et al., 1992). La presencia de peroxidasas celulares es importante para la oxidación de DHDCF por H_2O_2 (Figura 18) (Myhre et al., 2003).

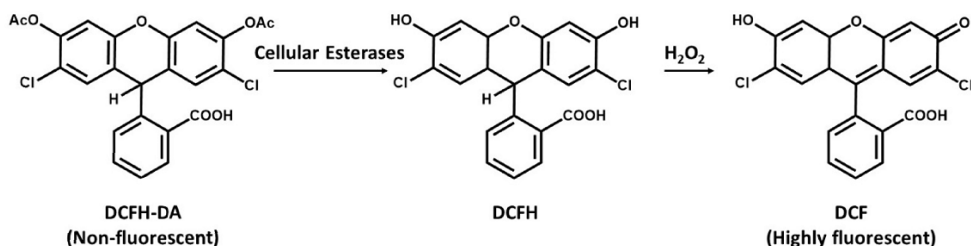


Figura 18: Mecanismo de desesterificación de DCFH-DA a DCFH y posterior conversión en DCF. Modificada de Gomes et al., 2005.

Material y métodos

La acumulación de DHDCF en las células puede medirse mediante un aumento de la fluorescencia a 522 nm cuando la muestra se excita a 498 nm. La fluorescencia a 530 nm se puede medir utilizando un citómetro de flujo y se supone que es proporcional a la concentración de H_2O_2 en las células (Royall and Ischiropoulos, 1993). Aunque inicialmente DHDCF fue ampliamente aceptado como un indicador específico para H_2O_2 (Keston and Brandt, 1965), es oxidada por otras ROS, como el $OH\cdot$ y $ROO\cdot$, y también por RNS, como el $NO\cdot$ y el $ONOO\cdot$ (Crow, 1997; Wang and Joseph, 1999).

Dihidrorodamina (DHR123)

DHR123 es una molécula no fluorescente que tras la oxidación genera rodamina 123, una sonda catiónica altamente fluorescente alrededor de 536 nm cuando se excita a aproximadamente 500 nm (Halliwell and Whiteman, 2004). La rodamina 123 es lipofílica y está cargada positivamente, y tiende a acumularse en las mitocondrias, retenidas allí por el potencial de membrana (Crow, 1997).

Como DHDCF, DHR123 es oxidada por H_2O_2 en presencia de peroxidasas (Figura 19), pero esta sonda tiene baja especificidad, ya que también puede ser oxidado por otros oxidantes reactivos, como $ONOO\cdot$ (Gomes et al., 2005; Kooy et al., 1994). DHR123 también es más sensible a la detección de HOCl que H_2DCF (Buxser et al., 1999). Por otro lado, DHR123 no es directamente oxidable por solo H_2O_2 , ni por $O_2\cdot^-$ o por el sistema XO (Henderson and Chappell, 1993; Royall and Ischiropoulos, 1993).

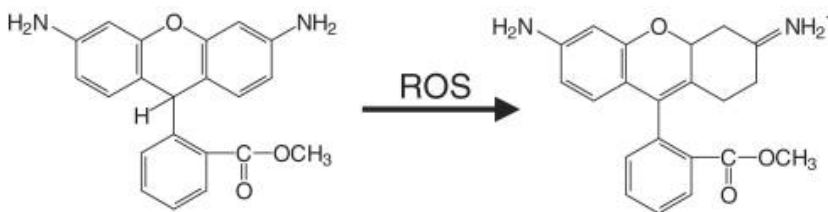


Figura 19: Conversión de DHR123 a rodamina 123. Tomada de Halliwell and Whiteman, 2004.

La rodamina 123 y el etidio pueden ser expulsados de las células por bombas de eflujo conjugado fármaco, por lo que la presencia y actividad de estos sistemas de transporte de membrana en las células en estudio es un factor que debe considerarse (Buxser et al., 1999).

Mitocondria Peroxy Yellow 1 (MitoPY1)

Sonda fluorescente que detecta los niveles de H_2O_2 dentro de las mitocondrias de las células vivas. MitoPY1 posee un interruptor quimioselectivo basado en boronato, para responder selectivamente a H_2O_2 sobre otras ROS competidoras, y una fracción de trifenilfosfonio dirigida a las mitocondrias para la detección de H_2O_2 localizado en las mitocondrias celulares. MitoPY1 se excita a 498 nm y presenta una emisión débil a 540 nm (Dickinson and Chang, 2008).

Las ventajas de MitoPY1 incluyen la especificidad de ROS, la detección específica de orgánulos y la capacidad de usar esta sonda tanto en cultivos celulares como en modelos de tejidos. Los inconvenientes incluyen la reacción irreversible y relativamente lenta con H_2O_2 (Dickinson et al., 2013).

Hidroetidina o Dihidroetidina (HE)

HE se utiliza ampliamente como sustrato fluorogénico para la detección del $O_2^{\cdot -}$ (Benov et al., 1998; Walrand et al., 2003), aunque también presenta oxidación mínima inducida por H_2O_2 o HOCl (Benov et al., 1998). HE es permeable a la membrana y en el citosol exhibe fluorescencia azul, pero una vez oxidado por $O_2^{\cdot -}$, genera 2-hidroxi-etidio (E^+), un compuesto fluorescente con excitación a 520 nm y emisión a 610 nm (Münzel et al., 2002). E^+ se retiene en el núcleo, intercalando con el ADN, hecho que aumenta su fluorescencia (Figura 20) (Gomes et al., 2005).

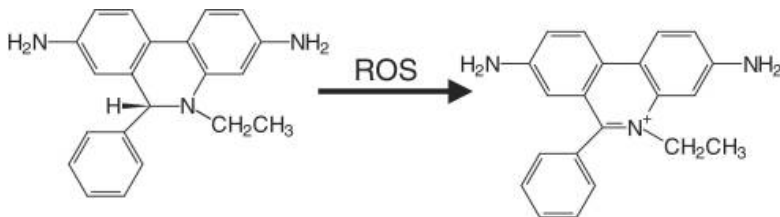


Figura 20: Conversión de HE a etidio. Tomada de Halliwell and Whiteman, 2004.

HE se ha empleado en diversos estudios relacionados con el estallido oxidativo en leucocitos (Rothe and Valet, 1990) y con la inflamación (Barbacanne et al., 2000; Carter et al., 1994). Sin embargo, HE puede tener limitaciones importantes cuando se utiliza para el análisis de $O_2^{\cdot -}$ intracelular. Se ha demostrado que el citocromo c es capaz de oxidar HE, un aspecto que puede ser importante en situaciones donde el $O_2^{\cdot -}$ detectado es principalmente de origen mitocondrial o en condiciones que

Material y métodos

conducen a la apoptosis, donde el citocromo c es liberado al citosol. Debido a la interconexión entre el estrés oxidativo y los procesos apoptóticos, es difícil, en estas situaciones, asumir que la oxidación a E^+ depende solo del $O_2^{\cdot-}$ (Tarpey et al., 2004).

Reactivo rojo de superóxido mitocondrial MitoSOX (MitoSox Red)

MitoSOX Red, un derivado catiónico de HE, para la detección selectiva de $O_2^{\cdot-}$ en las mitocondrias de células vivas (Robinson et al., 2008). Contiene un sustituyente trifenilfosfonio catiónico que se dirige selectivamente a las mitocondrias. La oxidación rápida por $O_2^{\cdot-}$, no por otras especies reactivas, genera fluorescencia roja a 580 nm cuando se excita a 520 nm (Figura 21) (Thermofisher, 2022).

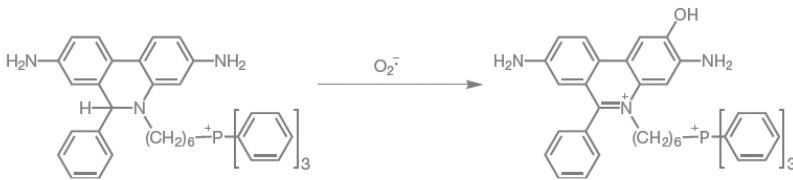


Figura 21: Oxidación de MitoSox Red por parte de $O_2^{\cdot-}$. Tomada de Thermofisher 2022a.

MitoSOX Red se ha utilizado para la detección de la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en una amplia variedad de tipos de células y condiciones (De Biasi et al., 2016; Mukhopadhyay et al., 2007b). Además, dado que las mitocondrias juegan un papel fundamental en el proceso de la apoptosis, que puede ser desencadenada por ROS, MitoSox Red también se ha empleado para detectar cambios en el $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial asociado con la inducción y ejecución del proceso de apoptosis (Mukhopadhyay et al., 2007a).

Las propiedades espectrales de fluorescencia de MitoSox Red oxidado son idénticas a las de HE. Asimismo, la reactividad química de MitoSox Red con $O_2^{\cdot-}$ es similar a la reactividad de HE con $O_2^{\cdot-}$, así que todas las limitaciones de HE se aplican también a MitoSox Red (Zielonka and Kalyanaraman, 2010).

Familia de Reactivos CellROX

Los reactivos CellROX son una serie de reactivos patentados por Life Technologies-Thermofisher como sondas generales para la detección de ROS. Estas sondas que penetran en las células son débilmente fluorescentes en el estado reducido, pero exhiben fluorescencia fotoestable tras la oxidación por ROS (Ahn et al., 2012; 130

Davison et al., 2013).

CellROX Green se vuelve fluorescente solo con la unión posterior al ADN, limitando su presencia al núcleo o mitocondrias. Este compuesto tiene una excitación a 485 nm y una emisión a 520 nm. También puede fijarse con formaldehído. Por otro lado, CellROX Orange y CellROX Deep Red no requieren unión al ADN para la fluorescencia y son localizado en el citoplasma. CellROX Orange tiene una longitud de onda de excitación de 545 y una emisión de 565, mientras que CellROX Deep Red tiene un pico de excitación de 640 nm y un pico de emisión de 665 nm (DeLoughery et al., 2014).

Reactivos de Enzo Lifesciences

Oxidative Stress Green es una sonda fluorogénica, permeable a las células, que reacciona directamente con una amplia gama de ROS y RNS, generando un producto verde fluorescente indicativo de la presencia intracelular de diferentes tipos de ROS/RNS (Egawa et al., 2021). El reactivo Superoxide Orange, es una sonda permeable a las células que reacciona específicamente con el O_2^- y da lugar a un producto fluorescente de color naranja (Ding et al., 2015).

4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM)

DAF-FM diacetato es un reactivo que se utiliza para detectar y cuantificar concentraciones de NO . Es permeable a la membrana plasmática y escindido por esterasas para generar DAF-FM intracelular, para ser oxidado por NO a un producto de triazol con fluorescencia (Figura 22). El rendimiento cuántico de fluorescencia de DAF-FM aumenta aproximadamente 160 veces después de reaccionar con NO . Tiene un pico de excitación de 495 nm y un pico de emisión de 515 nm (Balcerczyk et al., 2005).

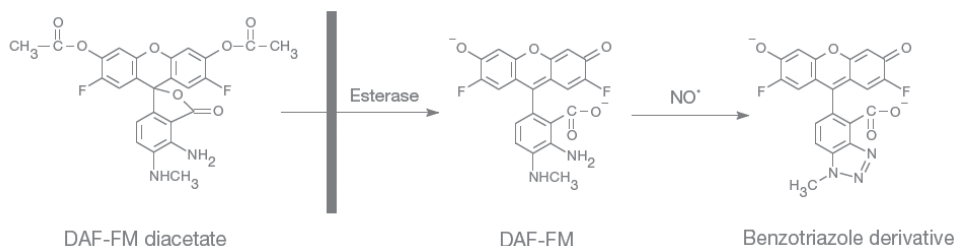


Figura 22: Esquema de reacción para la detección de NO por DAF-FM DA. Tomada de Thermofisher 2022a.

Material y métodos

DAF-FM se ha utilizado en muchos estudios relacionados con la generación de NO[•] bajo una variedad de condiciones experimentales (Kępczyński and Cembrowska-Lech, 2018; Xian et al., 2013), incluido el análisis cinético de generación y consumo de NO[•] en monocitos de sangre total mediante RT-CMF (Balaguer et al., 2017).

Las características más relevantes de reactivos utilizados para la detección de ROS y RNS en esta Tesis Doctoral se muestran resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7: Resumen de los sustratos fluorogénicos y las sondas utilizadas para determinar ROS y RNS.

Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Detección	Localización
DHDCF	498/522	Estrés oxidativo	Citoplasma
DHR123	500/536	H ₂ O ₂ , ONOO ⁻ , HOCL	Mitocondria
MitoPY1	498/540	H ₂ O ₂	Mitocondria
HE	520/610	O ₂ ^{-•}	Citoplasma
MitoSox Red	520/580	O ₂ ^{-•}	Mitocondria
CellROX Green	485/520	Estrés oxidativo	Núcleo y mitocondria
CellROX Orange	545/565	Estrés oxidativo	Citoplasma
CellROX Deep Red	640/665	Estrés oxidativo	Citoplasma
Oxidative Stress Green	490/525	ROS	Citoplasma
Superoxide Orange	550/620	O ₂ ^{-•}	Citoplasma
DAF-FM	495/515	NO [•]	Citoplasma

2.2. Fluorocromos para la determinación de viabilidad celular

Este trabajo está basado en el estudio principalmente de las células vivas, ya que se pretende estudiar cambios en los parámetros bioquímicos provocados por la acción de los tóxicos. Un parámetro que varía en función de la concentración de tóxico empleada es la viabilidad, observándose un número mayor de células muertas con concentraciones crecientes de tóxico. Para evaluar el porcentaje de células vivas se emplea diversos fluorocromos.

Yoduro de propidio (PI)

PI es un colorante impermeable de membrana que se excluye de las células viables. Se une al ADN de doble cadena intercalando entre pares de bases, aunque también se une al RNA. PI se excita a 488 nm y emite a una longitud de onda máxima de 617 nm (Johnson et al., 2013).

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

DAPI es un colorante de exclusión, que no puede atravesar las membranas plasmáticas intactas. Cuando la membrana celular está dañada, DAPI se puede unir a las regiones de ADN que son ricas en combinaciones nucleares de adenina-timina (Kepp et al., 2011; Wallberg et al., 2016).

Helix NP Green

Helix NP Green es una sonda de ácido nucleico impermeable a las células y, por lo tanto, se puede utilizar para la discriminación de células vivas y muertas. Se excita de manera óptima a 495 nm con una emisión a 519 nm (BioLegend, 2022).

SYTO 9

Tanto las membranas celulares procariontas y eucariotas vivas como las muertas son permeables a SYTO 9, que se une al ADN y al ARN, emitiendo fluorescencia verde. SYTO9 se utiliza junto a PI en los ensayos de viabilidad bacteriana (Deng et al., 2020; Stiefel et al., 2015).

Bis-(ácido 1,3-dibarbitúrico)-trimetina oxonol (DiBAC₄(3))

DiBAC₄(3) se emplea para medir el potencial de la membrana plasmática. Puede entrar en células despolarizadas donde se une a las proteínas intracelulares o a la membrana y muestra una mayor fluorescencia. Por el contrario, la hiperpolarización se indica mediante una disminución de la fluorescencia. Tiene un máximo de excitación de 490 nm y un máximo de emisión de 516 nm (Bortner et al., 2001).

Las principales características de los reactivos empleados para el estudio de la viabilidad celular en esta Tesis se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de los reactivos utilizados para determinar viabilidad celular.

Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Detección	Localización
PI	535/617	Muerte celular	Núcleo
DAPI	358/461	Muerte celular	Núcleo
Helix NP Green	495/519	Muerte celular	Núcleo
SYTO 9	485/498	Bacterias vivas	Núcleo
DiBAC ₄ (3)	490/516	Potencial de membrana plasmática	Citoplasma

2.3. Xenobióticos y compuestos de control

2.3.1. Xenobióticos generadores de peróxidos intracelulares

Para inducir la producción intracelular de ROS y RNS se han utilizado los siguientes compuestos prooxidantes modelo repetidamente empleados en estudios experimentales de estrés oxidativo y fármacos capaces de generar estrés oxidativo.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ es el principal metabolito implicado en la regulación redox. Su sobreproducción ejerce efectos tóxicos sobre la célula y su entorno circundante. La aberrante producción de H₂O₂ dentro de los compartimentos celulares está relacionado con diferentes afecciones patológicas. La exposición al H₂O₂ es un procedimiento ampliamente utilizado para causar estrés oxidativo en modelos celulares (Ransy et al., 2020).

Tert-butil hidroperóxido (t-BOOH)

El t-BOOH es un compuesto orgánico con la fórmula (CH₃)₃COOH. Se utiliza frecuentemente como sustancia modelo para la evaluación de los mecanismos de alteraciones celulares resultantes del estrés oxidativo en células y tejidos induciendo peroxidación lipídica. Normalmente se suministra como solución acuosa al 69-70%. En comparación con el H₂O₂, el t-BOOH es menos reactivo y más soluble en disolventes orgánicos (Hong et al., 2013; Hwang et al., 1996).

Hidroperóxido de Cumeno (CHP)

El CHP es un compuesto orgánico con la fórmula C₆H₅CMe₂OOH que induce la

peroxidación lipídica. Además, es un catalizador utilizado en la industria química y farmacéutica. El CHP es un intermediario para producir fenol y acetona a partir de benceno y propeno (Ayala et al., 1996).

2.3.2. Xenobióticos generadores de superóxido intracelular

Menadiona

La menadiona o 2-metil-1,4-naftoquinona es una cetona aromática policíclica que puede funcionar como precursor en la síntesis de vitamina K. Las quinonas experimentan redox cycle en la célula que generan H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ cuando el O_2 está presente (Klotz et al., 2014).

Plumbagina

La plumbagina o 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona es un metabolito secundario producido por diversas plantas. Ejerce propiedades anticancerígenas en varios modelos de cáncer celular que incluyen la inducción de la muerte celular apoptótica y la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 a través de redox cycle (Gaascht et al., 2014; Srinivas et al., 2004).

Paraquat dicloruro

El paraquat o 1,1'-dimetil-4-4'-dicloruro de bipyridinio es un herbicida altamente tóxico utilizado en agricultura. Ejerce sus efectos tóxicos principalmente debido a su redox cycling a través de la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en los organismos, lo que lleva a un desequilibrio en el estado redox de la célula causando daño oxidativo y finalmente la muerte celular (Blanco-Ayala et al., 2014).

2.3.3. Otros inductores de estrés oxidativo

Carbonilo cianuro- 4 - (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP)

FCCP es un agente de desacoplamiento porque interrumpe la síntesis de ATP mediante el transporte protones a través de una membrana mitocondrial antes de que puedan ser utilizados para proporcionar la energía para la fosforilación oxidativa (Khailova et al., 2017).

Propranolol hidrocloreuro

El propranolol es un β -bloqueante no selectivo usado principalmente en el

tratamiento de la hipertensión. Es útil como fármaco antihipertensivo, depresor cardíaco y también en el tratamiento de la angina de pecho. Disminuye el efecto del estrés y el ejercicio en el corazón al reducir la tasa de contracción y conducción del impulso. También se sabe que bloquea competitivamente la acción de las catecolaminas (Mansuy et al., 2000).

Epinefrina bitartrato

La epinefrina es una catecolamina natural, secretada por la médula de las glándulas suprarrenales. Actúa sobre los receptores α y β adrenérgicos, al estimular localmente los receptores α adrenérgicos, este agente causa vasoconstricción y reduce el flujo sanguíneo vascular (Rudra et al., 2014). Además, parece que la epinefrina ejerce efectos perjudiciales a través de productos oxidativos de su metabolismo (Radaković et al., 2018).

2.3.4. Xenobióticos donadores de Óxido Nítrico

NONOato de Dietilamina (DEA NONOato)

DEA NONOato es un complejo de dietilamina con NO^\cdot utilizado para generar una liberación controlada de NO^\cdot en solución (Shao et al., 2008). Se disocia espontáneamente en un proceso de primer orden dependiente del pH, con una vida media de 2 minutos a 37°C y libera 1,5 moles de NO^\cdot por mol de compuesto parental (Keefer et al., 1996).

3-morfolinosinonimina-N-etilcarbamida (SIN-1)

SIN-1 es el metabolito activo del fármaco vasodilatador molsidomina, se utiliza con frecuencia como compuesto modelo para la liberación continua de O_2^\cdot y NO^\cdot y por lo tanto para la formación continua de ONOO^\cdot (Lomonosova et al., 1998). SIN-1 se descompone espontáneamente en presencia de O_2 molecular para generar NO^\cdot y O_2^\cdot . Ambos productos se unen muy rápidamente para formar ONOO^\cdot (constante de velocidad k : $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Singh et al., 1999).

NOR-1

NOR-1, un derivado de NOR-3, es un agente donador de NO^\cdot en un corto período de tiempo (Ueki et al., 2002).

2.3.5. Antioxidantes solubles

N-acetilcisteína (NAC)

NAC el precursor del glutatión, es una molécula soluble en H₂O que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inhibidoras de tumores. Además, puede ejercer efectos antioxidantes tanto in vitro como in vivo. En general, se asume que la acción de NAC es eliminar los radicales libres aumentando el nivel GSH intracelular (Aruoma et al., 1989).

2.3.6. Inhibidores enzimáticos

Sodio dietilditiocarbamato (DETC)

DETC es un agente quelante de iones metálicos y actúa como inhibidor de SOD (Heikkila et al., 1976).

3-amino-1,2,4-triazol (3-AT)

El 3-AT inhibe la actividad de la catalasa uniéndose covalentemente a su centro activo (Ueda et al., 2003).

Las características más relevantes de los xenobióticos y moléculas de control utilizadas para esta Tesis se muestran resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9: Resumen de los xenobióticos y moléculas de control utilizadas.

Xenobiótico	Referencia/Casa comercial	Solvente	Efecto	[] Stock
H ₂ O ₂	H1009 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	9,8 M
t-BOOH	B2633 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	7,22 M
CHP	247502 Sigma-Aldrich	DMSO, medio de cultivo	Estrés oxidativo	5,41 M
Menadiona	5225 Sigma-Aldrich	DMSO	Donador de O ₂ ⁻	58,08 mM
Plumbagina	D7262 Sigma-Aldrich	DMSO	Donador de O ₂ ⁻	53,14 mM

Tabla 9: (continuación).

Xenobiótico	Referencia/Casa comercia	Solvente	Efecto	[] Stock
Paraquat	36541 Sigma-Aldrich	H ₂ O	Donador de O ₂ ⁻	38,89 mM
FCCP	C2920 Sigma-Aldrich	DMSO	Desacoplante mitocondrial	3,93 mM
Propranolol hidrocloreuro	P0884 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	39,80 mM
Epinefrina bitartrato	E4375 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	30 mM
NOR-1	489510 Santa Cruz Biotechnology	DMSO	Donador de NO [•]	43,3 mM
DEA NONOato	Ab145197 Abcam	H ₂ O	Donador de NO [•]	4,85 mM
SIN-1	0756 Bio-techne	DMSO	Donador de ONOO ⁻	48,4 mM
NAC	A8199 Sigma-Aldrich	H ₂ O	Antioxidante	61,27 mM
DETC	228680 Sigma-Aldrich	DMSO	Inhibidor de SOD	44,4 mM
3-AT	8056 Sigma-Aldrich	H ₂ O	Inhibidor de catalasa	118,9 mM

Las diluciones de H₂O₂, t-BOOH, CHP, paraquat, propranolol hidrocloreuro, epinefrina bitartrato, DEA NONOato, NAC y 3-AT se preparan diariamente.

3. Citómetros de Flujo

3.1. Gallios

El citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA) está equipado con 3 láseres: azul (488nm), rojo (638nm) y violeta (405mm). El sistema es capaz de detectar 10 marcadores fluorescentes diferentes simultáneamente. Los detectores

del láser azul son: FL1 ($525 \pm 40\text{nm}$), FL2 ($575 \pm 30\text{nm}$), FL3 ($620 \pm 30\text{ nm}$), FL4 ($695 \pm 30\text{ nm}$) y FL5 ($<755\text{ nm}$). Para el láser rojo son: FL6 ($660 \pm 20\text{ nm}$), FL7 (725 ± 20) y FL8 ($<755\text{ nm}$) y para el violeta: FL9 (450 ± 50) y FL10 (550 ± 40). Además, tiene una dispersión frontal personalizada para lograr la medición de tamaño más precisa. El instrumento puede analizar rangos de tamaño de partículas de $0,4\text{ }\mu\text{m}$ a $40\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro. La verificación diaria del sistema óptico y fluido se realiza con las microesferas Flow-Check Pro (Beckman Coulter A63493). Se emplea el flujo medio para los ensayos en las células Jurkat y flujo lento para el análisis bacteriano. Los parámetros y las configuraciones varían para los diversos ensayos.

3.2. Accuri C6

El análisis de RT-CMF se realiza con un citómetro de flujo Accuri C6 (Becton Dickinson Biosciences, Bélgica), calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El citómetro está equipado con un láser de 488 nm con detectores de fluorescencia verde ($533 \pm 30\text{ nm}$), fluorescencia naranja ($585 \pm 40\text{ nm}$) y fluorescencia roja ($<670\text{ nm}$), así como los parámetros morfológicos, FSC y SSC. El instrumento tiene un láser adicional de 640 nm con un detector a $675 \pm 25\text{ nm}$. Los datos se recopilan continuamente durante 10 minutos, con la velocidad de muestreo de flujo medio $35\text{ }\mu\text{L}/\text{minuto}$. Los parámetros y las configuraciones varían para diferentes experimentos y, por lo tanto, se definen en las secciones experimentales específicas a continuación.

3.3. Configuración óptica de los citómetros

En el citómetro Gallios, las señales de emisión de fluorescencia de DHDCF, DHR123, MitoPY1, CellROX Green, Oxidative Stress Green, DAF-FM, Helix NP Green, SYTO9 y DiBAC₃(4) se recogen en el canal FL1. La emisión de MitoSox Red, CellROX Orange y Superoxide Orange corresponde a FL2 y de HE y PI a FL3. La sonda CellROX Deep Red se recoge en FL6 y DAPI en FL9.

En el citómetro BD Accuri, la señal de fluorescencia de DHDCF, DHR123 y MitoPY1 se recoge en el canal de fluorescencia verde y de HE y MitoSox Red en el canal naranja. Los datos de citometría de flujo se analizaron con Kaluza Analysis Software 2.1 (Beckman Coulter).

3.4. Procedimientos generales de los análisis citométricos

Primero, para establecer el nivel de autofluorescencia para cada detector de

Material y métodos

fluorescencia correspondiente, se adquieren muestras no teñidas. Luego, se adquieren muestras teñidas individuales para optimizar los ajustes de voltaje y ganancias. También es recomendable incluir muestras no teñidas incubadas solamente con los xenobióticos que pueden generar fluorescencia como menadiona o plumbagina. Además, durante el tratamiento con los compuestos, se produce un cierto grado de mortalidad, donde las células muertas se seleccionan con los fluorocromos de viabilidad, ya que el estudio de estrés oxidativo se realiza en células vivas.

Se adquieren al menos 10.000 células totales DAPI negativas en los ensayos de estrés oxidativo en las células Jurkat y 30.000 bacterias PI negativas o Helix NP Green negativas utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios. Para los ensayos RT-FCM se utiliza el parámetro tiempo como condición de parada de adquisición de las muestras en el citómetro BD Accuri.

La compensación constituye un procedimiento determinante al utilizar tinciones policromáticas, donde la existencia de solapamiento entre los espectros de emisión de los fluorocromos empleados es más que probable. El proceso de compensación permite corregir este solapamiento.

Para el ensayo cinético se sigue la siguiente forma de compensación. Los fluorocromos individuales que emiten en el detector verde en el citómetro Accuri C6 (DHDCF, DHR123 y MitoPY1) son compensados en cuatro zonas en el detector naranja mientras que los sustratos fluorogénicos que emiten en naranja (HE y MitoSox Red) son compensados en cuatro regiones en el canal verde. Las cuatro regiones seleccionadas corresponden al basal, al minuto 3, al minuto 6 y al minuto 10. Las compensaciones tienen lugar en distintas zonas debido a que durante el análisis cinético se producen cambios en la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. La matriz de compensación obtenida en cada una de las cuatro zonas en las cinéticas de los fluorocromos individuales se aplica a las parejas de fluorocromos.

4. Métodos con células eucarióticas

4.1. Determinación de la viabilidad en células Jurkat

La tasa de viabilidad celular se determina mediante el fluorocromo DAPI. Para cada compuesto prooxidante, se ensaya un rango de dosis para poder cuantificar su citotoxicidad y poder definir un rango de concentraciones apropiado en los

experimentos de medición de estrés oxidativo. Las condiciones de incubación y las concentraciones de cada xenobiótico son:

- H₂O₂ (0-1-10-20-25-35-50 mM) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.
- T-BOOH (0-1-20-60-75-100 mM) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.
- CHP (0-1-5-7,5-9-12,5 mM) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.
- Menadiona (0-50-80-200-600-800 μM) durante 60 minutos a 37°C en oscuridad.
- Plumbagina (0-50-80-200-800 μM) durante 60 minutos a 37°C en oscuridad.

Tras la incubación, las células se centrifugan 1300 rpm 5 minutos y se resuspenden en 400 μL de medio RPMI. Una vez las muestras son resuspendidas, se procede a la adición del fluorocromo DAPI. Las muestras con el fluorocromo se incuban durante 5 minutos en oscuridad y se analizan en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

4.2. Titulación de los sustratos fluorogénicos en las células Jurkat

El número de células utilizadas para la titulación debe orientarse hacia el número de células que se tiñen en el experimento real. Para determinar la tinción adecuada de los diversos sustratos fluorogénicos en la línea celular Jurkat, se han probado un rango de concentraciones. Las células son expuestas a:

- 800 μM de H₂O₂ durante 30 minutos a 37°C para DHDCF, DHR123 y MitoPY1.
- 20 μM de menadiona durante 60 minutos a 37°C para HE y MitoSox Red.
- 1000 μM de t-BOOH durante 30 minutos a 37°C para CellROX Green, CellROX Orange y CellROX Deep Red.
- 1000 μM de H₂O₂ durante 30 minutos a 37°C para Oxidative Stress Green.
- 50 μM de menadiona durante 60 minutos a 37°C para Superoxide Orange.

A continuación, las suspensiones celulares son centrifugadas y tras la centrifugación son resuspendidas en medio RPMI. Se incuban durante 30 minutos en oscuridad a 37°C con varias concentraciones de cada uno de los fluorocromos o sondas:

Material y métodos

- DHDCF (0-0,51-1,28-2,57-5,13-10,26 μM).
- DHR123 (0-0,5-1-2,5-5-10 μM).
- MitoPY1 (0-0,5-1-2,5-5 μM).
- HE (0-0,25-0,5-1-2,5-5-7,5 μM).
- MitoSox Red (0-0,1-0,25-0,5-1 μM).
- CellROX Green (0-1,25-2,5-5 μM).
- CellROX Orange (0-1,25-2,5-5 μM).
- CellROX Deep Red (0-1,25-2,5-5 μM).
- Oxidative Stress Green (0-0,5-1-2 μM).
- Superoxide Orange (0-0,5-1-2 μM).

Después de la incubación, se añade el fluorocromo de viabilidad DAPI y tras incubación de 5 minutos, las muestras se analizan en el citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios.

Las características más relevantes de los sustratos fluorogénicos empleados en los estudios de estrés oxidativo y nitrosativo con células Jurkat se muestran resumidas en Tabla 10.

Tabla 10: Características de los fluorocromos empleados en las células Jurkat. Abreviaturas: dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF).

Fluorocromo	Referencia/Casa comercial	Solvente	[] Stock	[] Final	Tiempo de incubación
DHDCF	D6883 Sigma-Aldrich	DMSO	2,05 mM	5,13 μM	30 minutos
DHR123	D632 Invitrogen	DMSO	2,88 mM	1 μM	30 minutos
MitoPY1	SML0734 Sigma-Aldrich	DMSO	1,05 mM	2,5 μM	30 minutos
HE	D7008 Sigma-Aldrich	DMSO	3,17 mM	1 μM	30 minutos

Tabla 10: (continuación).

Fluorocromo	Referencia/Casa comercial	Solvente	[] Stock	[] Final	Tiempo de incubación
MitoSox Red	M36008 Invitrogen	DMSO	0,5 mM	0,5 μ M	30 minutos
CellROX Green	C10444 Invitrogen	DMSO	2,5 mM	1,25 μ M	30 minutos
CellROX Orange	C10493 Invitrogen	DMSO	2,5 mM	2,5 μ M	30 minutos
CellROX Deep Red	C10422 Invitrogen	DMSO	2,5 mM	2,5 μ M	30 minutos
Oxidative Stress Green	Enzo Life Sciences	DMF	5 mM	0,5 μ M	30 minutos
Superoxide Orange	Enzo Life Sciences	DMF	5 mM	1 μ M	30 minutos
DAF-FM	D23844 Invitrogen	DMSO	2 mM	2 μ M	30 minutos
DAPI	BML-AP402-0010 Enzo Life Sciences	H ₂ O	2,86 mM	7,15 μ M	5 minutos
PI	P4170 Sigma-Aldrich	H ₂ O	1,50 mM	3,75 μ M	5 minutos

4.3. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con peróxidos exógenos

Para la generación de peróxidos exógenos las células se tratan durante 30 minutos a 37°C con las dosis de:

- H₂O₂ (0-100-200-400-800-1000 μ M).
- T-BOOH (0-100-200-400-800-1000 μ M).
- CHP (0-10-20-40-80-100 μ M).

Posteriormente, las células se centrifugan a 1300 rpm 5 minutos y se resuspenden

Material y métodos

en 400 μL de medio RPMI. Las muestras se incuban con los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Tras la incubación se añade el fluorocromo DAPI y se incuban las células durante 5 minutos en oscuridad. A continuación, se analizan en el citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios.

Para los fluorocromos HE y MitoSox Red, las dosis de los compuestos empleados son: H_2O_2 (0-200-1000 μM), t-BOOH (0-200-1000 μM) y CHP (0-20-100 μM). Para completar el estudio de estrés oxidativo generado por compuestos que inducen la formación de peróxidos se utilizan las siguientes dosis: H_2O_2 (0-1000 μM), t-BOOH (0-1000 μM) con las sondas CellROX Green, CellROX Orange y CellROX Deep Red. Además, se emplean los reactivos Oxidative Stress Green y Superoxide Orange con las concentraciones de H_2O_2 (0-1000 μM) y t-BOOH (0-1000 μM). Se emplea el mismo procedimiento descrito.

4.4. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con generadores de superóxido

Para la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ intracelular las células exponen durante 60 minutos a 37°C con las concentraciones de:

- Menadiona (0-10-20-30-50 μM).
- Plumbagina (0-10-20-30-50 μM).

Tras el tratamiento con los compuestos dadores de $\text{O}_2^{\cdot-}$, las células se centrifugan a 1300 rpm 5 minutos y se resuspenden en 400 μL de medio RPMI. Las muestras se incuban con los fluorocromos HE y MitoSox Red durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación, se añade el fluorocromo DAPI y se incuban las células durante 5 minutos en oscuridad y su posterior análisis en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

Para los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1 y Superoxide Orange las concentraciones de los compuestos empleados son: menadiona (0-20-50 μM) y plumbagina (0-20-50 μM). También se utilizan las sondas CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange para las células incubadas con menadiona (0-50 μM). El procedimiento de incubación es el mismo descrito.

4.5. Determinación de estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con generadores de óxido nítrico

Se emplean diferentes dadores de NO. El compuesto SIN-1 participa en la formación continua de ONOO⁻, mientras que DEA NONOato libera NO. Las células son expuestas durante 30 minutos a diferentes concentraciones (0-100-200-400 μM) o 15 minutos con NONOato (0-250 μM). Posteriormente, las células son centrifugadas a 1300 rpm 5 minutos y resuspendidas en 400 μL de medio RPMI. Se procede a la incubación con los correspondientes fluorocromos. Para SIN-1 los sustratos fluorogénicos utilizados son DHR123, DAF-FM, DHDCF, HE y Oxidative Stress Green y para el compuesto DEA NONOato son DHR123, DAF-FM, DHDCF, MitoPY1 y Oxidative Stress Green durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Se añade el fluorocromo DAPI y se procede al análisis citométrico.

4.6. Determinación de estrés oxidativo en células Jurkat tratadas con antioxidantes e inhibidores enzimáticos

Las células Jurkat son pretratadas con 5 mM de NAC durante 60 minutos y luego son expuestas con diferentes compuestos prooxidantes: 1000 μM de H_2O_2 o 1000 μM de CHP durante 30 minutos o 50 μM de menadiona durante 60 minutos. Posteriormente, las células son centrifugadas a 1300 rpm 5 minutos y resuspendidas en 400 μL de medio RPMI. Para las células tratadas con H_2O_2 se emplea el fluorocromo MitoPY1, con CHP se utiliza DHR123 y con menadiona MitoSox Red. Tras la incubación se añade el fluorocromo DAPI y las células son analizadas en el citómetro Beckman Coulter Gallios.

Para los ensayos con los inhibidores de SOD y de catalasa se emplea el siguiente procedimiento. Las células son tratadas con las concentraciones de DETC (0-50-100-200 μM) durante 60 minutos o 3-AT (0-5-10-25 mM) durante 120 minutos. A continuación, se añade 50 μM de menadiona durante 60 minutos en las células tratadas con DETC y 1000 μM de H_2O_2 durante 30 minutos en células expuestas con 3-AT. Posteriormente, las muestras son centrifugadas y resuspendidas en medio RPMI. La incubación se realiza con el fluorocromo MitoSox Red para las células tratadas con DETC y MitoPY1 para las suspensiones celulares con 3-AT durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Se añade el fluorocromo DAPI previamente al análisis en el citómetro de flujo.

4.7. Determinación de estrés oxidativo y nitrosativo en tiempo real en células N13

Para los ensayos cinéticos las células N13 son previamente incubadas con el fluorocromo correspondiente durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Se adquirió la muestra en el citómetro BD Accuri durante 1 minuto para registrar la intensidad de fluorescencia basal, tras el cual se añaden los inductores. Se continúa la cinética hasta llegar a los 10 minutos. Este proceso es equivalente para todos los fluorocromos.

Las características más importantes de los sustratos fluorogénicos utilizados en los estudios de estrés oxidativo y nitrosativo con las células N13 se muestran resumidas en la Tabla 11.

Tabla 11: Características de los fluorocromos empleados en los ensayos citómicos las células N13.

Fluorocromo	Referencia/Casa comercial	Solvente	[] Stock	[] Final	Tiempo de incubación
DHDCF	D6883 Sigma-Aldrich	DMSO	2,05 mM	0,51 µM	30 minutos
DHR123	D632 Invitrogen	DMSO	2,88 mM	1,15 nM	30 minutos
MitoPY1	SML0734 Sigma-Aldrich	DMSO	1,05 mM	2,5 µM	30 minutos
HE	D7008 Sigma-Aldrich	DMSO	3,17 mM	0,32 µM	30 minutos
MitoSox Red	M36008 Invitrogen	DMSO	0,5 mM	0,125 µM	30 minutos

Las características más significativas de los compuestos inductores de estrés oxidativo y nitrosativo con células N13 se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Características de los xenobióticos empleados en los ensayos citómicos las células N13.

Xenobióticos	Referencia/Casa comercial	Solvente	Efecto	[] Stock	[] Final
H ₂ O ₂	H1009 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	9,8 M	44 mM
CHP	247502 Sigma-Aldrich	DMSO, medio de cultivo	Estrés oxidativo	5,41 M	26,3 mM
Plumbagina	D7262 Sigma-Aldrich	DMSO	Donador de O ₂ ⁻	58,08 mM	0,19 mM
Propranolol hidrocloreuro	P0884 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	99,80 mM	5 mM
Epinefrina bitartrato	E4250 Sigma-Aldrich	Medio de cultivo	Estrés oxidativo	30 mM	19 mM
FCCP	C2920 Sigma-Aldrich	DMSO	Desacoplante mitocondrial	3,93 mM	50 μM
NOR-1	489510 Santa Cruz Biotechnology	DMSO	Donador de NO [•]	43,3 mM	250 μM

4.8. Determinación de las interacciones entre sustratos fluorogénicos en las líneas celulares Jurkat y N13

Los ensayos entre interacciones de los sustratos fluorogénicos a tiempo final se llevan a cabo en la línea celular Jurkat. Las células son expuestas a la concentración máxima probada de los compuestos prooxidantes: 1000 μM de H₂O₂, t-BOOH o CHP durante 30 minutos o 50 μM de menadiona o plumbagina durante 60 minutos. Tras la centrifugación a 1300 rpm 5 minutos, las células resuspendidas en 400 μl de medio RMPI, se incuban con los fluorocromos compatibles espectralmente durante 30 minutos a 37°C en oscuridad:

- Sustrato de localización citosólica DHDCF con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial DHR123 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial MitoPY1 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización citosólica HE con DHDCF, DHR123 y MitoPY1.

Material y métodos

- Sustrato de localización mitocondrial MitoSox Red con DHDCF, DHR123 y MitoPY1.

Posteriormente se añade a las muestras el fluorocromo DAPI y se analizan por el citómetro Beckman Coulter Gallios.

Para los RT-CMF la línea celular empleada es N13. Las células son incubadas con los fluorocromos correspondientes durante 30 minutos a 37°C en oscuridad:

- Sustrato de localización citosólica DHDCF con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial DHR123 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial MitoPY1 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización citosólica HE con DHDCF y DHR123.
- Sustrato de localización mitocondrial MitoSox Red con DHDCF y DHR123.

Se adquiere el tiempo basal durante 1 minuto en el citómetro BD Accuri, se detiene la cinética y se adicionan el inductor correspondiente. Las concentraciones se muestran en la Tabla 11. Se continúa la cinética hasta llegar a los 10 minutos.

5. Métodos con *E. coli*

5.1. Determinación en disco de la inhibición de crecimiento en placa

Se mezclan 100 μ L de un cultivo estacionario con 3 mL de soft agar y se siembran las diferentes cepas bacterianas en placas con medio LA. Se depositan los discos de papel estériles de 6mm en la superficie de las placas impregnados con 300 μ g/disco de cada compuesto: H₂O₂, t-BOOH, CHP y menadiona. La inhibición del crecimiento alrededor del filtro (halo) se mide tras la incubación de las placas durante 24 horas a 37°C.

5.2. Determinación del crecimiento exponencial en las cepas bacterianas

Los cultivos estacionarios se diluyen 1/10 en medio LB y se cultivan hasta que se alcance la fase de crecimiento exponencial según lo determinado por las mediciones de OD₆₀₀. Los cultivos bacterianos se cultivan a 37°C. Las lecturas de DO₆₀₀ se realizan cada 30 minutos en el espectrofotómetro Synergy HTX (BioTek).

5.3. Determinación de la viabilidad bacteriana

Los cultivos bacterianos en estado exponencial se diluyen 1/10 con el medio de cultivo LB y se tratan durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de H₂O₂ (0-50-100-250-400-800-1000-1200 mM), de t-BOOH (0-5-10-25-50-100-200 mM) y CHP (0-0,5-1-2,5-5-10 mM). Para las concentraciones de menadiona (0-0,06-0,58-2,35 mM) la incubación es de 120 minutos.

Los cultivos tratados con los prooxidantes mencionados anteriormente se centrifugan durante 10 minutos a 3000 rpm. y se resuspenden en 500 µL de LB. Una vez las muestras son resuspendidas, se procede a la adición del fluorocromo PI. La muestra con el fluorocromo se incuba durante 5 minutos en oscuridad y se procede al análisis citométrico.

5.4. Determinación del crecimiento bacteriano en cepas tratadas con xenobióticos

Los cultivos bacterianos en estado exponencial se diluyen 1/10 con el medio de cultivo LB y se tratan durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de t-BOOH (0-10-25-50-100-200 mM) o de menadiona (0-0,06-0,29-0,58-1,16 mM) durante 120 minutos. Las lecturas de DO₆₀₀ se realizan cada 30 minutos en el espectrofotómetro Synergy HTX (BioTek).

5.5. Determinación del contaje bacteriano en cepas tratadas xenobióticos

El ensayo spotting se usa para evaluar el efecto de los compuestos en la formación de colonias bacterianas. Los cultivos bacterianos en estado exponencial se diluyen 1/10 con el medio de cultivo LB y se tratan durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de t-BOOH (0-10-25-50-100-200 mM) o de menadiona (0-0,03-0,06-0,29-0,58 mM) o paraquat (0-0,19-0,39-0,78-1,56 mM) durante 120 minutos. Para la cepa IC203 se emplean las dosis adicionales de 0,01 mM de menadiona y 0,04 mM de paraquat. Tras la incubación, los cultivos bacterianos se centrifugan 3000 rpm 10 minutos y se resuspenden en medio LB. Posteriormente, se realizan diluciones seriadas con LB y se pone una gota de 10 µL en placas LB. Las placas se incuban durante 24 horas a 37°C. Se realiza el contaje de colonias y se calcula el número de unidades formadoras de colonias UFC/mL.

5.6. Determinación de la viabilidad con SYTO9 y DiBAC₄(3)

Los cultivos bacterianos en estado exponencial se diluyen 1/10 con el medio de cultivo LB y se tratan durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de t-BOOH (0-10-25-50-100-200 mM) o de menadiona (0-0,06-0,29-0,58-2,35 mM) durante 120 minutos. Tras la incubación, los cultivos bacterianos se centrifugan 3000 rpm 10 minutos y se resuspenden en medio LB. Los fluorocromos empleados son SYTO9 y PI y, por otro lado, DiBAC₄(3) se combina con PI. La incubación son 15 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir PI, los cultivos bacterianos son analizados en el citómetro Beckman Coulter Gallios.

5.7. Titulación de los sustratos fluorogénicos en bacterias

Para definir una concentración óptima de los diferentes fluorocromos en las bacterias, las células son expuestas a 10 mM de t-BOOH durante 60 minutos para los fluorocromos DHDCF y MitoPY1. Para la titulación de HE se emplea la concentración 0,29 mM de menadiona durante 120 minutos. Luego las bacterias son centrifugadas 3000 rpm 10 minutos y tras la centrifugación son resuspendidas en medio LB. Se incuban durante 30 minutos a oscuridad a 37°C con varias concentraciones de cada uno de los fluorocromos:

- DHDCF (0-2,05-4,10-10,26-20,52-41,04-82,08-164,16 µM).
- MitoPY1 (0-1-2,5-5-10 µM).
- HE (0-3,17-6,34-12,68-15,88-23,81 µM).

Luego, se añade PI a los cultivos bacterianos incubados con DHDCF o MitoPY1 y Helix NP Green para HE. Se analizan las muestras en el citómetro Beckman Coulter Gallios.

Las características más importantes de los fluorocromos utilizados en los ensayos de estrés oxidativo con *E. coli* se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Características y concentraciones de los fluorocromos empleados en los cultivos bacterianos.

Fluorocromo	Referencia/Casa comercial	Solvente	[] Stock	[] Final	Tiempo de incubación
DHDCF	D6883 Sigma-Aldrich	DMSO	20,5 mM	41,04 μ M	30 minutos
MitoPY1	SML0734 Sigma-Aldrich	DMSO	1,05 mM	5 μ M	30 minutos
HE	D7008 Sigma-Aldrich	DMSO	3,17 mM	15,88 μ M	30 minutos
PI	P4170 Sigma-Aldrich	H ₂ O	1,50 mM	7,5 μ M	5 minutos
Helix NP Green	425303 BioLegend	DMSO	5 mM	0,50 μ M	5 minutos
SYTO9	S34854 Invitrogen	DMSO	5 mM	1,75 μ M	15 minutos
DiBAC ₄ (3)	B438 Invitrogen	DMSO	0,97 mM	1,2 μ M	15 minutos

5.8. Determinación de estrés oxidativo en cepas bacterianas tratadas con xenobióticos

Los cultivos bacterianos en dilución 1/10 con el medio de cultivo LB se tratan durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de H₂O₂ (0-10-25-50-100 mM), de t-BOOH (0-2,5-5-10-15-25 mM) o de CHP (0-0,5-1 mM). Para las concentraciones de menadiona (0-0,06-0,29-0,58-1,16 mM) o paraquat (0-1,56-3,12 mM) la incubación son 120 minutos. Se centrifugan durante 10 minutos a 3000 rpm y se resuspenden en 500 μ L de medio LB. Una vez las muestras resuspendidas, se procede a la adición de los fluorocromos. Las muestras con el fluorocromo se incuban durante 30 minutos a 37°C y se procede al análisis citométrico en el citómetro Beckman Coulter Gallios.

6. Análisis estadístico

Se expresa la media de las intensidades de fluorescencia (IMF) como unidades relativas de fluorescencia (URF). Para obtener los valores de ratio, cada intensidad de fluorescencia de las concentraciones es dividida por la intensidad de fluorescencia de la condición basal. Los datos se muestran como medias de los cocientes de fluorescencia \pm SD de tres observaciones.

Con la finalidad de elegir el test estadístico adecuado para la realización del contraste de hipótesis, previamente se ha comprobado si había normalidad en los grupos. La normalidad se ha estudiado mediante el test de Shapiro-Wilk por el tamaño muestral. En los casos en los que se cumplía el supuesto de normalidad, se ha contrastado si había homocedasticidad o igualdad de varianzas mediante el test de Levene. Con igualdad de varianzas, se ha aplicado el test t-Student para dos muestras independientes en las comparaciones. Para las comparaciones entre más de dos grupos, se ha realizado el test del análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con las comparaciones múltiples Dunnett's. Dicho test se ha aplicado para estudiar las diferencias de las concentraciones de cada fluorocromo con respecto a su correspondiente basal, tanto en los procedimientos a tiempo final como en cinética. Además se ha empleado el test ANOVA con las comparaciones múltiples Tukey. Se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$. También, se han calculado las IC_{50} a través del ajuste de la curva y el coeficiente de correlación (R^2).

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con los softwares GraphPad Prism versión 9.0 para Windows (La Jolla, California, Estados Unidos) y los gráficos del citómetro de flujo se generan con el software de análisis Kaluza v2.1 (Beckman Coulter).



Resultados

1. Ensayos por CMF de viabilidad en células Jurkat para cuantificar la citotoxicidad y establecer las dosis de xenobióticos prooxidantes

Los ensayos citómicos para el estudio de estrés oxidativo se basan en el uso de sustratos fluorogénicos que al penetrar en la célula se oxidan y generan una fluorescencia característica (O'Connor et al., 2017). El diseño experimental de esta Tesis implica el tratamiento in vitro de las células con diferentes xenobióticos prooxidantes, que presentan cierto grado de citotoxicidad, que debe ser cuantificada para una correcta interpretación de los resultados.

Por otra parte, es importante tener en cuenta las características únicas de los ensayos funcionales por CMF, cuyos datos generados son obtenidos en células vivas individuales que requieren identificarlas y cuantificarlas para su correcta selección y análisis. Para ello se ha realizado ensayos de viabilidad con el fluorocromo DAPI, para excluir las células muertas presentes en el ensayo.

De acuerdo con las recomendaciones de los ensayos clásicos de citotoxicidad, en la primera serie de experimentos por CMF se ha estudiado un rango amplio de concentraciones de diversos xenobióticos para determinar la citotoxicidad de cada uno de ellos y asegurar la presencia de un porcentaje adecuado de células vivas en la muestra. La citotoxicidad se ha establecido mediante la IC_{50} , definida como la concentración de xenobiótico que genera el 50% de muerte celular. La estrategia de análisis se muestra en la Figura 23.

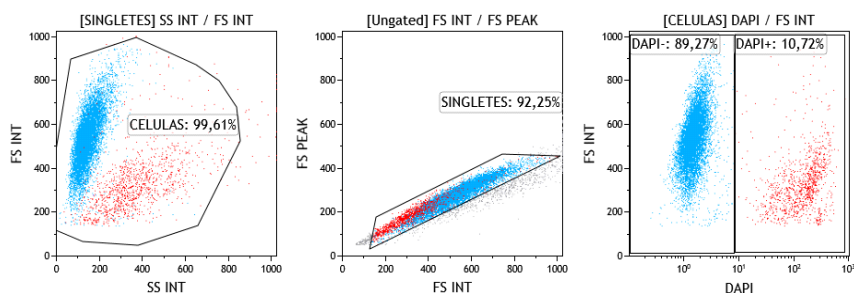


Figura 23: Estrategia de análisis de los ensayos citómicos.

1.1. Cuantificación de la citotoxicidad de peróxidos exógenos

En una primera serie de experimentos se ha evaluado la citotoxicidad de tres xenobióticos que incrementan los niveles intracelulares de peróxidos bien de modo directo, como el H_2O_2 exógeno, o a través de procesos peroxidativos intracelulares, como en el caso de los peróxidos de t-BOOH o de CHP.

El H_2O_2 es uno de las principales ROS en las células. Para evaluar el potencial citotóxico del H_2O_2 exógeno sobre células Jurkat se ha realizado un ensayo citométrico de viabilidad con la sonda DAPI. Los resultados obtenidos muestran que el efecto tóxico del H_2O_2 es dependiente de la dosis, con un valor de IC_{50} de 28,18 mM (Figura 24).

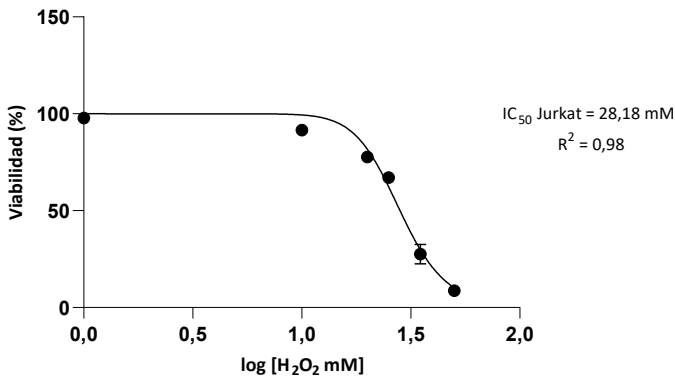


Figura 24: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de H_2O_2 sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

El t-BOOH es un potente inductor intracelular de ROS, implicado en la peroxidación de lípidos. La evaluación del efecto de t-BOOH sobre la viabilidad en la línea Jurkat muestra un efecto citotóxico con una IC_{50} de 86,30 mM (Figura 25).

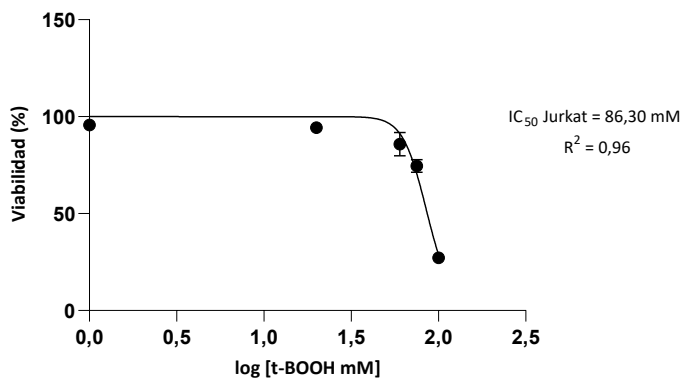


Figura 25: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de t-BOOH sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

El CHP es un oxidante orgánico que también induce peroxidación lipídica. Al examinar el efecto de CHP sobre la viabilidad celular los resultados muestran un valor de 10,54 mM para la IC_{50} de este xenobiótico (Figura 26).

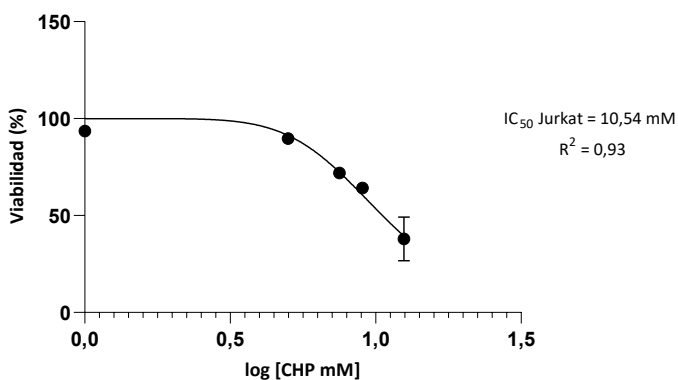


Figura 26: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de CHP sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran el valor de IC_{50} y R^2 obtenidos. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

1.2. Cuantificación de la citotoxicidad de generadores de superóxido

Al igual que para los xenobióticos inductores de actividad peroxidativa, se ha evaluado la citotoxicidad de dos xenobióticos, menadiona y plumbagina, que incrementan los niveles intracelulares de $O_2^{\cdot-}$ a través de procesos cíclicos de oxidación-reducción asociados a su metabolismo intracelular. Como muestra la Figura 27A, la menadiona exhibe una citotoxicidad muy leve y no se ha podido determinar su IC_{50} , tras estudiar un rango de concentraciones de hasta 800 μM . La plumbagina, al igual que la menadiona, también exhibe una baja citotoxicidad y tampoco se ha podido establecer su IC_{50} después de analizar dosis de hasta 800 μM (Figura 27B).

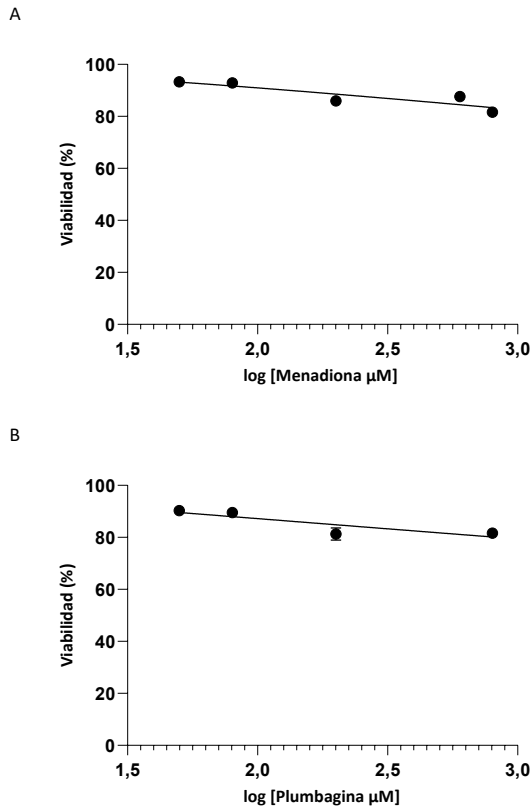


Figura 27: Ensayo de DAPI para determinar la IC_{50} en las células Jurkat y analizar el efecto de (A) menadiona y (B) plumbagina sobre la viabilidad. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

2. Optimización de ensayos citométricos de tiempo final para evaluar la generación de ROS en suspensiones celulares tratadas con prooxidantes exógenos

2.1. Titulación de sustratos fluorogénicos para la determinación de ROS en suspensiones celulares

En todo estudio citómico basado en fluorescencia es necesario validar y optimizar los sustratos fluorogénicos o fluorocromos empleados para cuantificar el fenómeno biológico de interés. En el caso concreto de estudios citómicos funcionales, una concentración inadecuada de tales reactivos puede dar como resultado un exceso de la tinción inespecífica (ruido de fondo biológico) y una disminución de la sensibilidad y la linealidad de la cuantificación de la función analizada. Por otra parte, las células vivas pueden tener una tinción óptima diferente a las células muertas, por lo que la viabilidad también es un factor para tener en cuenta en la optimización de la concentración de reactivo.

La titulación es un procedimiento básico en CMF, dirigido a determinar la concentración óptima de un reactivo. Mientras que en los ensayos inmunofenotípicos la titulación se dirige a definir la concentración de anticuerpo conjugado que permite discriminar mejor entre una célula positiva y una célula negativa para un determinado marcador (Cossarizza et al., 2019) en los ensayos funcionales la titulación debe permitir optimizar el cociente entre la señal biológica (intensidad de fluorescencia asociada a la función en estudio) y el ruido de fondo biológico (intensidad de la autofluorescencia). En el caso de un ensayo dirigido a cuantificar el efecto de un estímulo o tratamiento, es más adecuado realizar una titulación basada en el cociente de la intensidad de fluorescencia entre las células tratadas con un estímulo conocido (control positivo) y las células no tratadas o (control) o que no expresan la función de interés (control negativo).

De acuerdo con este criterio, se han titulado cada uno de los sustratos fluorogénicos a utilizar en los ensayos a punto final de estrés oxidativo, teniendo en cuenta su reactividad descrita frente a diferentes ROS para elegir el xenobiótico prooxidante más adecuado a cada sustrato. Así, para titular los sustratos fluorogénicos DHDCE, DHR123 y MitoPY1 se ha utilizado H_2O_2 para inducir la respuesta de estrés oxidativo. Por otra parte, se ha empleado menadiona como prooxidante para determinar la concentración óptima de los sustratos HE y MitoSox Red.

Resultados

La Figura 28 muestra gráficamente el resultado de la titulación de los sustratos anteriormente indicados, mediante la representación del cociente de fluorescencia entre suspensiones de células Jurkat teñidas con diferentes concentraciones de los fluorocromos y tratadas o no con el correspondiente xenobiótico inductor de estrés oxidativo. Las concentraciones de los prooxidantes son 800 μM para H_2O_2 y 20 μM para menadiona, que se encuentran en el intervalo de baja citotoxicidad para las células Jurkat.

Para el sustrato DHDCF, el cociente de fluorescencia en las células no teñidas es de $1,39 \pm 0,23$. Concentraciones de DHDCF entre 0,513 μM y 5,13 μM generan un aumento del cociente de fluorescencia, que disminuye a la concentración de 10,26 μM . Por tanto, se ha determinado 5,13 μM como la concentración óptima de DHDCF con un cociente de fluorescencia de $2,13 \pm 0,04$ (Figura 28A).

Siguiendo el mismo procedimiento se han titulado los sustratos DHR123 (Figura 28B) y MitoPY1 (Figura 28C), con cocientes de fluorescencias de $1,16 \pm 0,12$ y $1,28 \pm 0,08$ respectivamente en suspensiones celulares no teñidas. La concentración óptima determinada para DHR123 es 1 μM . El sustrato MitoPY1 presenta el cociente mayor a la concentración de 5 μM , pero, debido a la mayor dispersión de los resultados, la concentración seleccionada para los siguientes experimentos con MitoPY1 ha sido de 2,5 μM , con un cociente de $4,58 \pm 0,47$.

En cuanto a la titulación de las sondas HE (Figura 28D) y MitoSox Red (Figura 28E) con menadiona como inductor se han calculado cocientes de fluorescencia de $2,00 \pm 0,10$ y $2,58 \pm 0,05$, respectivamente, para células tratadas y no teñidas. La concentración óptima de HE resulta ser de 1 μM , con un cociente de $2,60 \pm 0,21$, ya que concentraciones sucesivas del sustrato reflejan una disminución del cociente. Para MitoSox Red, los resultados muestran un incremento dosis-dependiente del cociente de fluorescencia para las concentraciones estudiadas, habiendo definido como óptima la concentración de 0,5 μM , correspondiente a un cociente de $5,56 \pm 0,29$.

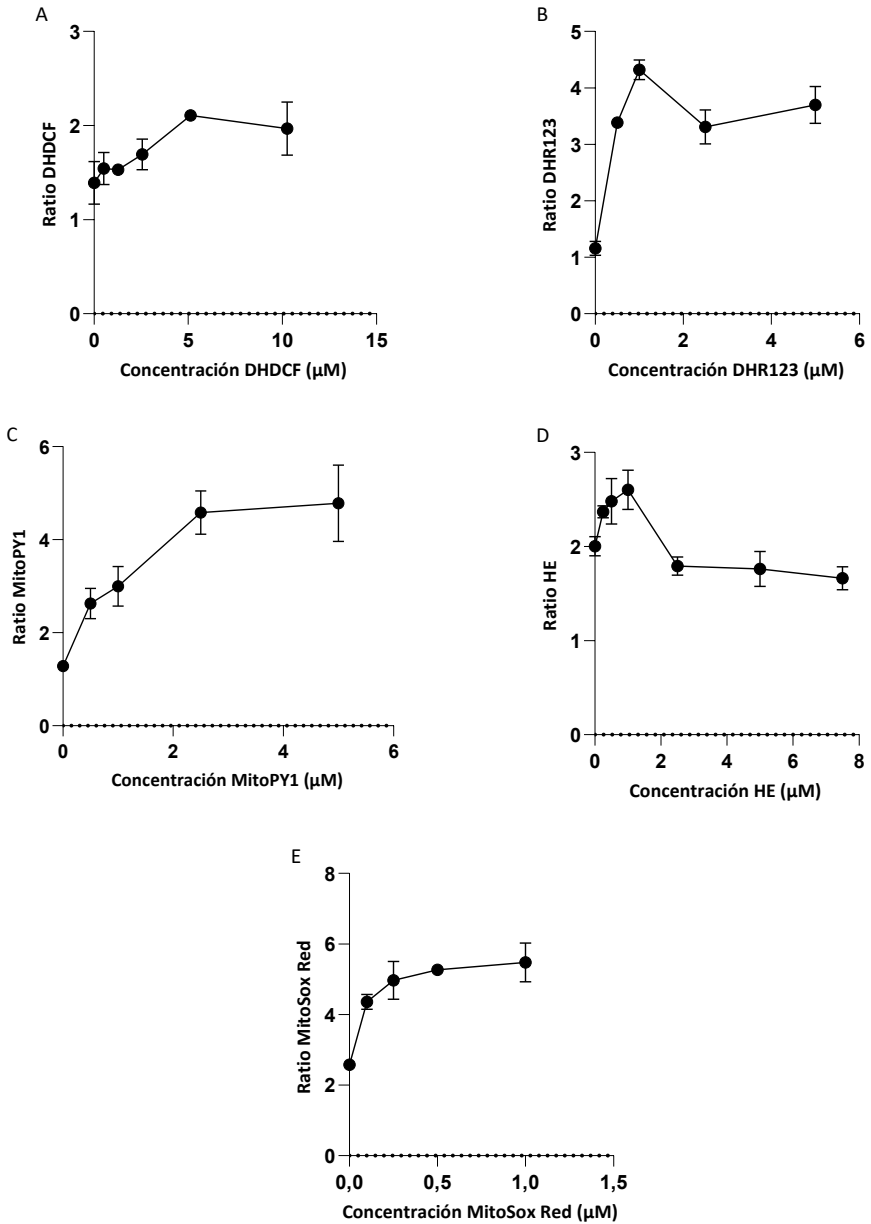


Figura 28: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red. Los resultados son la media \pm SD ($n=3$).

Resultados

En una serie de experimentos independientes de los anteriores se ha procedido a titular los sustratos fluorogénicos CellROX Green, CellROX Orange y CellROX Deep Red, así como también dos sondas de la casa comercial de Enzo Life Sciences, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange por nuestro interés en utilizarlos de forma puntual y complementaria en posteriores estudios de estrés oxidativo. Esta familia de reactivos es un conjunto de sondas fluorogénicas, de estructura química desconocida para nosotros y de selectividad para ROS no definida, pero que se emplean con frecuencia para medir el estrés oxidativo en células vivas.

En experimentos similares a los anteriormente descritos, hemos procedido a la titulación de los reactivos CellROX Green, CellROX Orange y CellROX Deep Red utilizando t-BOOH a la concentración de 1000 μM con cocientes de fluorescencias de $1,05 \pm 0,08$, $1,04 \pm 0,08$ y $0,91 \pm 0,14$ respectivamente en suspensiones celulares no teñidas. La concentración seleccionada para CellROX Green (Figura 29A) ha sido 1,25 μM con cociente de $2,44 \pm 0,15$ y para CellROX Orange (Figura 29B) 2,5 μM con cociente de $4,58 \pm 0,63$. Para CellROX Deep Red (Figura 30) es 2,5 μM con cociente de $3,30 \pm 0,23$.

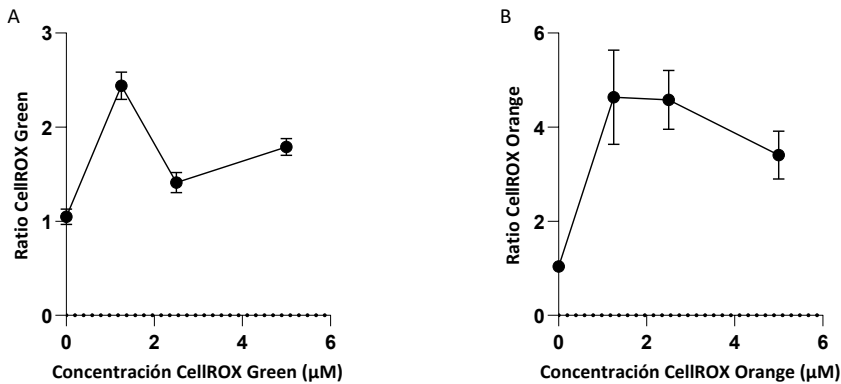


Figura 29: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) CellROX Green y (B) CellROX Orange. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

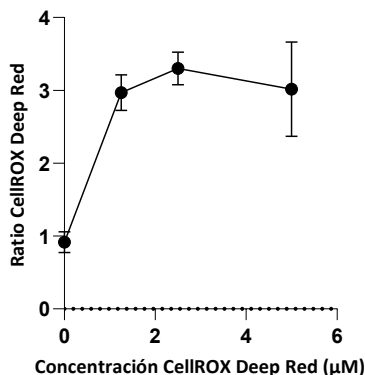


Figura 30: Ratio de las intensidades de fluorescencias del fluorocromo CellROX Deep Red. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Para la titulación de Oxidative Stress Green y Superoxide Orange se han empleado H_2O_2 a 1000 μM y menadiona a 50 μM respectivamente. El cociente de las intensidades de fluorescencia de las células sin teñir es $1,02 \pm 0,03$ para la sonda Oxidative Stress Green y $3,58 \pm 0,07$ para Superoxide Orange. Atendiendo a los resultados se ha seleccionado para la sonda Oxidative Stress Green la concentración óptima de 0,5 μM con un cociente de $1,85 \pm 0,02$ y para Superoxide Orange la concentración de 1 μM con unos valores de cociente de $4,46 \pm 0,04$.

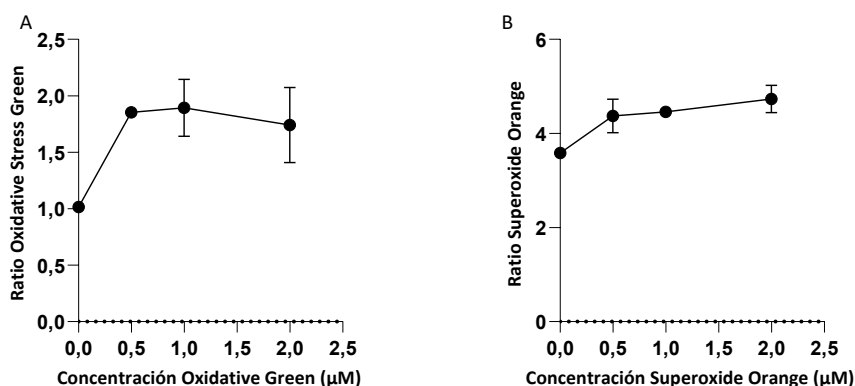


Figura 31: Ratio de las intensidades de fluorescencias de los fluorocromos (A) Oxidative Stress Green y (B) Superoxide Orange. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

2.2. Ensayos citométricos de generación de ROS en cultivos celulares tratados con peróxidos exógenos

Una vez determinada la concentración óptima de cada sustrato fluorogénico, se han realizado diferentes ensayos por CMF a tiempo final para evaluar la capacidad de dichas sondas para cuantificar el estrés oxidativo intracelular inducido por la incubación de células Jurkat con xenobióticos inductores de la generación intracelular de peróxidos. Es importante recordar que dichos ensayos de estrés oxidativo deben restringirse a poblaciones de células vivas, por lo que siempre se ha incluido el fluorocromo vital DAPI para excluir las células muertas y referir los datos a las células vivas en cada condición (Figura 23).

2.2.1. Efecto del H₂O₂ exógeno sobre los niveles intracelulares de ROS

Para los ensayos de estrés oxidativo con H₂O₂ se han tratado durante 30 minutos las células Jurkat con dosis de 0, 100, 200, 400, 800 y 1000 μM, concentraciones muy inferiores a la IC₅₀ de dicho xenobiótico. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia, como se ha descrito para la titulación de los diferentes sustratos fluorogénicos.

– Estudio con los sustratos fluorogénicos DHDCF, DHR123 y MitoPY1

Tras la incubación con H₂O₂ exógeno se aprecia un aumento estadísticamente significativo del cociente de fluorescencia para las tres sondas empleadas, aunque con una intensidad y dosis-dependencia diferentes (Figura 32). Así, mientras que tanto DHDCF como MitoPY1 muestran un aumento dosis-dependiente del cociente a todas las concentraciones de H₂O₂ analizadas, la sonda DHR123 alcanza el valor máximo de cociente de fluorescencia ($3,43 \pm 0,09$) a la primera dosis probada de 100 μM, sin que el cociente aumente a medida que se incrementa las concentraciones de H₂O₂. En cuanto a la intensidad del cociente de fluorescencia, el fluorocromo que parece más sensible para detectar el estrés oxidativo intracelular generado por H₂O₂ es MitoPY1, con un cociente máximo de $6,33 \pm 0,47$. DHDCF y DHR123 alcanzan cocientes máximos ligeramente superiores a 3.

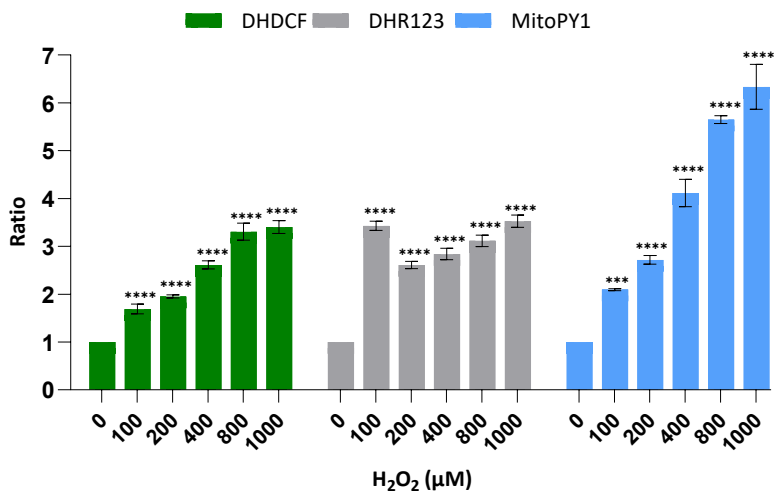


Figura 32: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos HE y MitoSox Red

En esta serie de experimentos se han incubado las células Jurkat con las concentraciones de 0, 200 y 1000 μM de H₂O₂. Se aprecia un aumento estadísticamente significativo del cociente de fluorescencia para ambas sondas (Figura 33), con valores máximos respectivamente de $1,65 \pm 0,04$ y de $1,87 \pm 0,09$. El aumento del cociente fue dependiente de la dosis de H₂O₂ para MitoSox Red, pero no para HE. En ambos casos, la intensidad del cociente fue menor que la observada para los sustratos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 (Figura 32).

Resultados

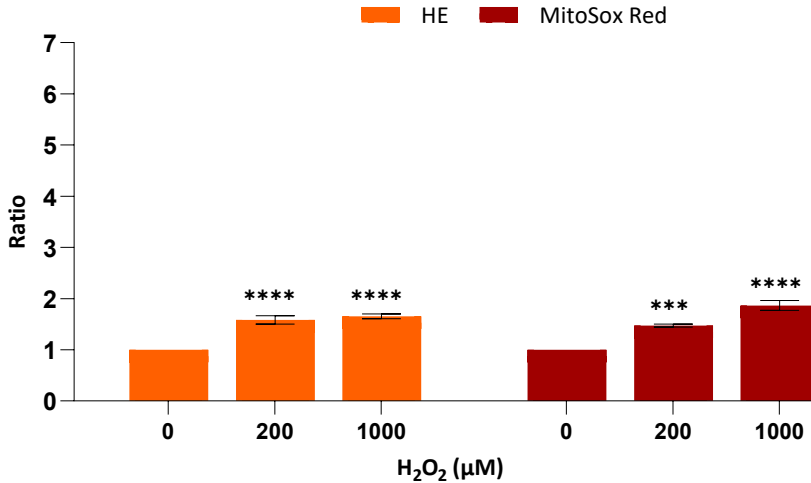


Figura 33: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos CellROX y Enzo:

Se han incubado las células Jurkat con las concentraciones de 0 y 1000 µM de H₂O₂. Como se puede ver en la Figura 34, la incubación con H₂O₂ no provocó ninguna variación en el cociente de fluorescencia de CellRox Green, mientras que en las células teñidas con CellRox Orange y CellRox Deep Red se aprecia un aumento del cociente de fluorescencia a la dosis probada de H₂O₂ con un cociente ligeramente mayor para CellRox Deep Red (2,00 ± 0,21). Con la sonda Oxidative Stress Green se observa diferencias significativas en el cociente de fluorescencia con valores de (1,85 ± 0,02) mientras que con Superoxide Orange aunque también hay diferencias significativas el cociente es menor (1,37 ± 0,11). Estos valores de cociente son similares en intensidad a los observados con las sondas HE y MitoSox Red (Figura 33).

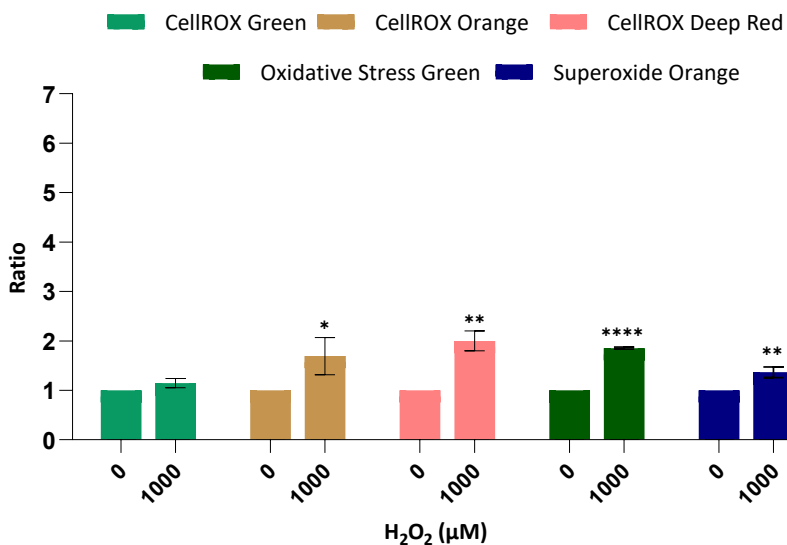


Figura 34: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

2.2.2. Efecto de t-BOOH sobre el estrés oxidativo

Para los ensayos de estrés oxidativo con t-BOOH se han expuesto a las células Jurkat durante 30 minutos con concentraciones de 0, 100, 200, 400, 800 y 1000 μM de t-BOOH. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

– Estudio con los sustratos fluorogénicos DHDCF, DHR123 y MitoPY1

Tras incubación con t-BOOH exógeno se aprecian aumentos estadísticamente significativos del cociente de fluorescencia para las tres sondas empleadas, pero con intensidad y dosis-dependencia diferentes para los diversos sustratos fluorogénicos (Figura 35) y con respecto a las observadas para ellos a dosis idénticas de H_2O_2 (Figura 32).

Por una parte, las tres sondas analizadas muestran un aumento dosis-dependiente del cociente de fluorescencia para todas las concentraciones de t-BOOH, mucho más

Resultados

claro en el caso de DHDCF. Desde el punto de vista cuantitativo, DHDCF presenta los cocientes de fluorescencia más altos, cercano a 35 para la dosis más alta probada del xenobiótico. DHR123 muestra el cociente máximo de fluorescencia ($24,63 \pm 1,55$) a la dosis de $800 \mu\text{M}$ de t-BOOH. Por su parte, MitoPY1 presenta un cociente máximo de $3,07 \pm 0,16$.

Comparando los efectos de concentraciones idénticas de H_2O_2 (Figura 32) y t-BOOH (Figura 35) hay que resaltar que los fluorocromos DHDCF y DHR123 experimentan cambios mucho más intensos de fluorescencia tras la exposición de las células al hidroperóxido orgánico, mientras que la sonda MitoPY1, que había resultado relativamente más sensible al H_2O_2 , aparece como la menos eficiente en la detección de ROS inducida por t-BOOH.

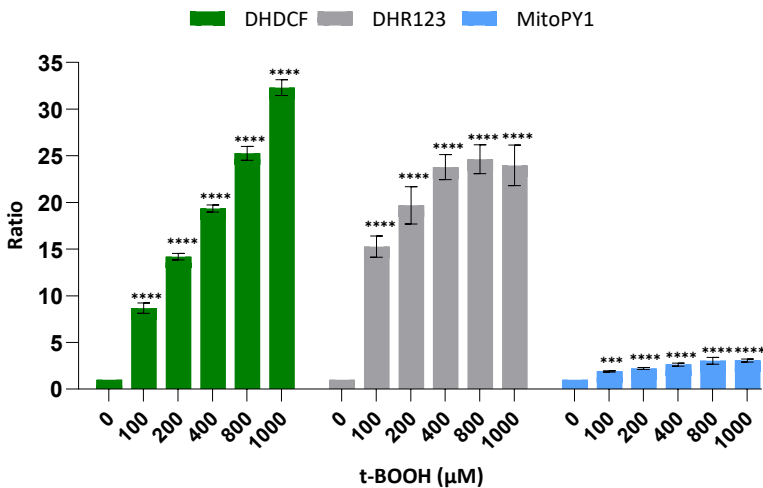


Figura 35: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos HE y MitoSox Red

En esta serie de experimentos se han incubado las células Jurkat con las concentraciones de 0, 200 y $1000 \mu\text{M}$ de t-BOOH. Para examinar la respuesta de t-BOOH en cuanto a la formación de O_2^- tanto mitocondrial como citosólico se han

utilizado las sondas HE y MitoSox Red. Tras la incubación con t-BOOH exógeno se observa un aumento estadísticamente significativo y dosis-dependiente del cociente de fluorescencia para ambas sondas (Figura 36), con valores máximos de $4,04 \pm 0,17$ para HE y de $3,21 \pm 0,06$ para MitoSox Red. En ambos casos, la intensidad del cociente fue mucho menor que la observada para los sustratos DHDCF y DHR123 (Figura 35). Comparando los efectos de concentraciones idénticas de H_2O_2 (Figura 33) y t-BOOH (Figura 36) ambos sustratos fluorogénicos muestran cambios más intensos de fluorescencia tras la exposición de las células al hidróperóxido orgánico.

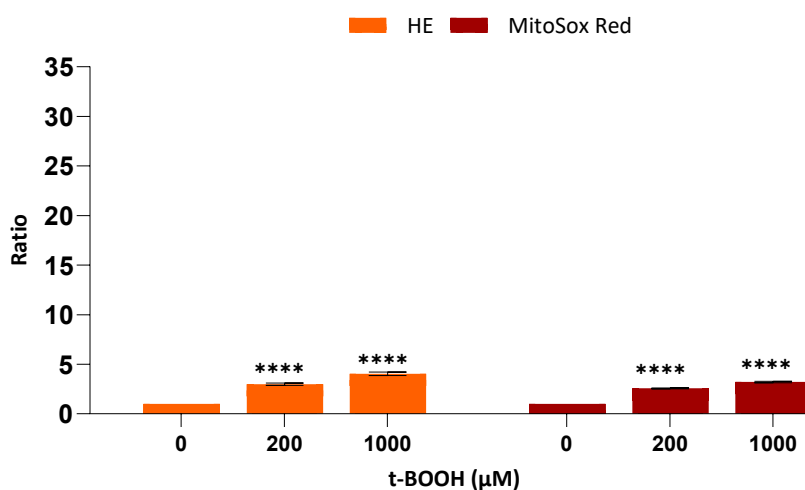


Figura 36: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos CellROX y Enzo:

Se han incubado las células Jurkat con las concentraciones de 0 y 1000 μM de t-BOOH y se han empleado la gama de sustratos fluorogénicos CellROX, así como también Oxidative Stress Green y Superoxide Orange. Como se muestra en la Figura 37, la incubación con t-BOOH induce un aumento en los cocientes de fluorescencia en las células teñidas con cualquiera de las sondas, principalmente en el caso de Superoxide Orange ($5,87 \pm 0,24$). Las demás sondas presentan ratios menores: Oxidative Stress Green ($5,29 \pm 0,50$), CellROX Orange ($4,58 \pm 0,63$), CellROX Deep Red ($3,30 \pm 0,23$) y CellROX Green ($2,13 \pm 0,47$).

Resultados

A la vista de los efectos de concentraciones idénticas de H_2O_2 (Figura 34) y t-BOOH (Figura 37), la sonda Superoxide Orange muestran cambios más intensos de fluorescencia tras la exposición de las células al t-BOOH. Además, los demás sustratos fluorogénicos presenta mayores ratios de fluorescencia con dicho prooxidante.

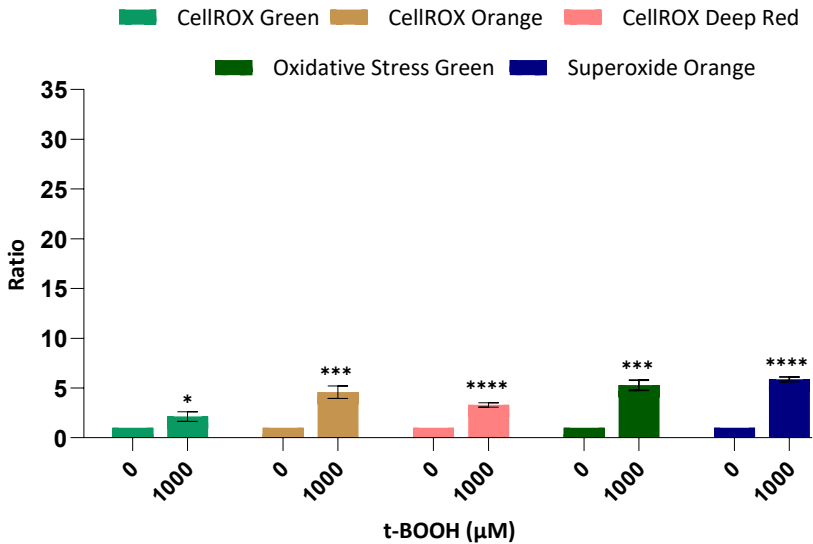


Figura 37: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en células Jurkat expuestas a 1000 μM de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

2.2.3. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo

Las células Jurkat se han expuesto durante 30 minutos con concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 μM del xenobiótico CHP. Con respecto a la viabilidad no se genera un incremento mayor del 10 % de muerte celular en las concentraciones establecidas. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

- Estudio con los sustratos fluorogénicos DHDCF, DHR123 y MitoPY1

En los ensayos de estrés oxidativo con el xenobiótico CHP se aprecian aumentos estadísticamente significativos del cociente de fluorescencia para las tres sondas utilizadas. No obstante, la intensidad de los cocientes de fluorescencia es diferente para los diversos fluorocromos (Figura 38) y con respecto a las observadas para

ellos a dosis idénticas de H_2O_2 (Figura 32) o t-BOOH (Figura 35).

Las tres sondas analizadas revelan un aumento dosis-dependiente del cociente de fluorescencia para todas las concentraciones de CHP, mucho más intenso en el caso de DHR123, reflejado en un cociente de $52,01 \pm 4,20$ a la concentración de $80 \mu M$. Las sondas DHDCF y MitoPY1 aumentan el cociente de fluorescencia a medida que se incrementa la concentración de CHP, con valores de $11,55 \pm 0,84$ y de $3,71 \pm 0,10$ respectivamente en las dosis más altas probadas.

En la comparación de los resultados entre CHP, t-BOOH y H_2O_2 hay que destacar que DHR123 presenta mayores cambios de fluorescencia tras la exposición de las células al CHP, mientras que la sonda MitoPY1, que había resultado relativamente más específica para H_2O_2 aparece como la menos eficiente en la detección de ROS inducida por los peróxidos orgánicos, t-BOOH y CHP. Asimismo, DCDHF muestra una sensibilidad mayor al CHP a la observada hacia H_2O_2 .

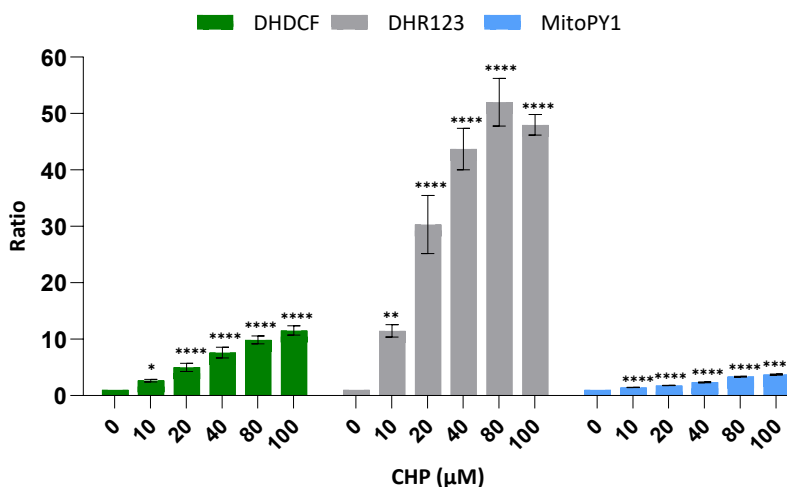


Figura 38: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos HE y MitoSox Red

Para los experimentos con los fluorocromos HE y MitoSox Red, las células se

Resultados

han incubado con las concentraciones de 0, 20 y 100 μM de CHP. La adición del xenobiótico CHP manifiesta un incremento estadísticamente significativo en el cociente de fluorescencia para ambas sondas (Figura 39), con valores máximos de $3,57 \pm 0,50$ para HE y $3,51 \pm 0,29$ para MitoSox Red en la máxima concentración de CHP ensayada (100 μM). Los resultados con CHP son similares a los obtenidos con t-BOOH, ya que ambos sustratos fluorogénicos tienen cambios de fluorescencia parecidos tras la incubación con estos xenobióticos.

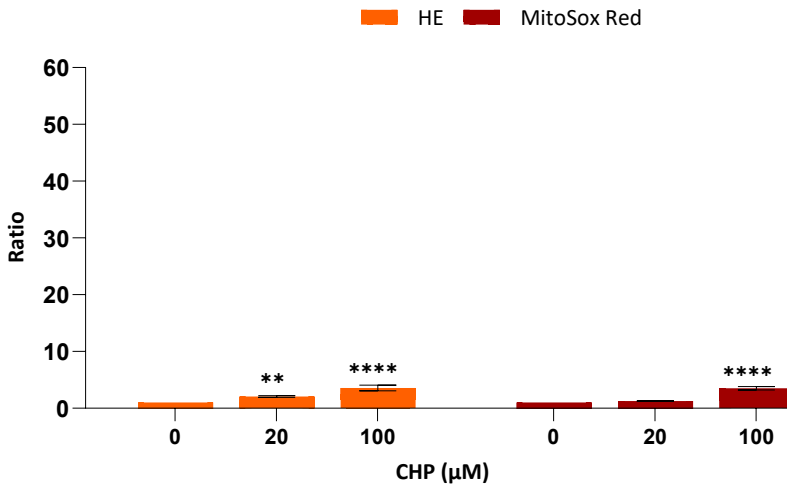


Figura 39: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

2.3. Niveles celulares de ROS en cultivos celulares tratados con generadores de ión superóxido

Esta serie de experimentos se centran en medir el estrés oxidativo intracelular en las células Jurkat inducidas por la incubación con xenobióticos inductores de la generación intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estos ensayos también se limitan a poblaciones de células vivas a través del empleo del fluorocromo DAPI.

2.3.1. Efecto de menadiona sobre el estrés oxidativo

La menadiona es un xenobiótico que induce la generación intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a través de reacciones de transferencia de un electrón. Para los ensayos de estrés

oxidativo con menadiona se han tratado durante 60 minutos las células Jurkat con dosis de 0, 15, 20, 30 y 50 μM . Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

– Estudio con los sustratos fluorogénicos HE y MitoSox Red

La menadiona genera un aumento estadísticamente significativo y dosis-dependiente del cociente de fluorescencia en ambas sondas (Figura 40). Mediante el uso de la sonda MitoSox Red se muestran valores máximos de $6,64 \pm 0,13$ en la máxima concentración de menadiona probada (50 μM). En cambio, para HE los valores son $4,39 \pm 0,41$. Se observa una mayor sensibilidad de la sonda MitoSox Red para menadiona.

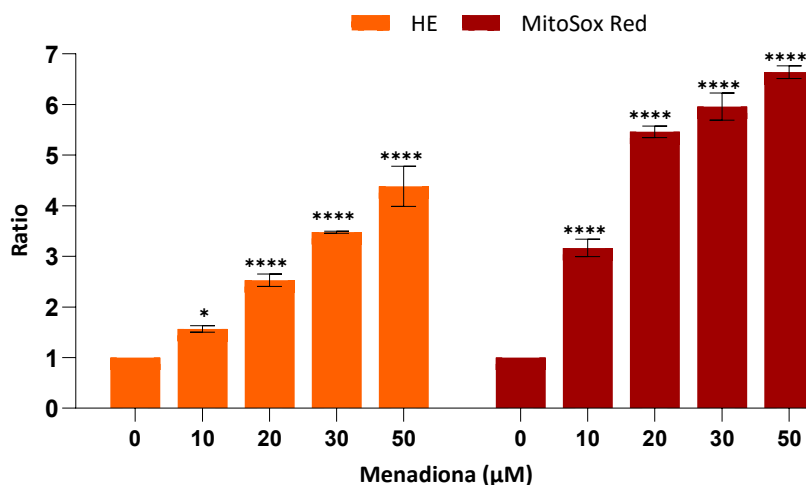


Figura 40: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos DHDCF, DHR123 y MitoPY1

Para evaluar la capacidad de la menadiona de generar otras especies reactivas además de O_2^- se emplean los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 con las concentraciones de 0, 20 y 50 μM (Figura 41). Los resultados muestran un incremento de cociente similar en las sondas DHDCF y MitoPY1 con valores máximos de $2,41 \pm 0,25$ y de $2,92 \pm 0,05$ respectivamente. Es de destacar el aumento en DHR123 del cociente de fluorescencia ($6,63 \pm 0,10$) con valores similares a los observados con

Resultados

MitoSox Red.

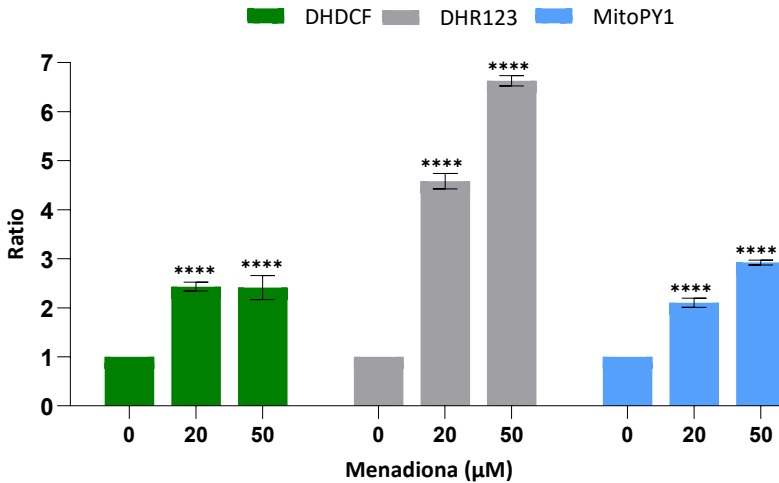


Figura 41: Ratio de los fluorocromos DCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos CellROX y Enzo

Como se observa en la Figura 42, tras el tratamiento con menadiona los sustratos fluorogénicos presentan diferencias significativas en los cocientes de fluorescencia en las células teñidas con cualquiera de las sondas. Las tres sondas de CellROX muestran valores similares en torno al 2. Los resultados obtenidos con CellROX Green con t-BOOH (Figura 37) son similares a los reflejados con menadiona (Figura 42). En cambio, Oxidative Stress Green presenta unos valores de $1,14 \pm 0,02$ y Superoxide Orange unos valores de $3,34 \pm 0,19$. Esto indica la baja sensibilidad de Oxidative Stress Green para la menadiona y alta especificidad de Superoxide Orange.

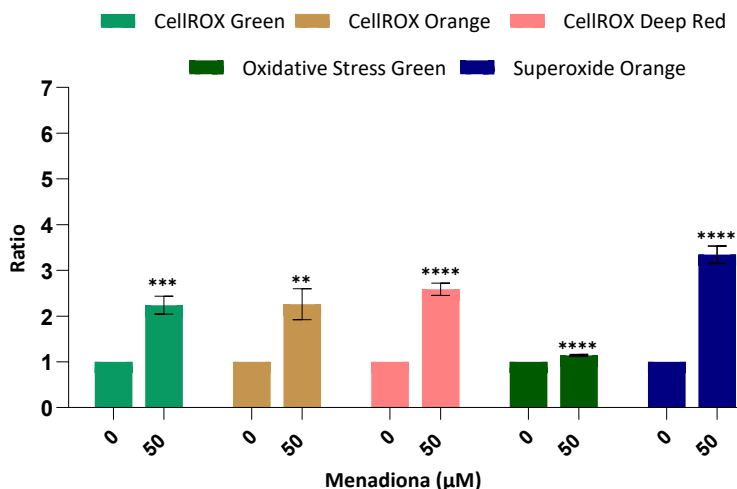


Figura 42: Ratio de los fluorocromos CellROX Green, CellROX Orange, CellROX Deep Red, Oxidative Stress Green y Superoxide Orange en las células Jurkat expuestas a 50 μM de menadiona. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 y **** p<0,0001).

2.3.2. Efecto de plumbagina sobre el estrés oxidativo

La plumbagina, al igual que la menadiona, es un xenobiótico que induce la generación intracelular de O_2^- a través de redox cycling. Las concentraciones probadas en las células Jurkat para este compuesto son 0, 10, 20, 30 y 50 μM durante 60 minutos. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia, como se ha descrito para la titulación de los diferentes sustratos fluorogénicos.

– Estudio con los sustratos fluorogénicos HE y MitoSox Red

La estimación de O_2^- se ha realizado mediante los marcadores fluorescentes HE y MitoSox Red a nivel basal y tras su inducción con un dador exógeno, la plumbagina. Se observa un incremento estadísticamente significativo en los cocientes de fluorescencia para ambos sustratos fluorogénicos (Figura 43). La respuesta dosis-dependiente se muestra con HE con valores máximos de $23,76 \pm 3,38$. Para MitoSox Red los valores más altos tienen lugar a la concentración de 30 μM ($10,05 \pm 0,52$).

Comparando los valores de ratio de concentraciones idénticas de menadiona (Figura 40) y plumbagina (Figura 43) se puede comprobar un comportamiento diferente de

Resultados

ambos sustratos fluorogénicos, de modo que la sonda HE presenta mucha mayor sensibilidad para la plumbagina que para la menadiona. En cambio, MitoSox Red tiene más especificidad para la menadiona que para la plumbagina.

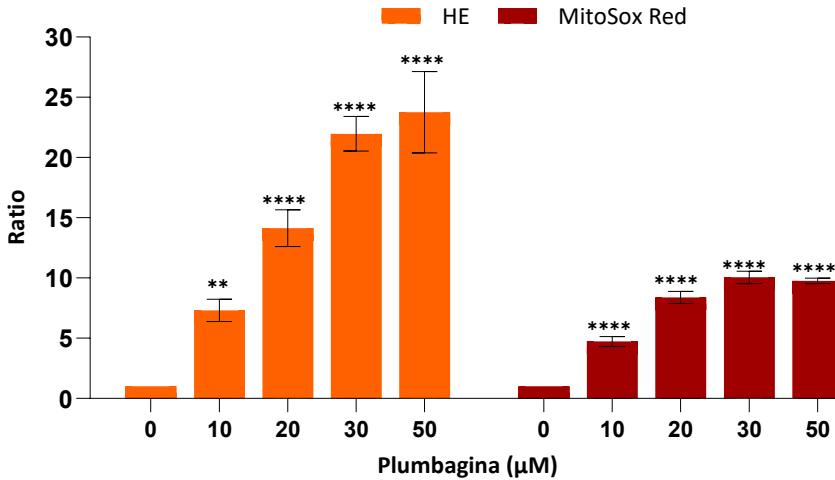


Figura 43: Ratio de los fluorocromos HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

– Estudio con los sustratos fluorogénicos DHDCF, DHR123 y MitoPY1

Se utilizan los marcadores fluorescentes DHDCF, DHR123 y MitoPY1 para medir las ROS generadas por las concentraciones de 0, 20 y 50 μ M de plumbagina con valores estadísticamente significativos en las tres sondas. Los resultados muestran un mayor incremento de cociente en DHR123 con valores de $4,73 \pm 0,32$. Dicho incremento dosis-dependiente también se refleja en DHDCF. Con MitoPY1 sólo se aprecia un ligero incremento del cociente de fluorescencia ($1,63 \pm 0,04$), independiente de la concentración de plumbagina. Contrastando los efectos de concentraciones idénticas de menadiona (Figura 41) y plumbagina (Figura 44) se puede comprobar un comportamiento más sensible con DHR123 tras la exposición a dichos xenobióticos.

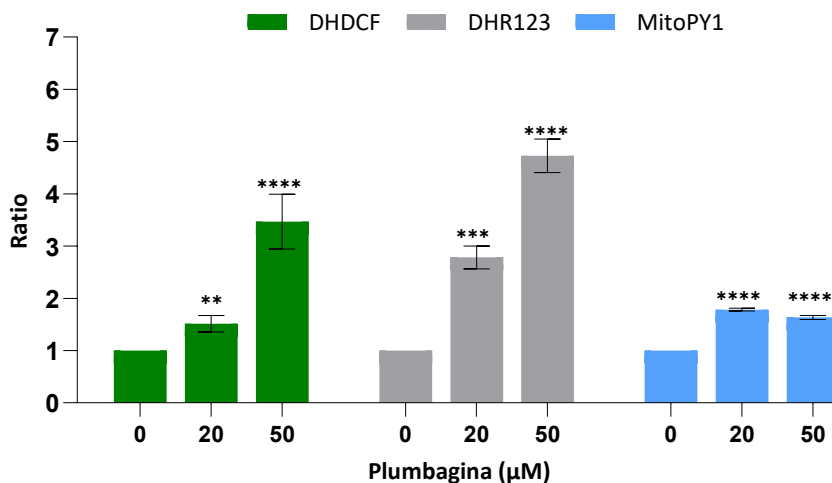


Figura 44: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123 y MitoPY1 en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Para aportar una visión de conjunto de los resultados obtenidos en los experimentos descritos en los apartados 2.2 y 2.3, se presenta la Figura 45, que muestra de forma conjunta la sensibilidad y la curva de dosis-dependencia de los sustratos fluorogénicos utilizados para cada uno de los xenobióticos modelo estudiados.

Resultados

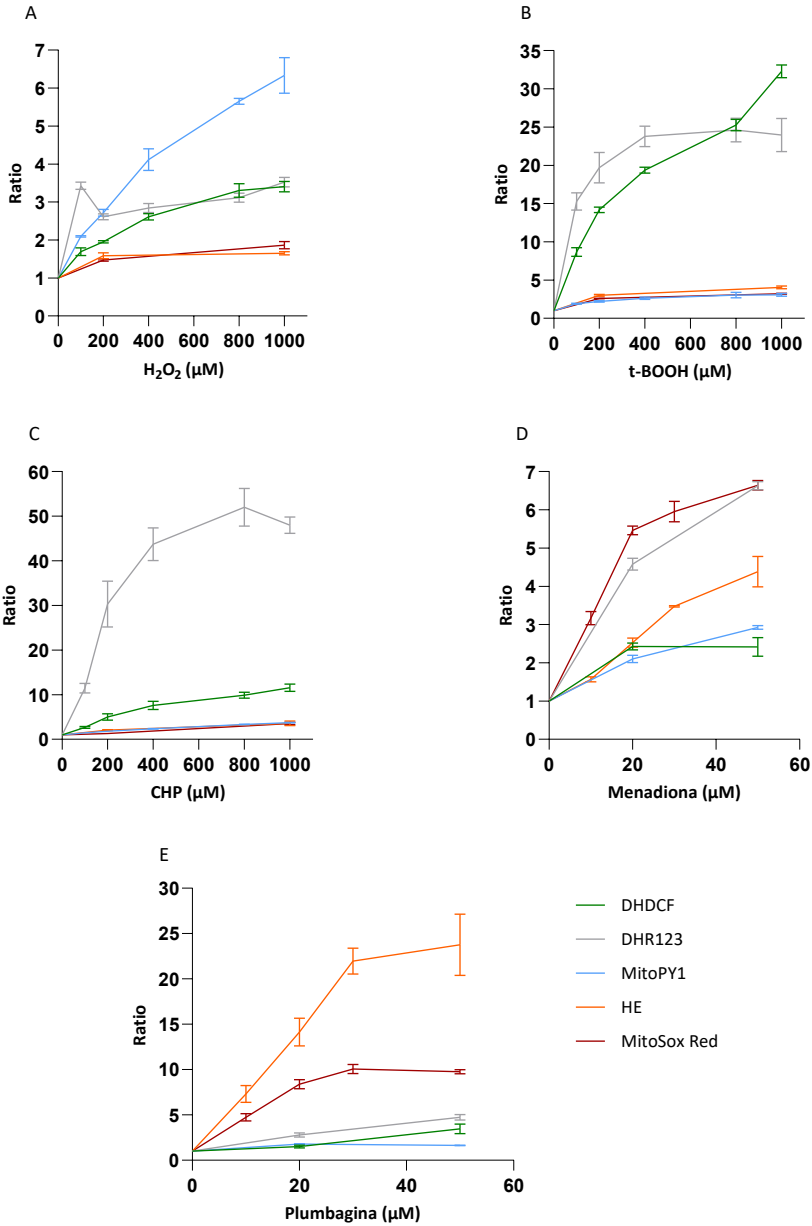


Figura 45: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red en las células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de (A) H₂O₂, (B) t-BOOH, (C) CHP, (D) menadiona y (E) plumbagina. Los resultados son la media ± SD (n=3).

2.4. Ensayos de estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con xenobióticos donadores de óxido nítrico y peroxinitrito

Una vez evaluada la aplicabilidad de diferentes sustratos fluorogénicos para cuantificar los efectos prooxidantes de xenobióticos nos propusimos aplicar la CMF para cuantificar el estrés nitrosativo intracelular, inducido por la exposición de células Jurkat a dos xenobióticos que generan NO \cdot intracelular por mecanismos y velocidades diferentes: DEA NONOato y SIN-1.

Como se ha descrito en el apartado Material y Métodos, DEA NONOato es un donante de NO \cdot que se disocia espontáneamente en un proceso de primer orden dependiente del pH, con una vida media de dos minutos a 37°C y libera 1,5 moles de NO \cdot por mol de compuesto parental. Por otro lado, SIN-1 se descompone espontáneamente en presencia de O $_2$ para generar NO \cdot y O $_2^{\cdot-}$. Ambos productos se unen muy rápidamente para formar ONOO \cdot (constante de velocidad k: $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Para la detección de los niveles de NO \cdot se ha utilizado el sustrato fluorogénico DAF-FM, que está considerado como un indicador adecuado para detectar y cuantificar bajas concentraciones de NO \cdot . Al igual que en los estudios de estrés oxidativo, los ensayos de estrés nitrosativo deben restringirse a poblaciones de células vivas, por lo que siempre se ha incluido el fluorocromo vital DAPI.

2.4.1. Estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con DEA NONOato

Para los ensayos de estrés nitrosativo con DEA NONOato las células Jurkat se han expuesto durante 15 minutos a las concentraciones de 0 y 250 μM de este xenobiótico. Como en los experimentos anteriores, el indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de RNS es el cociente de fluorescencia.

Como se puede observar en la Figura 46, el cociente de fluorescencia del fluorocromo DAF, producido a partir del sustrato DAF-FM por acción del NO \cdot intracelular aumenta significativamente, hasta un valor de $6,23 \pm 0,20$ a la concentración ensayada de DEA NONOato. Se analiza su cociente de fluorescencia con el de otros sustratos fluorogénicos que no reaccionan con el NO \cdot , como DHR123, considerado como indicador de ONOO \cdot , MitoPY1, marcador selectivo de H $_2$ O $_2$ en la mitocondria y Oxidative Stress Green, marcador de estrés oxidativo. Como se refleja en la Figura 46, el dador de NO \cdot no induce ningún aumento en la fluorescencia de DHR23 y un ligero, pero significativo, incremento en el cociente de fluorescencia de MitoPY1 ($2,03 \pm 0,05$) y de Oxidative Stress Green ($1,98 \pm 0,25$).

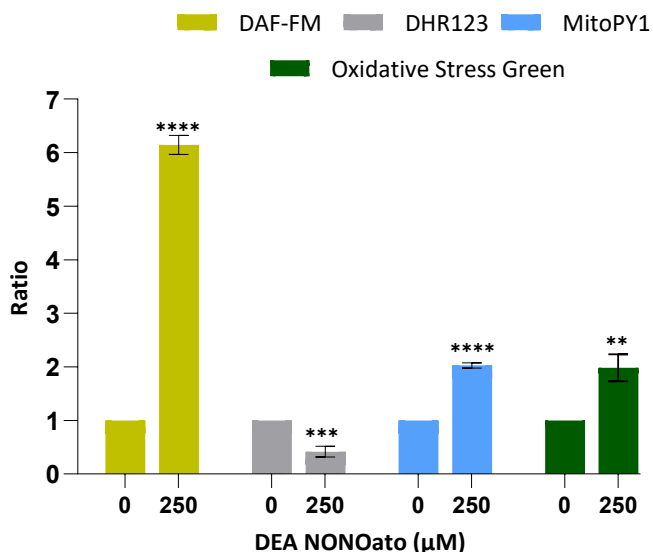


Figura 46: Ratio de los fluorocromos DAF-FM, DHR123, MitoPY1 y Oxidative Stress Green en células Jurkat expuestas a 250 μM de DEA NONOato. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

2.4.2. Estrés nitrosativo en células Jurkat tratadas con SIN-1

Para los ensayos de estrés nitrosativo con SIN-1 se han tratado durante 30 minutos las células Jurkat con dosis de 0, 100, 200 y 400 μM del xenobiótico. Como se ha indicado anteriormente, SIN-1 se descompone espontáneamente en presencia de O_2 para formar $NO\cdot$ y $O_2^{\cdot-}$, que se combinan muy rápidamente para formar $ONOO^-$. De acuerdo con el mecanismo de acción del SIN-1 y para evaluar la contribución de las especies reactivas liberadas, se han utilizado los sustratos fluorogénicos DHR123 como indicador de $ONOO^-$, HE como indicador de $O_2^{\cdot-}$ y DAF-FM como indicador de $NO\cdot$.

La Figura 47 muestra la producción dosis-dependiente de $ONOO^-$ por efecto de SIN-1, estimada mediante la tinción con el sustrato fluorogénico DHR123. Como cabía esperar, el tratamiento con SIN-1 durante 30 minutos indujo un aumento dosis-dependiente del cociente de fluorescencia de DHR123, indicando la generación intracelular de $ONOO^-$.

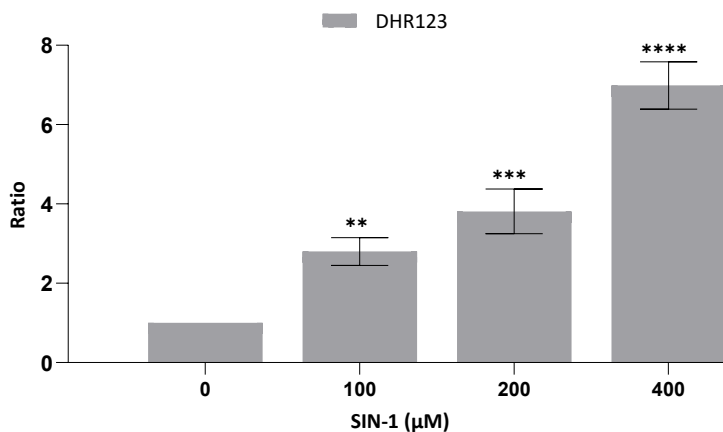


Figura 47: Ratio del fluorocromo DHR123 en células Jurkat expuestas a diferentes concentraciones de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Por el contrario, el tratamiento con la dosis más alta probada de SIN-1 aumenta significativamente el cociente de fluorescencia de DAF-FM ($2,86 \pm 0,18$) pero el incremento es menor comparado con DHR123. Por otro lado, no se observan diferencias significativas en el cociente de fluorescencia de la sonda HE (Figura 48). Estos resultados sugieren que ONOO^- es la RNS producida mayoritariamente en las condiciones del experimento, con una menor presencia de NO^- y niveles de O_2^- no detectables con HE. Hay que destacar el notable incremento en el cociente de fluorescencia de la sonda Oxidative Stress Green, lo que demuestra que es un buen marcador para detectar ONOO^- intracelular.

Resultados

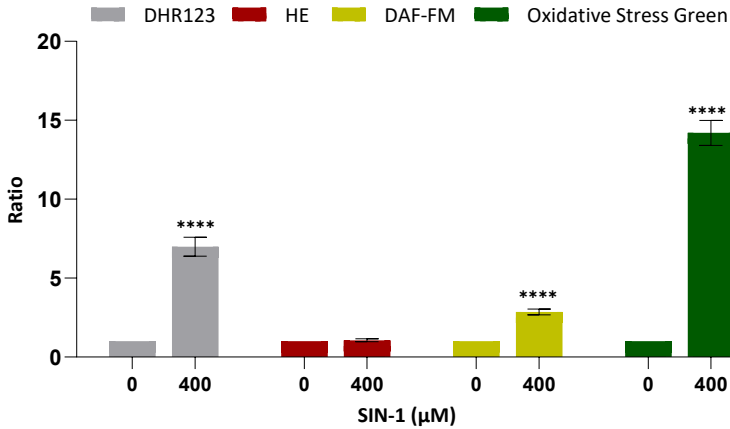


Figura 48: Ratio de los fluorocromos DHR123, HE, DAF-FM y Oxidative Stress Green en células Jurkat expuestas a 400 μM de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Se ha descrito que el sustrato fluorogénico DHDCF puede ser oxidado específicamente por NO. Para evaluar esta posibilidad, se ha determinado el efecto de los tratamientos con DEA NONOato (250 μM) y SIN-1 (400 μM) sobre la fluorescencia de la sonda (Figura 49). Como se puede observar, el dador de NO DEA-NONOato indujo un marcado aumento de la fluorescencia de DCF (valor de cociente por encima de 50), mientras que el dador de ONOO⁻, SIN-1, produjo un aumento mucho más modesto del cociente de fluorescencia del fluorocromo DHDCF, confirmando que DHDCF puede reaccionar con NO.

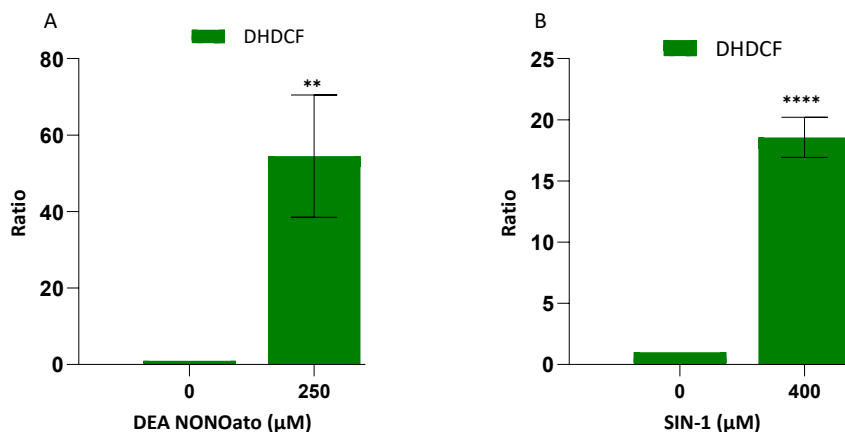


Figura 49: Ratio del fluorocromo DHDCF en células Jurkat expuestas a (A) 250 µM de DEA NONOato y (B) a 400 µM de SIN-1. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

2.5. Determinación por CMF del efecto de antioxidantes e inhibidores del estrés oxidativo

2.5.1. Efecto de N-acetilcisteína

Por sus características bioquímicas, NAC se utiliza principalmente como antioxidante soluble para la eliminación de ROS de carácter móvil, como H_2O_2 o $\text{O}_2^{\cdot-}$, siendo menos eficaz en la prevención de fenómenos de estrés oxidativo ligados a membranas, como la peroxidación lipídica. Por ello, se han realizado tres series de experimentos con células Jurkat en los que NAC se ha utilizado como antioxidante frente a H_2O_2 (tratamiento con H_2O_2 exógeno), $\text{O}_2^{\cdot-}$ (tratamiento con menadiona) o peroxidación lipídica (tratamiento con CHP). Para cada tratamiento se ha elegido el sustrato fluorogénico más adecuado al tipo de ROS generado, en función de los resultados de los experimentos de validación resumidos en los apartados 2.2 y 2.3 de esta Tesis. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia, como en experimentos anteriores.

En la Figura 50A se muestra el excelente efecto protector de NAC frente al H_2O_2 exógeno, revelado con la sonda fluorescente MitoPY1. La preincubación con NAC reduce marcadamente ($1,66 \pm 0,04$) el cociente de fluorescencia de MitoPY1 en células Jurkat expuestas a H_2O_2 con respecto al cociente de la sonda en ausencia de NAC ($6,32 \pm 0,46$). De forma similar, (Figura 50B) se observa un buen efecto

Resultados

protector de NAC frente al O_2^- intracelular producido por el tratamiento con menadiona y revelado con el fluorocromo MitoSox Red. La preincubación con NAC disminuye ($3,57 \pm 0,09$) el cociente de fluorescencia de MitoSox en células Jurkat expuestas a menadiona, con respecto al cociente del fluorocromo en ausencia de NAC ($6,64 \pm 0,13$).

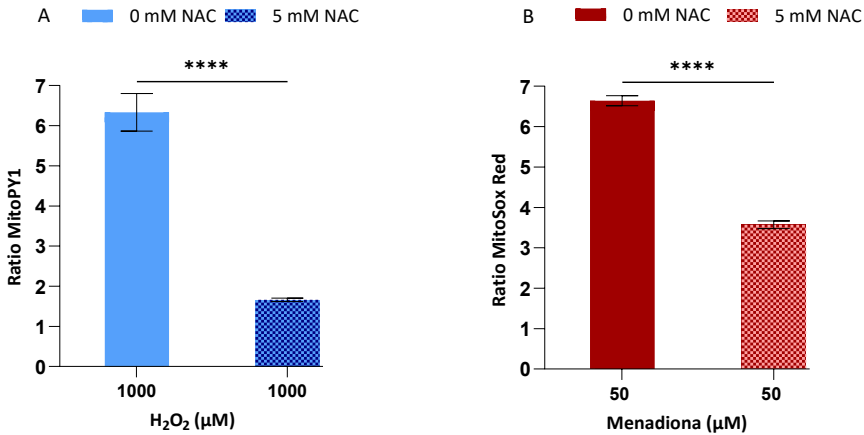


Figura 50: Ratio del fluorocromo (A) MitoPY1 en células Jurkat expuestas a 1000 μM de H_2O_2 en presencia o ausencia de 5 mM de NAC y ratio del fluorocromo (B) MitoSox Red en células Jurkat expuestas a 50 μM de menadiona en presencia o ausencia de 5 mM de NAC. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Por el contrario (Figura 51) NAC presenta un escaso efecto protector de frente a la peroxidación lipídica inducida por el tratamiento con CHP, empleando DHR123. La preincubación con NAC reduce ligeramente ($38,95 \pm 0,50$) el cociente de fluorescencia de DHR123 en células Jurkat expuestas a CHP con respecto al cociente de la sonda en ausencia de NAC ($47,99 \pm 1,83$).

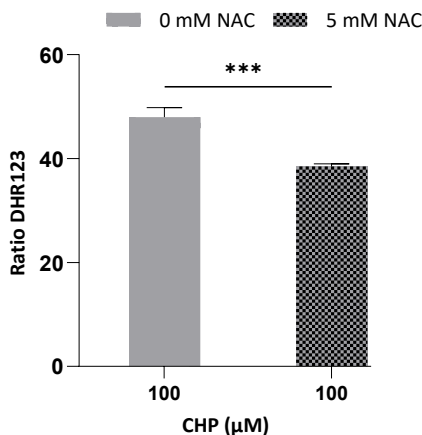


Figura 51: Ratio del fluorocromo DHR123 en células Jurkat expuestas a 100 μM de CHP en presencia o ausencia de 5 mM de NAC. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

2.5.2. Efecto de la inhibición de SOD sobre los niveles de fluorescencia de los sustratos fluorogénicos en condiciones de generación de ión superóxido

La enzima SOD cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot -}$ en O_2 y H_2O_2 . Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al O_2 . Con el fin de diseñar un control positivo para la determinación por CMF de los niveles intracelulares de $\text{O}_2^{\cdot -}$ en células Jurkat, se ha realizado una serie de experimentos en los que las células se han preincubado con DETC, un inhibidor de la SOD, previamente al tratamiento con menadiona, un xenobiótico dador de $\text{O}_2^{\cdot -}$. En dichas condiciones experimentales se espera incrementar el nivel intracelular de $\text{O}_2^{\cdot -}$ al bloquear su transformación en H_2O_2 . Como sustrato fluorogénico más adecuado para la detección de $\text{O}_2^{\cdot -}$ se ha elegido la sonda MitoSox Red, en función de los resultados de los experimentos de validación resumidos en los apartados 2.2 y 2.3 de esta Tesis Doctoral.

La Figura 52 muestra el efecto dosis-dependiente del DETC en la inhibición de la SOD y la consiguiente acumulación intracelular de $\text{O}_2^{\cdot -}$. Como puede observarse, el cociente de fluorescencia de MitoSox Red aumenta de manera dependiente de la concentración del inhibidor, desde $6,64 \pm 0,13$, en ausencia de inhibidor hasta un valor de $9,66 \pm 0,20$ para la máxima concentración probada de DETC. Se muestran

Resultados

diferencias estadísticas significativas en el tratamiento con el inhibidor en las concentraciones de 100 y 200 μM .

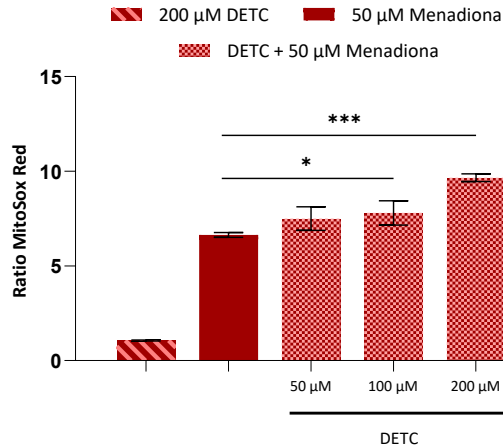


Figura 52: Ratio del fluorocromo MitoSox Red en células Jurkat expuestas a 50 μM de menadiona en presencia o ausencia de DETC. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

2.5.3. Efecto de la inhibición de catalasa sobre los niveles de fluorescencia de los sustratos fluorogénicos en condiciones de niveles elevados de H_2O_2

La catalasa es un enzima antioxidante, perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas y que cataliza la descomposición del H_2O_2 en O_2 y H_2O . Para la cuantificación por CMF de los niveles intracelulares de H_2O_2 en células Jurkat, se ha realizado una serie de experimentos en los que las células se han preincubado con 3-AT, un inhibidor de la catalasa, previamente al tratamiento con H_2O_2 exógeno. Se espera el aumento del nivel intracelular de H_2O_2 , al bloquear su transformación en H_2O . Como sustrato fluorogénico más adecuado para la detección de H_2O_2 se ha designado la sonda MitoPY1, en función de los resultados de los experimentos de validación resumidos en los apartados 2.2 y 2.3 de esta Tesis.

La Figura 53 muestra el efecto dosis-dependiente del 3-AT en la inhibición de la catalasa y la resultante acumulación intracelular de H_2O_2 . El cociente de fluorescencia de MitoPY1 aumenta de manera dependiente de la concentración del inhibidor. En todas las concentraciones ensayadas de 3-AT se muestran diferencias significativas en los cocientes de fluorescencia. En células tratadas con H_2O_2 exógeno, pero en ausencia de inhibidor, el cociente es $6,32 \pm 0,46$ y se incrementa hasta un valor de

9,66 ± 0,20 para la máxima concentración probada de 3-AT.

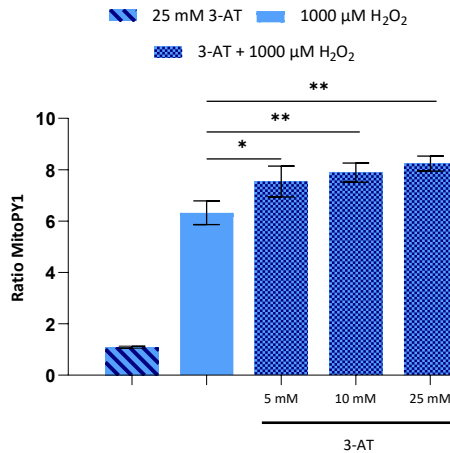


Figura 53: Ratio del fluorocromo MitoPY1 en células Jurkat expuestas a 1000 µM H₂O₂ en presencia o ausencia de 3-AT. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

3. Ensayos por RT-CMF con sustratos fluorogénicos para determinar la generación de ROS y RNS en suspensiones celulares tratadas con prooxidantes y dadores de óxido nítrico exógenos

Las determinaciones cinéticas por CMF proporcionan una herramienta simple y sensible para evaluar in vitro la evolución temporal y la intensidad de las respuestas generadas por las células. Las técnicas de CMF-RT se basan en el estudio cinético de las variaciones de fluorescencia en los primeros minutos del proceso biológico, mientras las células están siendo analizadas en el citómetro de flujo. Dicha técnica permite caracterizar de forma cinética los rápidos procesos relacionados con la generación de ROS y los efectos celulares de éstos.

3.1. Ensayos por citometría de flujo en tiempo real de estrés oxidativo inducido por sustancias prooxidantes

Se realizan ensayos por RT-FCM para medir la generación de ROS a través de diferentes sustratos fluorogénicos sensibles a los diferentes ROS. Después del correspondiente tiempo de incubación de cada una de las sondas, se procede a medir en el citómetro de flujo las variaciones de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos. La adquisición de la muestra en las células N13 se inicia y se

Resultados

mantiene durante 1 minuto, con el fin de obtener la fluorescencia basal y la tasa de variaciones espontáneas de la fluorescencia intracelular. Inmediatamente después de medir la intensidad basal se procede a la adición del correspondiente generador de ROS. Las regiones de análisis establecidas en diferentes puntos de tiempo a lo largo de la cinética, permitieron registrar los descriptores numéricos o estadísticos de la emisión de fluorescencia y derivar indicadores cinéticos relevantes, como la tasa de cambio de fluorescencia en intervalos dados. Las medidas cinéticas tuvieron una duración de 10 minutos.

3.1.1. Efecto de H_2O_2 sobre el estrés oxidativo en cinética

En estos experimentos se observa la cinética del efecto oxidativo del H_2O_2 empleando diversos fluorocromos de estrés oxidativo. En la figura 54 se muestran el aumento significativo en los diferentes sustratos fluorogénicos. Cabe destacar el incremento del cociente de fluorescencia durante los 10 minutos de tiempo en las sondas DHDCF, DHR123 y MitoPY1. El sustrato fluorogénico que mayor respuesta genera en tiempo real a la adición de H_2O_2 exógeno es MitoPY1 con valores de $21,49 \pm 1,57$. Estos resultados confirman la sensibilidad de MitoPY1 para estudiar los niveles de H_2O_2 . En cambio, las sondas MitoSox Red e HE presenta valores de cocientes leves de $1,52 \pm 0,08$ y $1,22 \pm 0,04$, respectivamente.

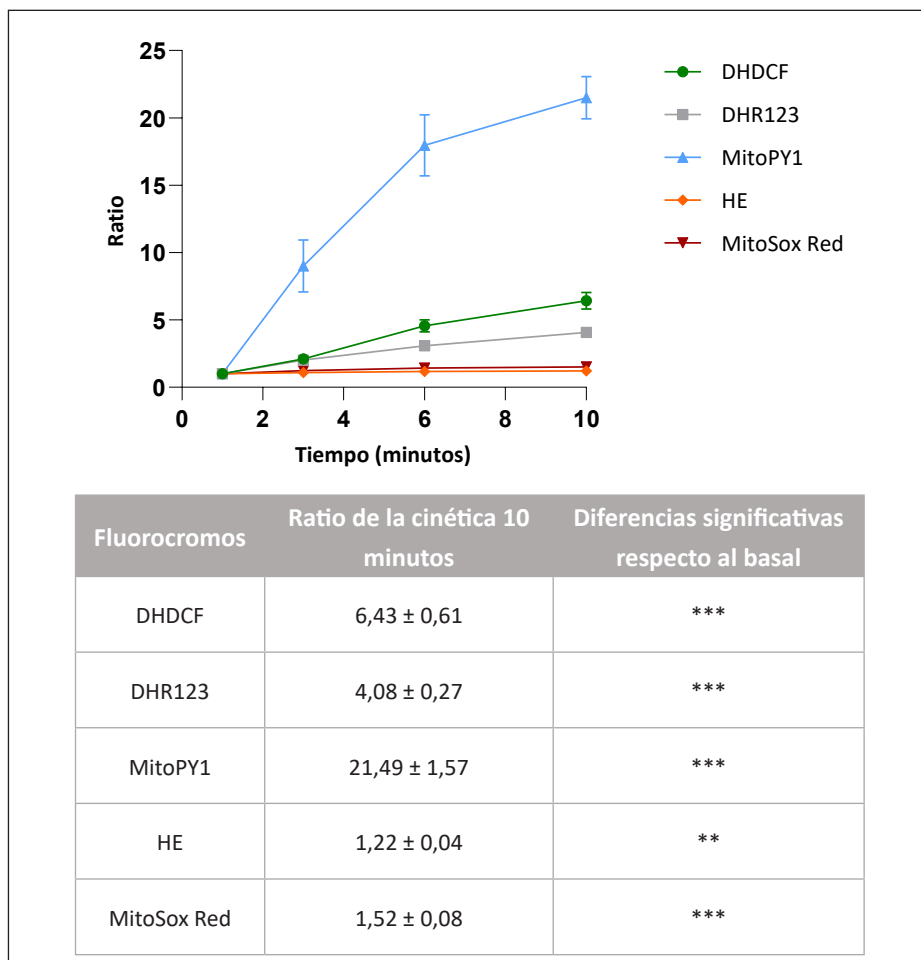


Figura 54: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 44 mM de H_2O_2 . Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.1.2. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo en cinética

Las cinéticas de las células N13 inducidas con CHP muestran un aumento de los cuatro sustratos fluorogénicos empleados, aunque de manera diferente (Figura 55). Con DHR123 se observa un incremento continuo a lo largo de la cinética. En cambio, los demás sustratos fluorogénicos incrementan su cociente de fluorescencia hasta el minuto 3 y durante la cinética el cociente se mantiene. Al igual que los resultados obtenidos en el apartado 2.2.3 de esta Tesis, DHR123 es la sonda que

Resultados

mayor respuesta genera al inducir con este xenobiótico con valores de $15,69 \pm 4,12$ a los diez minutos. Los demás fluorocromos presentan cocientes de fluorescencia parecidos.

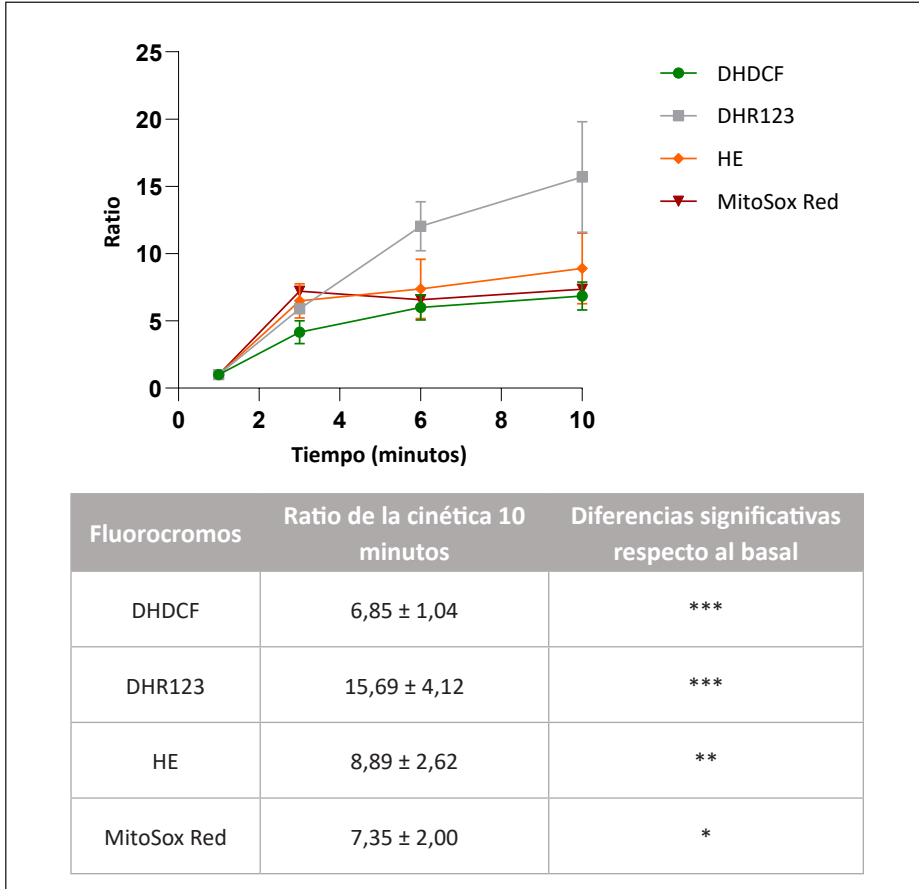


Figura 55: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 26,3 mM de CHP. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.1.3. Efecto de propranolol sobre el estrés oxidativo en cinética

Tras la adición de propranolol se aprecian aumentos estadísticamente significativos del cociente de fluorescencia para las cuatro sondas empleadas, pero con intensidad diferente para los diversos sustratos fluorogénicos (Figura 56). Las sondas MitoSox Red y DHDCF presenta los cocientes de fluorescencia más elevados con valores a los

diez minutos de la cinética de $2,37 \pm 0,39$ y $2,02 \pm 0,07$ respectivamente. Por otro lado, HE y DHR123 muestran valores cercanos a 1,5 de ratio de fluorescencia.

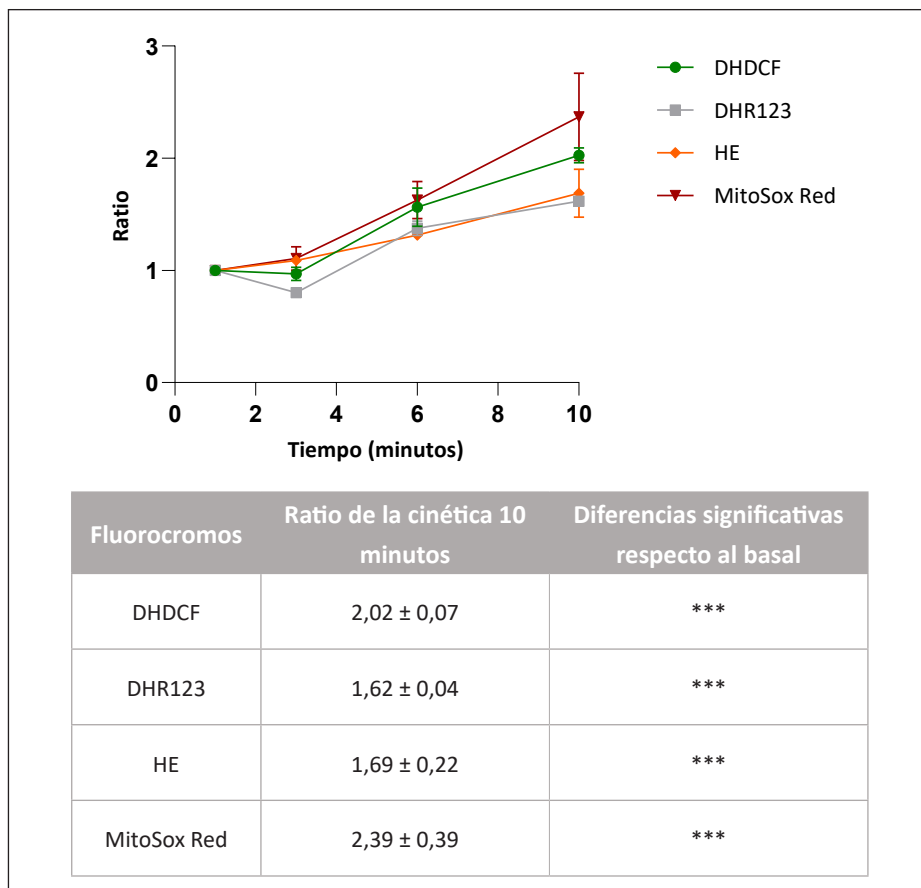


Figura 56: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 5 mM de propanolol. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.1.4. Efecto de plumbagina sobre el estrés oxidativo en cinética

Como se ha comentado anteriormente, la plumbagina es un dador de O_2^- . El efecto de dicho xenobiótico tras su adición a las células N13 se muestra en la Figura 57. Las sondas DHDCF y MitoSox Red presentan valores máximos a los 10 minutos de la cinética de $2,42 \pm 0,14$ y de $2,40 \pm 0,08$ respectivamente. A diferencia de los resultados obtenidos en el apartado 2.3.2 de esta Tesis, en los que la sonda

Resultados

fluorescente HE es la más sensible a la plumbagina en ensayos a tiempo final, no sucede lo mismo en los experimentos cinéticos. Esto puede deberse al tiempo de incubación necesario por la plumbagina para la formación de $O_2^{\cdot-}$.

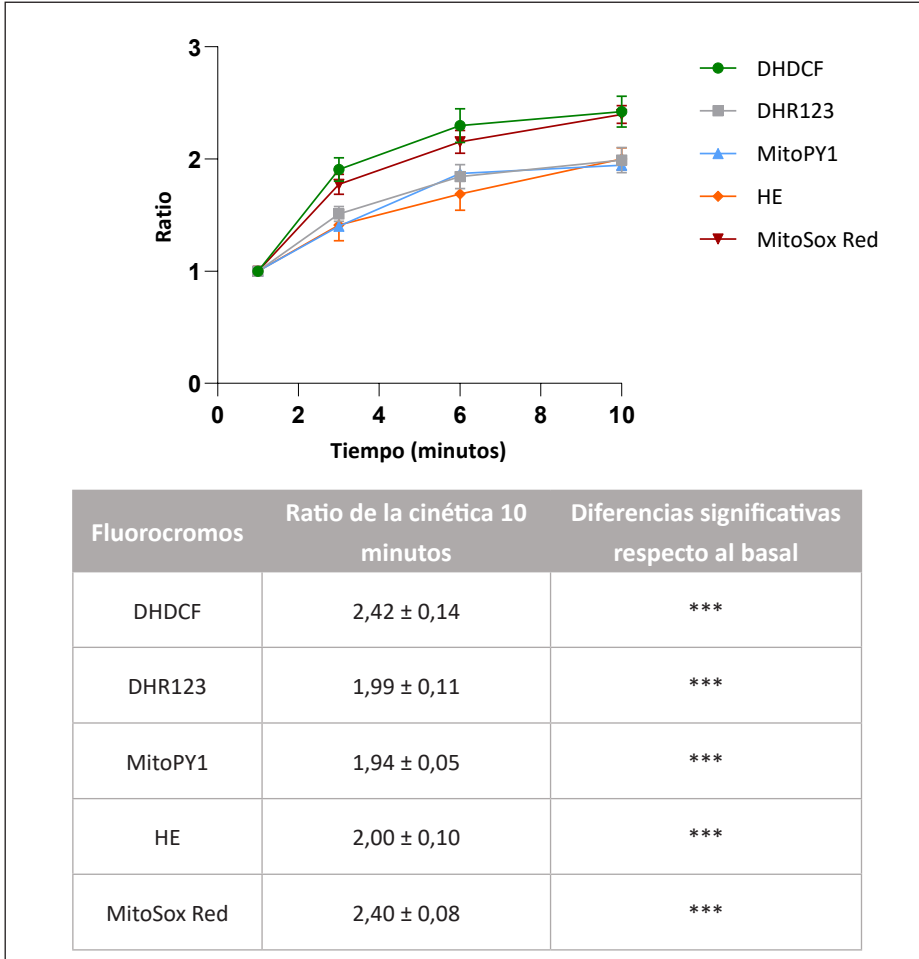


Figura 57: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 0,19 mM de plumbagina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.1.5. Efecto de epinefrina sobre el estrés oxidativo en cinética

El efecto cinético producido tras la adición de epinefrina a las células N13 se refleja en el incremento significativamente estadístico de los sustratos fluorogénicos empleados. Como se observa en la Figura 58, los resultados muestran un incremento de cociente mayor en la sonda DHDCF con valores a los 10 minutos de $2,85 \pm 0,47$. DHR123 presenta un cociente menor ($2,26 \pm 0,07$) y las sondas HE y MitoSox Red muestran valores similares en torno a 1,5.

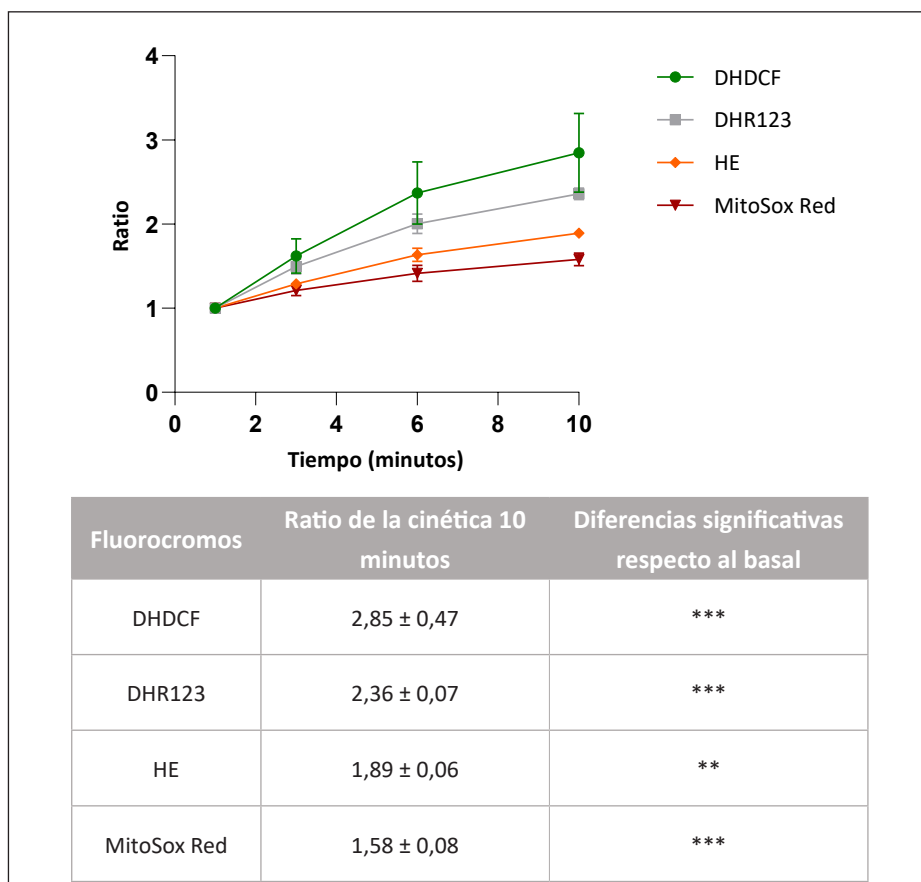


Figura 58: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 19 mM de epinefrina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.1.6. Efecto de FCCP sobre el estrés oxidativo en cinética

La adición de FCCP, un agente desacoplante de la membrana mitocondrial, en las células N13 provoca un aumento de los cocientes de fluorescencia de los cuatro fluorocromos, pero dicho incremento solo se observa hasta los tres primeros minutos de la cinética ya que después los valores de los cocientes son similares hasta el final de la cinética. La sonda DHDCF refleja la mayor respuesta con valores de $1,92 \pm 0,21$ en los primeros minutos de la cinética y valores de $2,10 \pm 0,18$ a los 10 minutos. Los valores de DHR123 son menores al compararlos con el fluorocromo DHDCF y los cocientes de HE y MitoSox Red son similares.

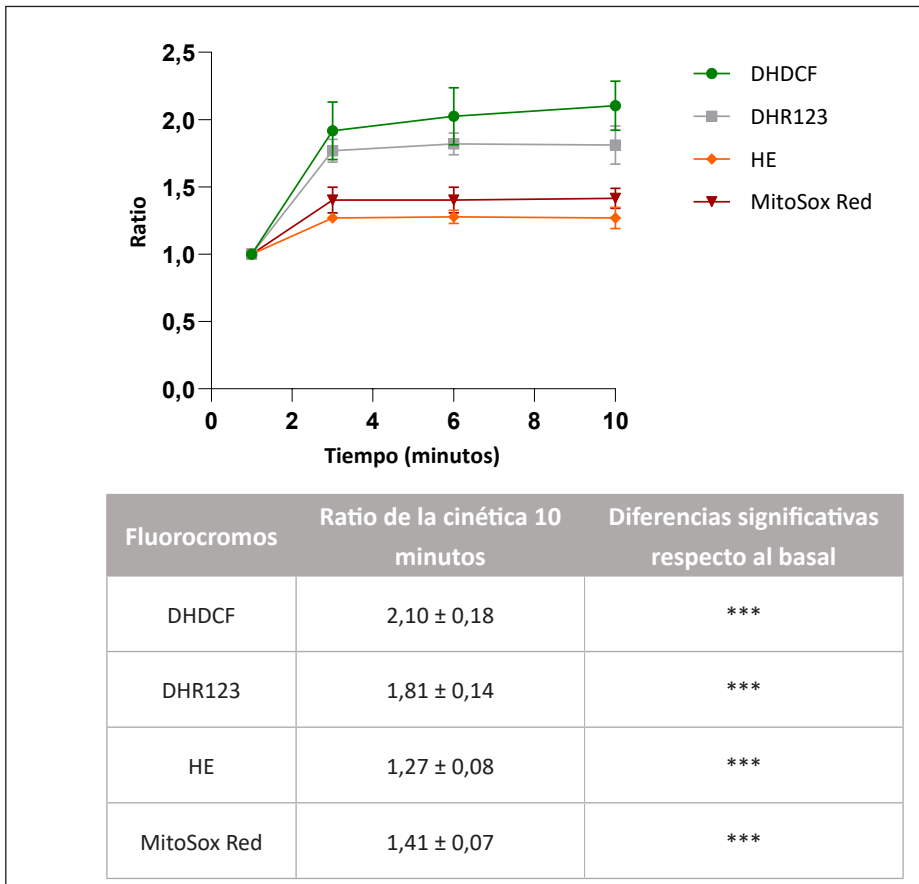


Figura 59: Ratio de los fluorocromos DHDCF, DHR123, MitoPY1, HE y MitoSox Red durante la cinética de las células N13 tras la adición de 50 µM de epinefrina. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

3.2. Análisis cinético de la generación intracelular de óxido nítrico

Para el seguimiento en tiempo real de la generación intracelular de NO , diseñamos una estrategia cinética basada en el uso de una serie de sondas fluorescentes y NOR-1, un donante de NO no basado en tior, que libera rápidamente NO en condiciones fisiológicas. La adición de NOR-1 genera un aumento rápido de la fluorescencia en células teñidas con DAF-FM DA, marcador específico de NO como se ha observado en la Figura 46. Además, se aprecia un menor incremento de la sonda fluorescente DHR123, con sensibilidad para el ONOO^- .

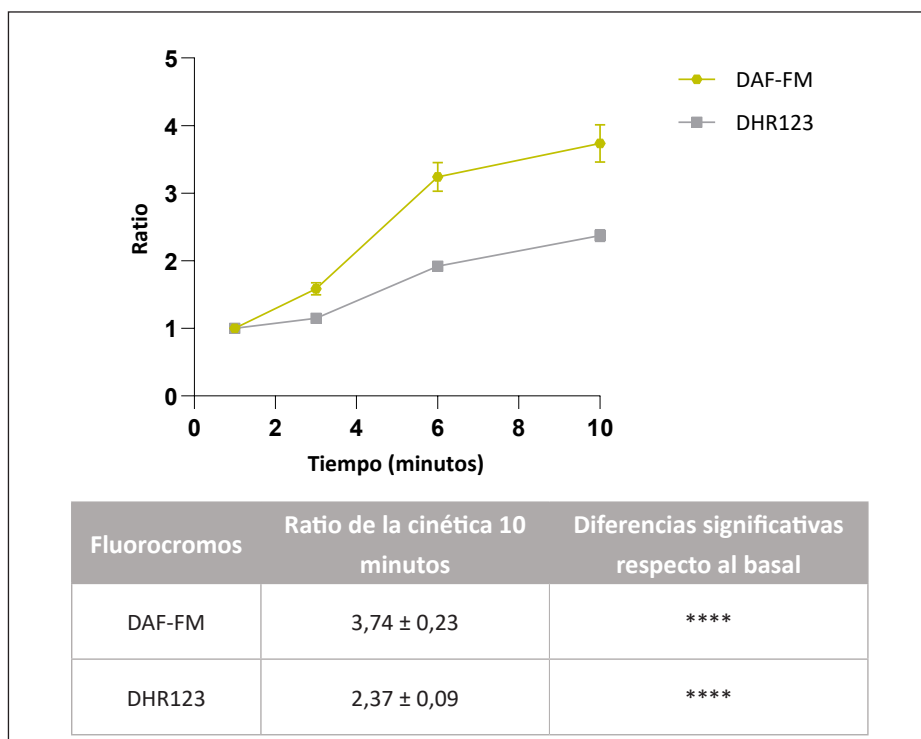


Figura 60: Ratio de los fluorocromos DAF-FM y DHR123 durante la cinética de las células N13 tras la adición de $250 \mu\text{M}$ de NOR-1. Se muestran la media \pm SD de los cocientes de fluorescencia a los 10 minutos de las diferentes sondas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

4. Interferencias de sustratos fluorogénicos entre sí y con el sistema biológico en ensayos multiparamétricos de estrés oxidativo por CMF y RT-FCM

La capacidad de análisis multiparamétrico es una de las ventajas más importantes de la CMF. Para aprovechar las posibilidades de detección múltiple de fluorescencias que permiten los citómetros de flujo, se evalúa la posibilidad de combinación de sustratos fluorogénicos indicadores de estrés oxidativo en las líneas celulares Jurkat y N13. Al desarrollar los ensayos se han encontrado discrepancias entre las respuestas de los fluorocromos solos y en combinación, que sugerían interferencias bioquímicas de las sondas entre sí y/o con el metabolismo de ROS. Así, los resultados de las sondas fluorescentes individuales responden como se esperaba a la adición de compuestos prooxidantes como se ha visto en los apartados 2 y 3 de esta Tesis Doctoral. No obstante, los mismos sustratos, si se combinan con otros compatibles espectralmente, muestran importantes aumentos o reducciones en la tasa de generación de fluorescencia inducida por el mismo prooxidante. Las parejas de sustratos fluorogénicos que se han podido comparar, por su compatibilidad espectral, son:

- Sustrato de localización citosólica DHDCF con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial DHR123 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización mitocondrial MitoPY1 con HE y MitoSox Red.
- Sustrato de localización citosólica HE con DHDCF, DHR123 y MitoPY1.
- Sustrato de localización mitocondrial MitoSox Red con DHDCF, DHR123 y MitoPY1.

4.1. Efecto de H₂O₂ sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

Para estudiar la interacción de las sondas cuando las células son expuestas a H₂O₂, en los ensayos a tiempo final, se emplea la dosis más alta probada, 1000 µM. La comparación entre los cocientes de fluorescencia de los fluorocromos individuales y por parejas, en dichas condiciones de generación de H₂O₂ se muestra en Tabla 14. Se puede observar, en la comparación por parejas diversas interacciones, evidenciadas por diferencias estadísticamente significativas entre los aumentos de fluorescencia

de cada fluorocromo individual o en presencia de su correspondiente pareja.

Tabla 14: Resumen de los cocientes de fluorescencia de las fluorocromos solos y combinados.

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
DCF			
DCF	3,40 \pm 0,14		
DCF combinado con HE	3,44 \pm 0,28	0,9721	=
DCF combinado con MitoSox Red	2,89 \pm 0,24	0,0558	=
DHR123			
DHR123	3,53 \pm 0,13		
DHR123 combinado con HE	1,61 \pm 0,04	<0,0001	Disminución
DHR123 combinado con MitoSox Red	1,67 \pm 0,09	<0,0001	Disminución
MitoPY1			
MitoPY1	6,32 \pm 0,46		
MitoPY1 combinado con HE	3,99 \pm 0,15	0,0002	Disminución
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	4,92 \pm 0,27	0,0032	Disminución
HE			
HE	1,65 \pm 0,04		
HE combinado con DCF	1,38 \pm 0,05	<0,0001	Disminución
HE combinado con DHR123	1,37 \pm 0,01	<0,0001	Disminución
HE combinado con MitoPY1	1,14 \pm 0,02	<0,0001	Disminución
MitoSox Red			
MitoSox Red	1,87 \pm 0,09		
MitoSox Red combinado de DCF	1,34 \pm 0,11	0,0006	Disminución
MitoSox Red combinado de DHR123	1,33 \pm 0,13	0,0005	Disminución
MitoSox Red combinado de MitoPY1	1,09 \pm 0,07	<0,0001	Disminución

Resultados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del estudio de los sustratos fluorogénicos de forma individual, MitoPY1 es la sonda más adecuada para medir los niveles intracelulares de H_2O_2 . Su combinación con sondas compatibles espectralmente como HE y MitoSox Red provoca un descenso del cociente de fluorescencia de MitoPY1 (Figura 61A), más pronunciada para la combinación con HE. Lo mismo sucede con DHR123, con una disminución del cociente. En cambio, con el fluorocromo DHDCF, no hay diferencias significativas cuando DHDCF se combina con HE o MitoSox Red (Figura 61B). DHR123, HE y MitoSox Red se comportan de forma similar cuando se encuentran en combinación con sus respectivas parejas, con una bajada de los cocientes.

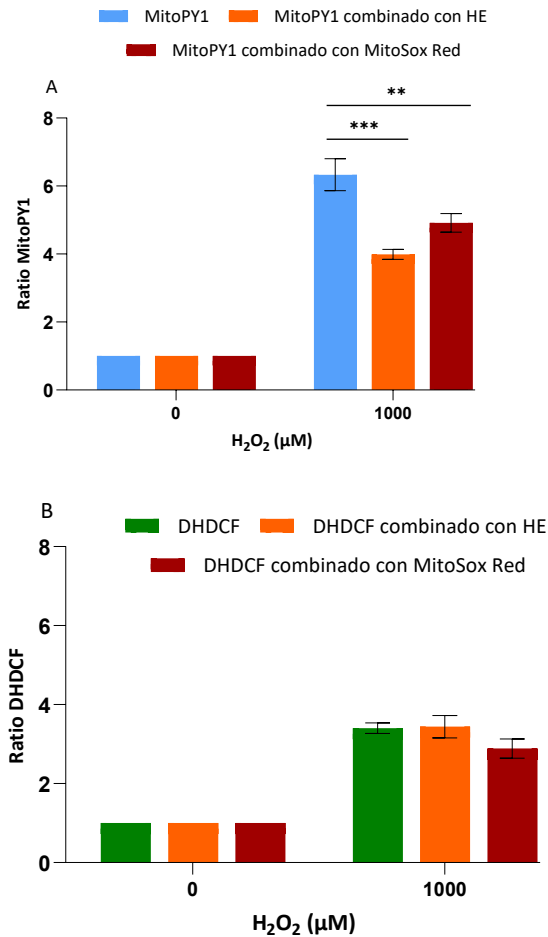


Figura 61: Ratio de los fluorocromos (A) MitoPY1 y (B) DHDCF solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 1000 μM de H_2O_2 . Los resultados son 200

la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

En los ensayos multiparamétricos en tiempo real en las células N13 (Figura 62) inducidas con H₂O₂ exógeno no se observan diferencias significativas en los sustratos fluorogénicos al combinarlos salvo en HE, a diferencia de los que sucede en los ensayos a tiempo final (Tabla 14).

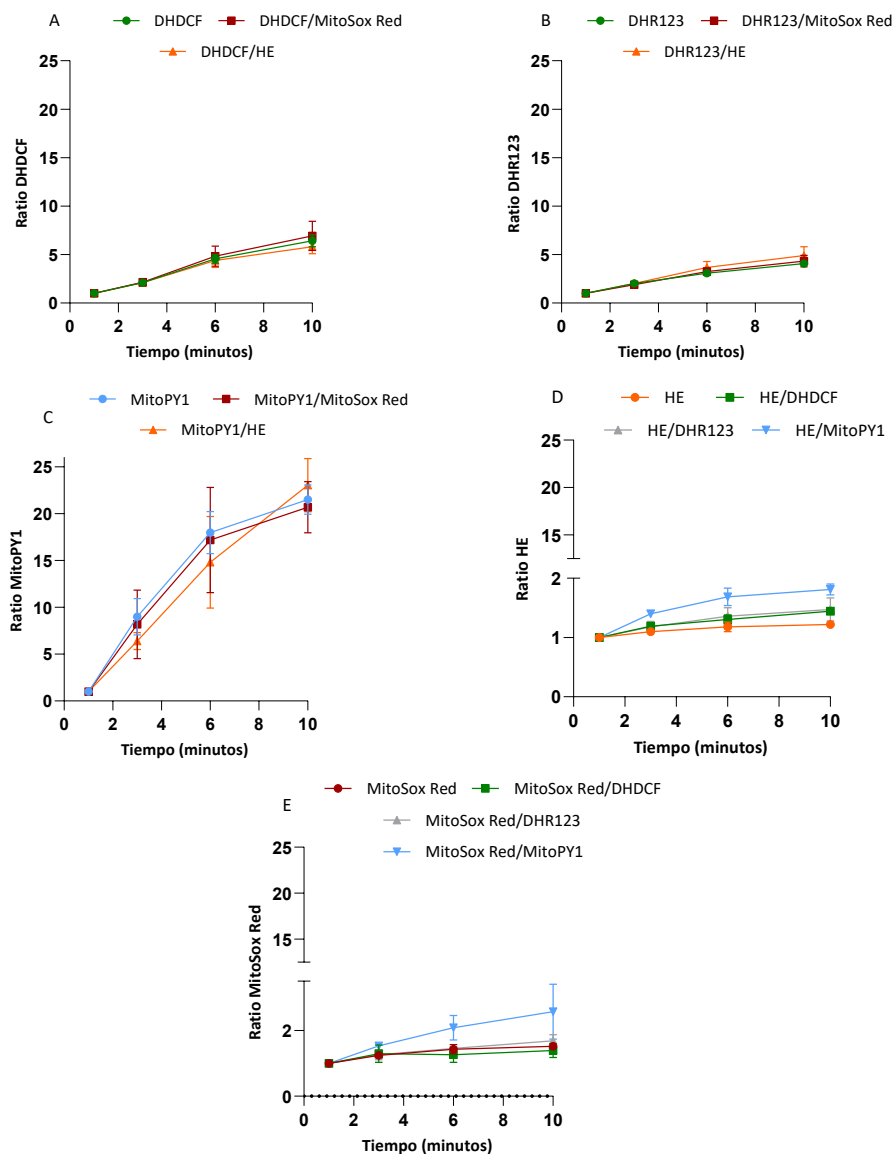


Figura 62: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red

Resultados

solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 44 mM de H₂O₂. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

La sonda HE muestra diferencias en los cocientes de fluorescencia sola y al combinarla con MitoPY1 en los diferentes tiempos estudiados. Como se muestra en la Tabla 15, existe un incremento de los cocientes de HE.

Tabla 15: Resumen de los cocientes de fluorescencia de las fluorocromos solos y combinados.

Fluorocromos	T1		T2		T3	
	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor
HE	1,10 \pm 0,04		1,18 \pm 0,08		1,22 \pm 0,04	
HE combinado con MitoPY1	1,40 \pm 0,01	0,001	1,69 \pm 0,15	0,004	1,81 \pm 0,09	0,001

4.2. Efecto de t-BOOH sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

En la Tabla 16 se muestra la comparación de los sustratos fluorogénicos solos y en combinación en presencia de 1000 μ M de t-BOOH. La sonda que mayor respuesta generan tras la incubación de este xenobiótico es DHDCF, cuyo cociente es 32,29 \pm 0,84, pero la combinación tanto con HE como MitoSox Red provoca una drástica disminución de los cocientes hasta valores de 5,00 \pm 0,34 y 6,13 \pm 0,51 respectivamente (Figura 63A). Un comportamiento similar se observa en el fluorocromo DHR123, cuyo cociente baja de valores de 23,97 \pm 2,17 a 8,28 \pm 0,27 al combinar la sonda junto con HE. En cambio, en pareja con MitoSox Red no hay diferencias significativas en el cociente de DHR123 (Figura 63B).

Tabla 16: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
DCF			
DCF	32,29 \pm 0,84		
DCF combinado con HE	5,00 \pm 0,34	<0,0001	Disminución
DCF combinado con MitoSox Red	6,13 \pm 0,51	<0,0001	Disminución
DHR123			
DHR123	23,97 \pm 2,17		
DHR123 combinado con HE	8,28 \pm 0,27	<0,0001	Disminución
DHR123 combinado con MitoSox Red	21,00 \pm 0,71	0,0583	=
MitoPY1			
MitoPY1	3,07 \pm 0,16		
MitoPY1 combinado con HE	1,59 \pm 0,02	<0,0001	Disminución
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	1,52 \pm 0,14	<0,0001	Disminución
HE			
HE	4,04 \pm 0,17		
HE combinado con DCF	2,83 \pm 0,36	0,0010	Disminución
HE combinado con DHR123	2,50 \pm 0,07	0,0002	Disminución
HE combinado con MitoPY1	4,07 \pm 0,31	0,9968	=
MitoSox Red			
MitoSox Red	3,21 \pm 0,06		
MitoSox Red combinado de DCF	2,34 \pm 0,07	0,2997	=
MitoSox Red combinado de DHR123	6,27 \pm 0,55	<0,0001	Incremento
MitoSox Red combinado de MitoPY1	3,01 \pm 0,18	0,9590	=

Resultados

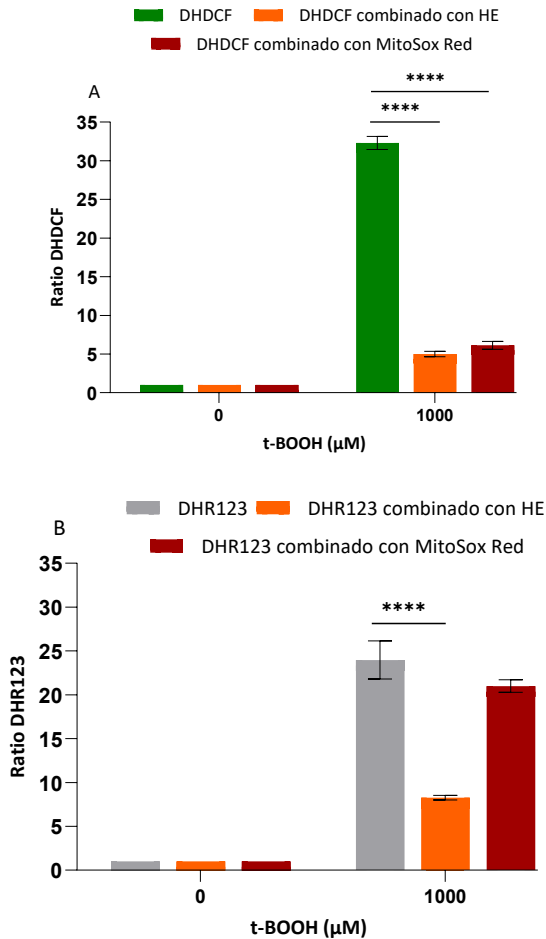


Figura 63: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF y (B) DHR123 solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 1000 μM de t-BOOH. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

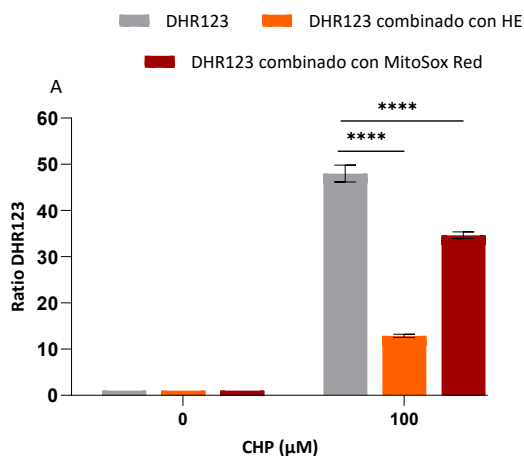
El análisis de la sonda fluorescente MitoPY1 muestra la disminución significativa de su cociente al combinar con HE y MitoSox Red. Con respecto al fluorocromo de localización mitocondrial MitoSox Red hay que destacar el efecto en el aumento de su cociente de fluorescencia con valores de $6,27 \pm 0,55$ cuando se combina con otra sonda mitocondrial como DHR123. Por otro lado, el cociente de MitoSox Red no cambia si se encuentra en pareja con DHDCF o MitoPY1. La sonda HE también disminuye su cociente al combinar con DHDCF y DHR123, pero se mantiene sus

valores en pareja con MitoPY1.

4.3. Efecto de CHP sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

El estudio de las interacciones entre sondas fluorescentes de estrés oxidativo en la línea celular Jurkat en presencia de CHP genera variaciones complejas. DHR123 es el fluorocromo que presenta un mayor aumento de cociente en las células tratadas con CHP con valores de $47,99 \pm 1,83$. La combinación con MitoSox Red ($34,64 \pm 0,74$) disminuye significativamente su cociente de fluorescencia, pero dicha bajada se acentúa al combinar con HE ($12,89 \pm 0,34$) (Figura 64A). El mismo patrón de comportamiento se refleja en los cocientes de DHDCF en presencia de HE o MitoSox Red, con un mayor descenso de ratio al combinar con HE. En cambio, con MitoPY1, la bajada de los valores del cociente de la sonda es mayor con MitoSox Red que con HE.

Con MitoSox las discrepancias entre los resultados de las sondas individuales y al combinarlas se observan solamente con DHR123, que se manifiesta en un aumento significativa del cociente de MitoSox Red (Figura 64B). En cuanto al fluorocromo HE, hay una disminución significativa en presencia de MitoPY1 y DHDCF pero no existe variación del ratio con DHR123.



Resultados

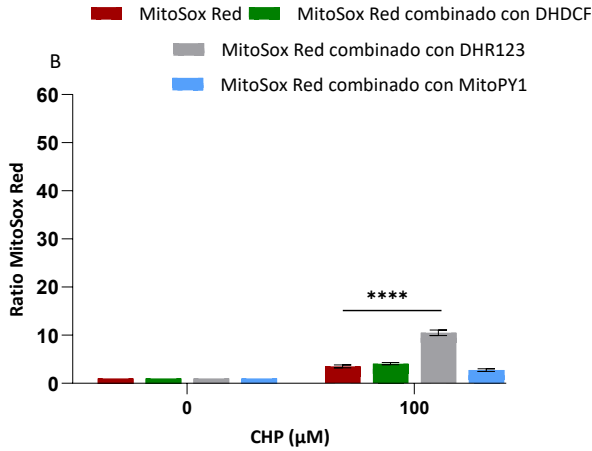


Figura 64: Ratio de los fluorocromos (A) DHR123 y (B) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 100 μM de CHP. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

En la Tabla 17 se muestran los cocientes de fluorescencia de los sustratos fluorogénicos solos o combinados cuando las células Jurkat se incuban con CHP.

Tabla 17: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Ratio de los fluorocromos	μ ± SD	p-valor	Incremento/ Disminución
DCF			
DCF	11,55 ± 0,84		
DCF combinado con HE	4,52 ± 0,73	<0,0001	Disminución
DCF combinado con MitoSox Red	7,60 ± 0,68	0,0012	Disminución
DHR123			
DHR123	47,99 ± 1,83		
DHR123 combinado con HE	12,89 ± 0,34	<0,0001	Disminución
DHR123 combinado con MitoSox Red	34,64 ± 0,74	<0,0001	Disminución

Tabla 17: (continuación).

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
MitoPY1			
MitoPY1	3,71 \pm 0,10		
MitoPY1 combinado con HE	2,14 \pm 0,12	<0,0001	Disminución
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	1,60 \pm 0,05	<0,0001	Disminución
HE			
HE	3,57 \pm 0,50		
HE combinado con DCF	2,51 \pm 0,27	0,0071	Disminución
HE combinado con DHR123	3,08 \pm 0,12	0,1940	=
HE combinado con MitoPY1	2,35 \pm 0,18	0,0031	Disminución
MitoSox Red			
MitoSox Red	3,51 \pm 0,29		
MitoSox Red combinado de DCF	4,09 \pm 0,22	0,1984	=
MitoSox Red combinado de DHR123	10,51 \pm 0,58	<0,0001	Incremento
MitoSox Red combinado de MitoPY1	2,75 \pm 0,26	0,0789	=

Los experimentos en tiempo real con el xenobiótico CHP no muestran diferencias significativas de los cociente de fluorescencia de las sondas en los ensayos multiparamétricos (Figura 65).

Resultados

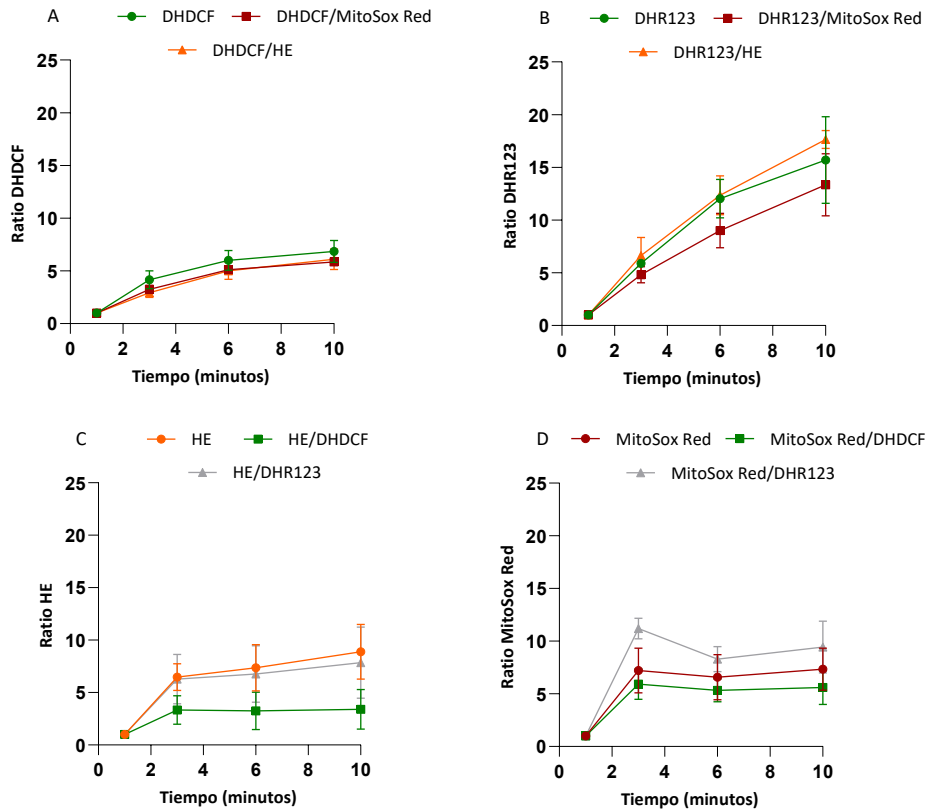


Figura 65: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 26,3 mM de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

4.4. Efecto de menadiona sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

Para examinar las interacciones de las sondas solas y por parejas con el compuesto menadiona se emplea la concentración de 50 μ M. En el análisis del cociente de fluorescencia de DHDCF en combinación con HE no se observa variación en su cociente. Por otro lado, en presencia de MitoSox Red hay una bajada en los valores de ratio de DHDCF. Con el fluorocromo DHR123 hay una reducción de los valores de fluorescencia de la sonda cuando se encuentra en combinación con HE y MitoSox Red. En cambio, MitoPY1 no muestra diferencias significativas de su cociente en presencia de MitoSox Red o de HE. Para el fluorocromo HE, específico para medir

los niveles citoplasmáticos de O_2^- , la combinación con DHR123 no produce cambio en el cociente de HE. Pero cuando se combinan en un mismo ensayo los sustratos fluorogénicos HE y DHDCF o HE y MitoPY1 genera una disminución del cociente de HE en ambos casos. Por otro lado, la sonda MitoSox Red es la que genera mayor respuesta al tratar con menadiona. La combinación con sondas mitocondriales, DHR123 y MitoPY1, no varía su cociente, pero en presencia de DCF, sonda citosólica, hay una disminución significativa de la fluorescencia.

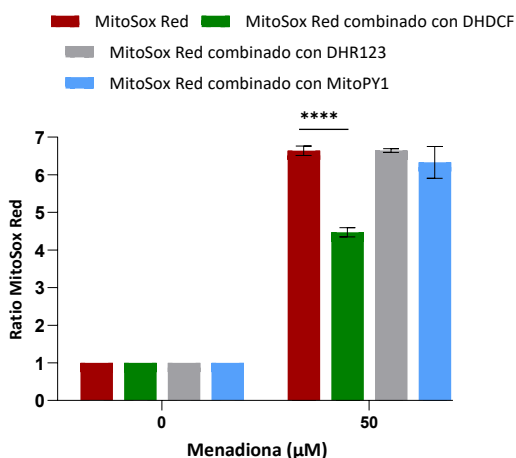


Figura 66: Ratio del fluorocromo MitoSox Red solo o combinado con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 50 μ M de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

En la Tabla 18 se resumen las interacciones de los diferentes sustratos fluorogénicos tras la incubación de las células Jurkat con menadiona.

Tabla 18: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
DCF			
DCF	2,41 \pm 0,25		
DCF combinado con HE	2,61 \pm 0,31	0,5142	=
DCF combinado con MitoSox Red	1,60 \pm 0,02	0,0088	Disminución

Resultados

Tabla 18: (continuación).

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
DHR123			
DHR123	6,63 \pm 0,10		
DHR123 combinado con HE	5,50 \pm 0,25	0,0010	Disminución
DHR123 combinado con MitoSox Red	4,10 \pm 0,24	<0,0001	Disminución
MitoPY1			
MitoPY1	2,92 \pm 0,05		
MitoPY1 combinado con HE	3,25 \pm 0,13	0,0678	=
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	2,66 \pm 0,23	0,1367	=
HE			
HE	4,38 \pm 0,40		
HE combinado con DCF	2,59 \pm 0,35	0,0004	Disminución
HE combinado con DHR123	3,80 \pm 0,36	0,1437	=
HE combinado con MitoPY1	3,03 \pm 0,16	0,0026	Disminución
MitoSox Red			
MitoSox Red	6,64 \pm 0,13		
MitoSox Red combinado de DCF	4,47 \pm 0,04	<0,0001	Disminución
MitoSox Red combinado de DHR123	6,64 \pm 0,04	0,9999	=
MitoSox Red combinado de MitoPY1	6,33 \pm 0,40	0,3003	=

4.5. Efecto de plumbagina sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

Las suspensiones celulares son incubadas con plumbagina, un dador de $O_2^{\cdot -}$, con la concentración máxima probada de 50 μ M. La comparación entre los niveles de fluorescencia de los fluorocromos individuales y por parejas, en dichas condiciones experimentales, se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Ratio de los fluorocromos	$\mu \pm SD$	p-valor	Incremento/ Disminución
DCF			
DCF	3,46 \pm 0,52		
DCF combinado con HE	2,84 \pm 0,97	0,4795	=
DCF combinado con MitoSox Red	2,41 \pm 0,42	0,1793	=
DHR123			
DHR123	4,73 \pm 0,32		
DHR123 combinado con HE	5,97 \pm 0,60	0,0299	Incremento
DHR123 combinado con MitoSox Red	6,01 \pm 0,44	0,0266	Incremento
MitoPY1			
MitoPY1	1,63 \pm 0,04		
MitoPY1 combinado con HE	1,73 \pm 0,24	0,6213	=
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	1,10 \pm 0,03	0,0067	Disminución
HE			
HE	23,76 \pm 3,38		
HE combinado con DCF	17,79 \pm 0,65	0,0160	Disminución
HE combinado con DHR123	20,83 \pm 1,04	0,2426	=
HE combinado con MitoPY1	16,00 \pm 1,73	0,0036	Disminución
MitoSox Red			
MitoSox Red	9,76 \pm 0,21		
MitoSox Red combinado de DCF	13,65 \pm 1,88	0,0099	Incremento
MitoSox Red combinado de DHR123	15,73 \pm 1,38	0,0007	Incremento
MitoSox Red combinado de MitoPY1	7,57 \pm 0,40	0,1242	=

La comparación de los ratios de DHDCF sola o con sus respectivas parejas compatibles, HE y MitoSox Red, no muestra diferencias significativas en los cocientes de DHDCF. Al igual que sucede en los cocientes de MitoPY1 en su combinación

Resultados

con HE. No obstante, la pareja de sondas MitoPY1 con MitoSox Red provoca una disminución de los valores de fluorescencia de MitoPY1. Por otro lado, los cocientes de fluorescencia de DHR123 se ve aumentada al combinar con HE y MitoSox Red.

Analizando el cociente del fluorocromo HE (Figura 67) se refleja variación de su cociente al estar en combinación con MitoPY1 y DHDCF. En cambio, la combinación con DHR123, no provoca cambios en su cociente de fluorescencia. Con MitoSox Red no hay cambios significativos en combinar con MitoPY1, pero con DCF y DHR123 se observa un incremento del cociente de MitoSox Red.

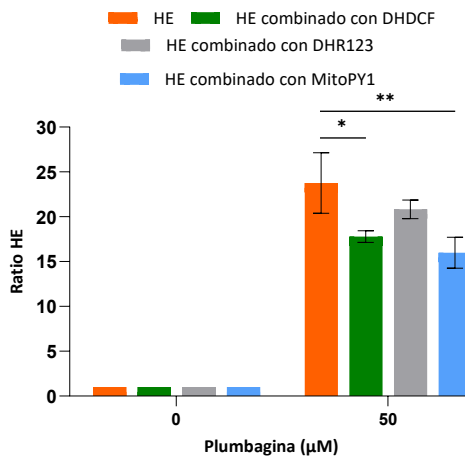


Figura 67: Ratio del fluorocromo HE solo o combinado con sus parejas espectralmente compatibles en las células Jurkat expuestas a 50 µM de plumbagina. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

Los ensayos cinéticos con el xenobiótico plumbagina muestran discrepancias significativas entre los cocientes de los sustratos fluorogénicos como se muestra en la Tabla 20. La combinación de HE o MitoSox Red con DHDCF genera una disminución del cociente de DHDCF en los diferentes tiempos analizados durante la cinética. Al igual que sucede en los ensayos a tiempo final en la pareja de sondas formada por MitoPY1 y MitoSox Red, el cociente de MitoPY1 disminuye significativamente (Tabla 19). El ligero aumento que refleja el cociente de la sonda HE desaparece al combinarla con DHDCF, DHR123 o MitoPY1 a cocientes cercanos a 1. Dicha disminución, pero menos pronunciada se observa en el ratio de MitoSox Red cuando se encuentra junto a DHDCF o MitoPY1

Tabla 20: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Fluorocromos	T1		T2		T3	
	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor
DHDCF	1,91 \pm 0,10		2,30 \pm 0,15		2,42 \pm 0,14	
DHDCF combinado con HE	1,61 \pm 0,04	0,010	1,96 \pm 0,13	0,062	2,05 \pm 0,11	0,037
DHDCF combinado con MitoSox Red	1,62 \pm 0,04	0,009	1,93 \pm 0,12	0,046	2,02 \pm 0,13	0,026
MitoPY1	1,40 \pm 0,05		1,87 \pm 0,11		1,94 \pm 0,05	
MitoPY1 combinado con MitoSox Red	1,30 \pm 0,10	0,362	1,57 \pm 0,10	0,039	1,72 \pm 0,10	0,024
HE	1,41 \pm 0,14		1,69 \pm 0,15		2,00 \pm 0,10	
HE combinado con DHDCF	1,02 \pm 0,07	0,003	1,25 \pm 0,12	0,012	1,60 \pm 0,22	0,092
HE combinado con DHR123	1,09 \pm 0,06	0,011	1,34 \pm 0,11	0,048	1,73 \pm 0,17	0,413
HE combinado con MitoPY1	1,02 \pm 0,03	0,003	1,08 \pm 0,10	0,002	1,26 \pm 0,10	0,003
MitoSox Red	1,77 \pm 0,09		2,15 \pm 0,10		2,40 \pm 0,08	
MitoSox Red combinado con DHDCF	1,30 \pm 0,10	0,031	1,55 \pm 0,16	0,009	1,77 \pm 0,19	0,003
MitoSox Red combinado con MitoPY1	1,54 \pm 0,05	0,568	1,64 \pm 0,10	0,023	1,94 \pm 0,16	0,02

Resultados

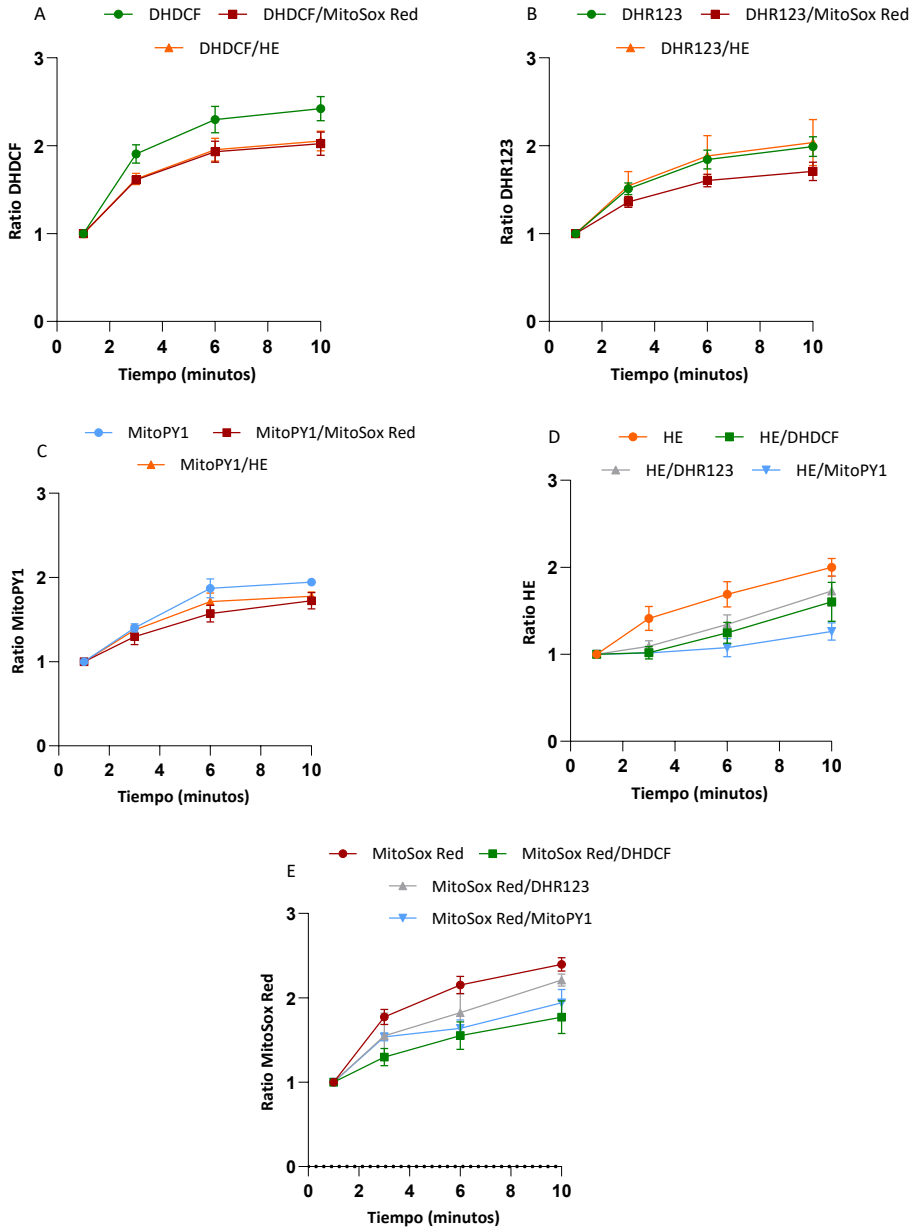


Figura 68: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) MitoPY1, (D) HE y (E) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 0,19 mM de plumbagina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

4.6. Efecto de propranolol sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

El estudio de las interacciones entre las sondas con el xenobiótico propranolol se muestran en la Figura 69. Los cocientes de los fluorocromos DHDCF y DHR123 no muestran variaciones al combinar con HE o MitoSox Red. Por otro lado, HE y MitoSox Red presentan diferencias significativas en sus cocientes de fluorescencia al combinar con DHDCF o DHR123 pero no en todos los tiempos analizados de la cinética.

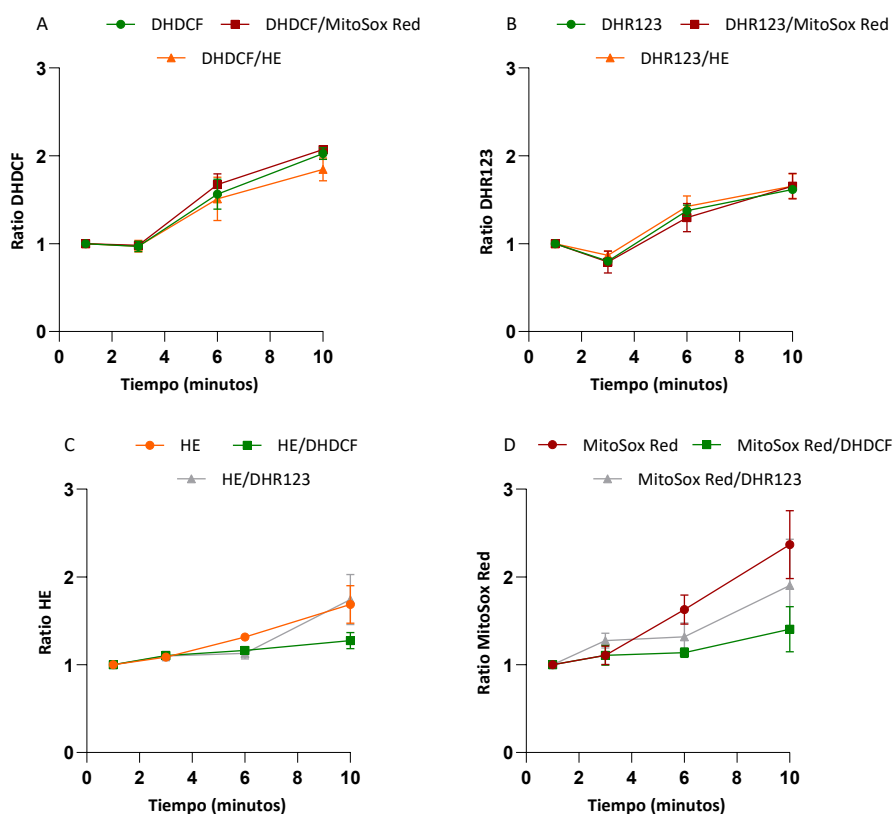


Figura 69: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 5 mM de propranolol. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Resultados

Tabla 21: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Fluorocromos	T1		T2		T3	
	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor
HE	1,09 \pm 0,02		1,32 \pm 0,03		1,69 \pm 0,22	
HE combinado con DHDCF	1,10 \pm 0,02	1	1,16 \pm 0,04	0,019	1,28 \pm 0,09	0,167
HE combinado con DHR123	1,10 \pm 0,05	1	1,13 \pm 0,06	0,008	1,74 \pm 0,28	1
MitoSox Red	1,11 \pm 0,10		1,63 \pm 0,17		2,37 \pm 0,39	
MitoSox Red combinado con DHDCF	1,11 \pm 0,11	1	1,14 \pm 0,06	0,0013	1,40 \pm 0,26	0,081
MitoSox Red combinado con DHR123	1,28 \pm 0,09	0,258	1,32 \pm 0,16	0,095	1,90 \pm 0,53	0,629

4.7. Efecto de epinefrina sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

Los ensayos cinéticos tras la adición de epinefrina en las células N13 se representan en la Figura 70. No hay cambios significativos entre los cocientes de fluorescencias de los sustratos fluorogénicos solos o combinados. Solo hay una disminución de los cocientes de MitoSox Red en pareja con DHDCF o DHR123 con valores en torno a 1 (Tabla 22).

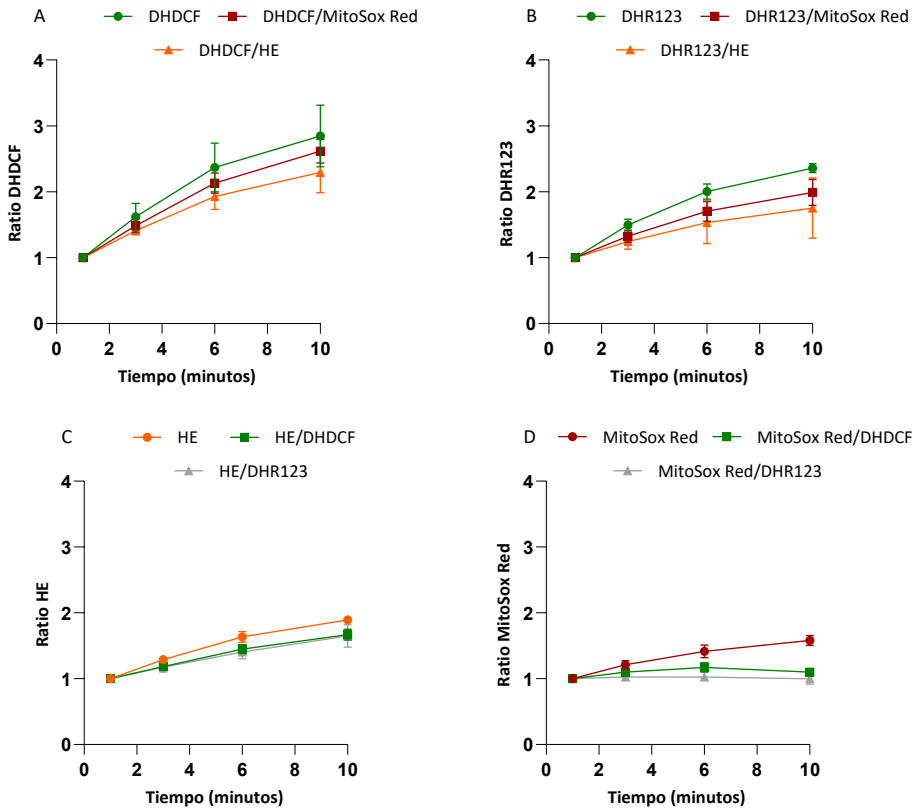


Figura 70: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 19 mM de epinefrina. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Tabla 22: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Fluorocromos	T1		T2		T3	
	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor
MitoSox Red	1,21 \pm 0,06		1,42 \pm 0,09		1,58 \pm 0,08	
MitoSox Red combinado con DHDCF	1,10, \pm 0,01	0,079	1,17 \pm 0,07	0,021	1,10 \pm 0,01	0,000311
MitoSox Red combinado con DHR123	1,02 \pm 0,05	0,008	1,02 \pm 0,05	0,002	1,00 \pm 0,08	0,000105

4.8. Efecto de FCCP sobre la interacción entre sustratos fluorogénicos indicadores de ROS

El estudio de las interacciones entre los sustratos fluorogénicos con FCCP se observa en la Figura 71. Los cocientes de los fluorocromos DHDCF y DHR123 no muestran variaciones al combinar con HE o MitoSox Red. En cambio, al igual que sucede con propranolol (Tabla 21), HE y MitoSox Red exhiben diferencias significativas en sus cocientes de fluorescencia al combinar con DHDCF o DHR123 con cocientes en torno a 1 o incluso menores como en el caso de MitoSox Red.

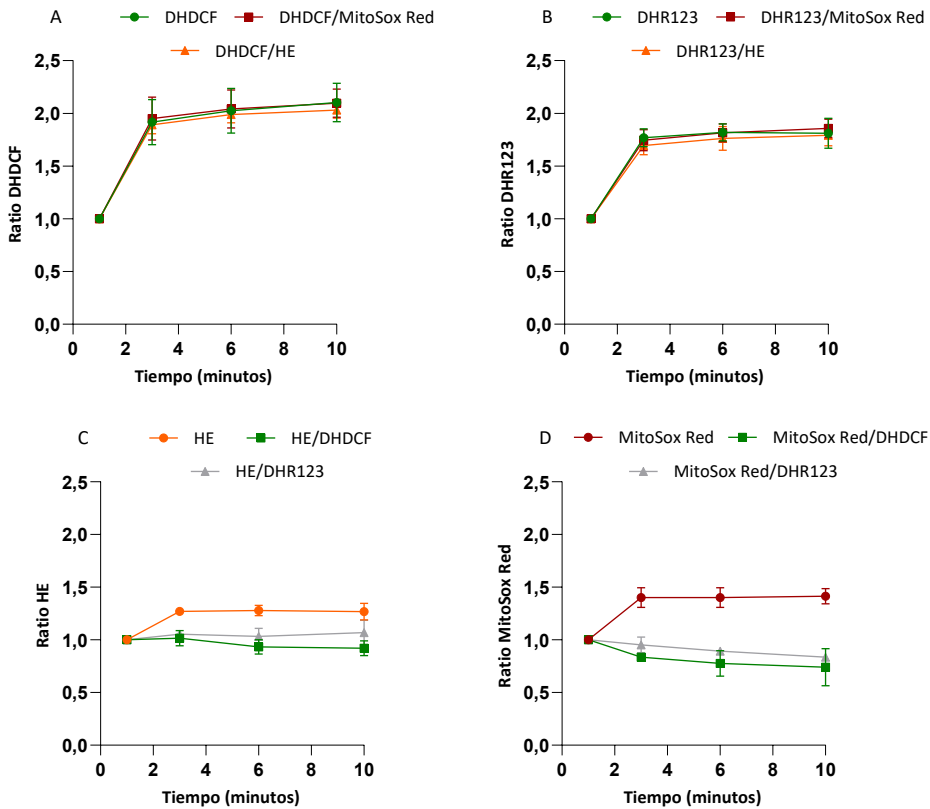


Figura 71: Ratio de los fluorocromos (A) DHDCF, (B) DHR123, (C) HE y (D) MitoSox Red solos o combinados con sus parejas espectralmente compatibles en las células N13 en ensayos cinéticos, expuestas a 50 μ M de FCCP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

Tabla 23: Resumen de los ratios de las fluorocromos solos y combinados.

Fluorocromos	T1		T2		T3	
	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor	$\mu \pm SD$	p-valor
HE	1,27 \pm 0,03		1,28 \pm 0,05		1,27 \pm 0,08	
HE combinado con DHDCF	1,02 \pm 0,07	0,002	0,93 \pm 0,07	0,002	0,92 \pm 0,07	0,01
HE combinado con DHR123	1,05 \pm 0,02	0,004	1,03 \pm 0,08	0,011	1,07 \pm 0,12	0,109
MitoSox Red	1,40 \pm 0,09		1,40 \pm 0,09		1,41 \pm 0,07	
MitoSox Red combinado con DHDCF	0,84 \pm 0,02	0,000186	0,78 \pm 0,12	0,000416	0,74 \pm 0,18	0,001
MitoSox Red combinado con DHR123	0,95 \pm 0,07	0,001	0,89 \pm 0,02	0,001	0,83 \pm 0,03	0,002

5. Análisis por CMF de biosensores bacterianos para detectar el estrés oxidativo mediante el uso de cepas bacterianas deficientes en genes de la defensa antioxidante

Nuestro laboratorio dispone de una colección de cepas isogénicas derivadas de *E. coli* B *uvrA* que son deficientes en diversas vías de la respuesta antioxidante. *E. coli* B es una cepa muy utilizada en estudios toxicológicos y recomendada en estudios de test de mutagenicidad. Esta cepa presenta una permeabilidad incrementada frente a compuestos xenobióticos que, en muchos casos, tienen estructuras químicas similares a las de las sondas fluorescentes empleadas habitualmente en estudios citométricos.

Como se ha descrito en la Introducción, el sistema de defensa antioxidante bacteriano de *E. coli* presenta dos regulones importantes, *OxyR* y *SoxRS*, empleados para hacer frente al estrés oxidativo inducido por la respiración o las agresiones ambientales. Las bacterias sirven como organismos modelo que permiten la identificación y la

Resultados

caracterización de respuestas de estrés redox debido a la facilidad de manipulación genética junto con la flexibilidad en las condiciones de crecimiento. Para ello se estudia el efecto que la introducción de mutaciones en los genes *oxyR*, *sodA* y *sodB* tiene sobre la generación de radicales libres cuando las bacterias se someten a diferentes prooxidantes.

5.1. Análisis de los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano

En la Tabla 24 se compara la sensibilidad al estrés oxidativo de la cepa salvaje y las diferentes cepas mutantes. El regulón OxyR es el regulador transcripcional para la expresión de genes antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo, en particular, los niveles elevados de H_2O_2 . Los fenotipos de la cepa IC203 e IC5233, deficientes en el gen *oxyR*, se caracterizan por una extremada sensibilidad al H_2O_2 y al CHP. Cuando se expone a las bacterias a oxidantes como el t-BOOH, muestra una mayor inhibición del crecimiento la cepa IC203.

El regulón SoxRS contiene un grupo [2Fe-2S] que puede actuar como un sistema de sensor redox que reconoce el $O_2^{\cdot-}$. Se emplea la menadiona para la generación de $O_2^{\cdot-}$ y se muestra que la cepa IC5233, deficiente en los genes *oxyR* y *soxRS*, presenta la mayor sensibilidad de inhibición para dicho compuesto. Asimismo, exhiben halos de inhibición la cepa IC203, la cepa IC5228 deficiente en *sodA* y la cepa IC5232, deficiente en *sodAB*.

Tabla 24: Sensibilidad de las diferentes cepas a oxidantes exógenos en el test de inhibición de crecimiento. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Cepas	Halo de inhibición (cm)			
	H_2O_2 (300 μ g/ disco)	t-BOOH (300 μ g/disco)	CHP (300 μ g/ disco)	Menadiona (300 μ g/disco)
IC188	1,77 \pm 0,06	0,63 \pm 0,06	1,97 \pm 0,06	0,87 \pm 0,06
IC203	2,87 \pm 0,12	2,97 \pm 0,25	2,67 \pm 0,06	2,3 \pm 0,1
IC5228	1,77 \pm 0,06	0,67 \pm 0,06	1,97 \pm 0,12	1,53 \pm 0,15
IC5229	1,87 \pm 0,06	0,8 \pm 0,17	2,03 \pm 0,15	0,9 \pm 0,1

Tabla 24: (continuación).

Cepas	Halo de inhibición (cm)			
	H ₂ O ₂ (300µg/ disco)	t-BOOH (300µg/disco)	CHP (300µg/ disco)	Menadiona (300µg/disco)
IC5232	1,83 ± 0,15	0,67 ± 0,06	1,97 ± 0,06	1,93 ± 0,12
IC5233	2,9 ± 0,49	0,67 ± 0,06	2,63 ± 0,15	2,67 ± 0,15

5.2. Evaluación del crecimiento exponencial en las diferentes cepas bacterianas

En otra serie de experimentos, se analiza el crecimiento de las diferentes cepas. La forma más común de evaluar el crecimiento microbiano en solución es la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Las células bacterianas en crecimiento activo aumentan en número al crecer en tamaño y luego subdividirse físicamente. Debido a que su tasa de división es altamente sensible a las condiciones locales, el organismo puede cambiar rápidamente y explotar nuevos recursos a medida que están disponibles.

Las bacterias en la fase exponencial muestran una tasa de crecimiento constante y una actividad metabólica uniforme. Por esta razón, en nuestros experimentos las bacterias se utilizan en esta fase de crecimiento. En la Figura 72 se muestran el aumento de la DO_{600} en función del tiempo de incubación de las diferentes cepas empleadas.

Resultados

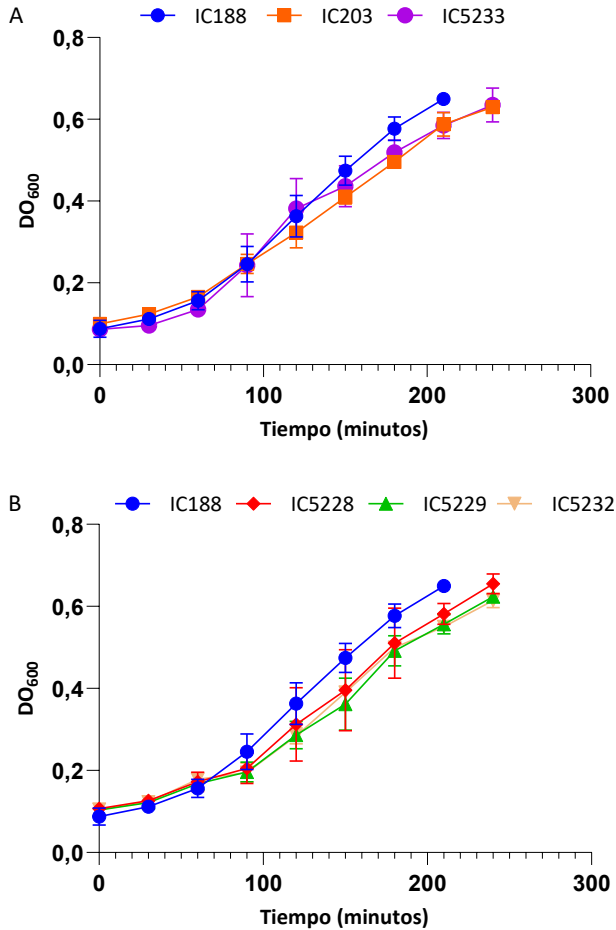


Figura 72: Curvas de crecimiento microbiano de *E. coli* cultivadas a 37°C. (A) DO₆₀₀ obtenida en función del tiempo de las cepas IC188, IC203 e IC5233 y (B) DO₆₀₀ obtenida en función del tiempo de las cepas IC188, IC5228, IC5229 e IC5232. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

El monitoreo del cambio de una población microbiana a lo largo del tiempo da como resultado una curva característica para cada una de las cepas. En comparación con la cepa salvaje, los patrones de crecimiento de las cepas mutadas son menores. La cepa IC188 alcanza la DO₆₀₀ de 0,6 sobre los 200 minutos, en cambio en las cepas deficientes llegan a dichas densidades a los 240 minutos. Dicho retraso en el crecimiento se observa en las cepas deficientes en *oxyR* (IC203 e IC5233) como se refleja en la Figura 72A y en las cepas mutadas en los genes *sodA* y *sodB* (IC5228, IC5229, IC5232) como se muestra en la Figura 72B.

5.3. Análisis de la viabilidad bacteriana por adición de compuestos prooxidantes

5.3.1. Análisis de la viabilidad con PI

Los ensayos de viabilidad bacteriana con PI se utilizan ampliamente para identificar células muertas en una población, ya que penetra solo en células con membranas alteradas y se excluye de las células vivas. Se han utilizado los compuestos prooxidantes H_2O_2 , t-BOOH y CHP para dilucidar su efecto de toxicidad sobre las cepas IC188, IC203 e IC5233.

Como se muestra en la Figura 73, la muerte bacteriana empieza a incrementarse de forma dependiente de la concentración de H_2O_2 . La cepa IC203, en comparación con la cepa salvaje, presenta mayor sensibilidad al ser expuesta a H_2O_2 exógeno, debido a la delección de un gen de defensa antioxidante *oxyR*. Hay que destacar la sensibilidad al H_2O_2 de la cepa IC5233, deficiente en los genes *oxyR*, *sodA* y *sodB*, con un valor de IC_{50} de 847,23 mM.

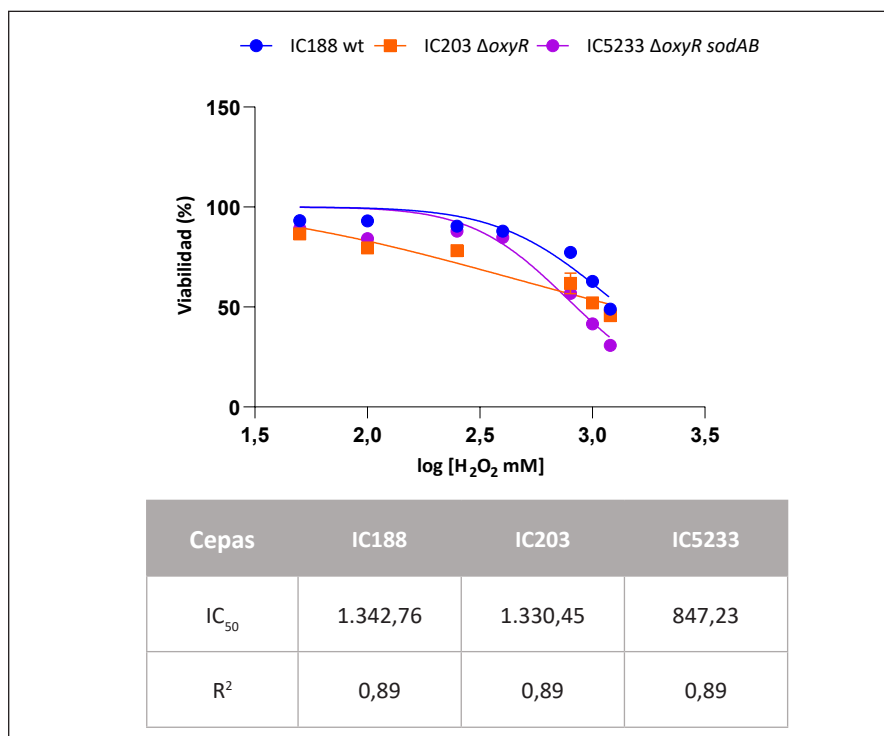


Figura 73: Ensayo de PI para determinar la IC_{50} de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar

Resultados

el efecto de H_2O_2 sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC_{50} y R^2 obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

El t-BOOH produce una disminución de la viabilidad bacteriana al generar especies reactivas y reducir la actividad de las defensas antioxidantes. La cepa IC203 es más sensible a los efectos del t-BOOH con un valor de IC_{50} de 172,98 mM. En cuanto a la cepa IC5233, posee un valor de IC_{50} parecido al mostrado por la cepa IC188, con valores de 199,07 y 201,37 mM respectivamente. (Figura 74).

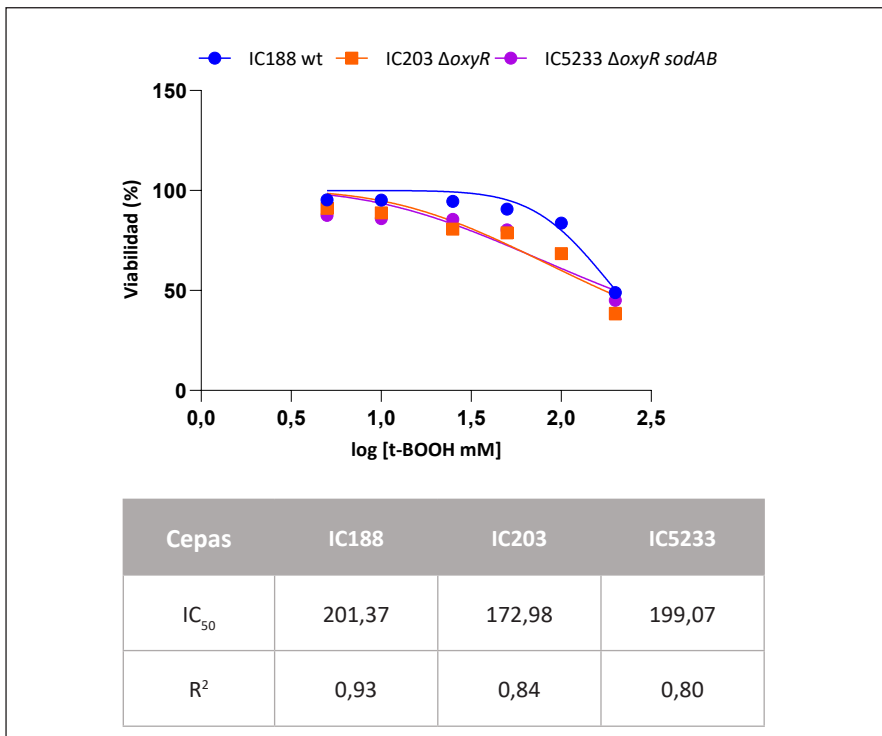


Figura 74: Ensayo de PI para determinar la IC_{50} de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar el efecto de t-BOOH sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC_{50} y R^2 obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Al fijarse en la respuesta bacteriana generada por el CHP en cada una de las cepas se puede observar una disminución de la viabilidad de manera similar en las diferentes concentraciones (Figura 75). Los valores de IC_{50} muestra que la cepa con mayor sensibilidad para el CHP es la cepa IC203, seguida de la IC5233.

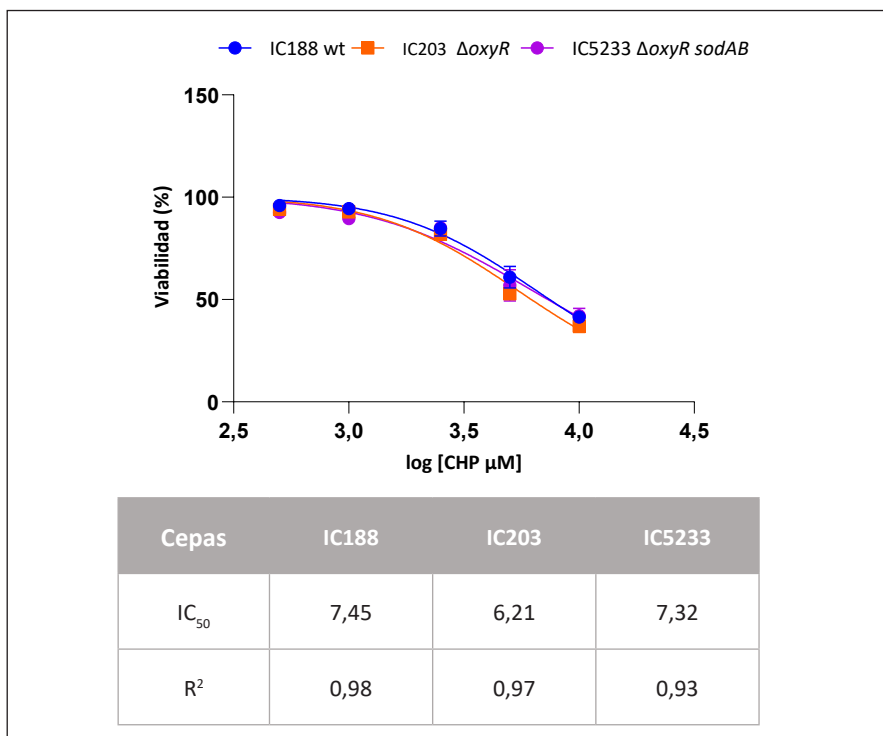


Figura 75: Ensayo de PI para determinar la IC₅₀ de las cepas IC188, IC203 e IC5233 de *E. coli* y analizar el efecto de CHP sobre la viabilidad bacteriana. La curva de respuesta representa el % de viabilidad versus logaritmo de la concentración y se muestran los valores de IC₅₀ y R² obtenidos para cada una de las cepas. Los resultados son la media ± SD (n=3).

Por otra parte, para evaluar el regulón SoxRS, se emplean los compuestos redox cycle, menadiona y paraquat. Debido a que las concentraciones probadas con dichos compuestos no disminuyen la viabilidad con dos fluorocromos de viabilidad diferentes, PI y Helix NP Green, se emplean otros marcadores como Syto9 y DiBAC₄(3) para dilucidar la toxicidad de los compuestos además del conteo de colonias. En la Figura 76A se muestran los resultados de viabilidad de los fluorocromos PI y Helix NP Green de la cepa IC188 tratadas con distintas concentraciones de menadiona. La concentración más alta probada mostrada es de 2,35 mM de menadiona, ya que concentraciones superiores provocan cambio en la morfología de las bacterias. Como se observa en la Figura 76B dicho cambio no se debe al efecto del diluyente de la menadiona, el DMSO.

Resultados

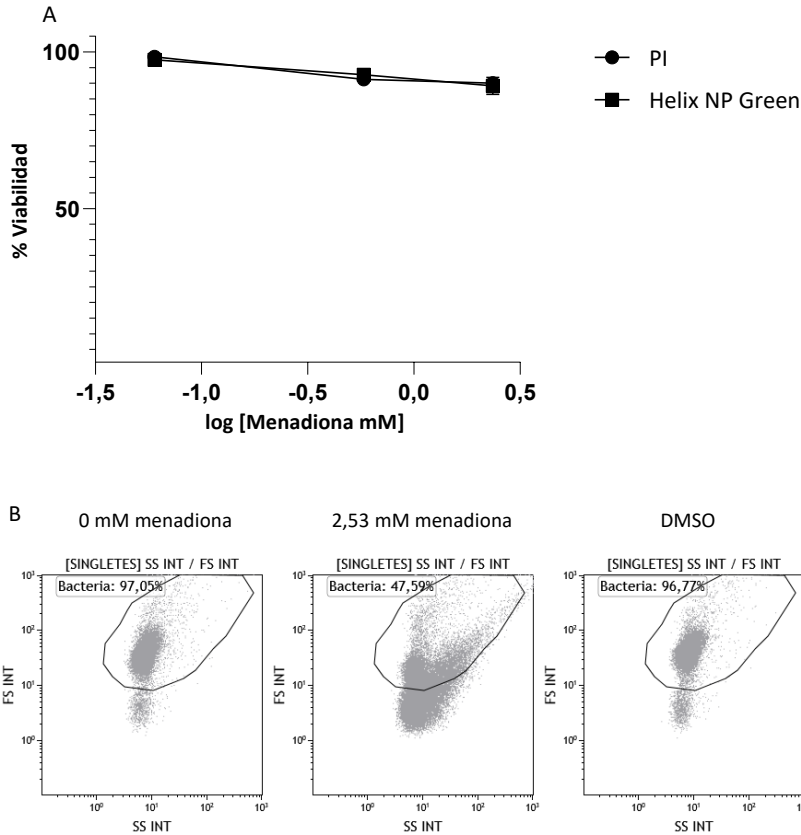


Figura 76: (A) Análisis de la viabilidad con los fluorocromos PI y Helix NP Green de la cepa IC188 tratada con menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). (B) Dot-plot de FSS vs SSC de la cepa IC188 en diferentes condiciones: IC188 sin menadiona, IC188 tratada con 2,53 mM de menadiona e IC188 control de DMSO.

5.3.2. Análisis de la viabilidad por recuento de colonias y densidad óptica

Las técnicas de referencia para evaluar los efectos antibacterianos se basan en la detección de cambios en el número de bacterias o colonias en una muestra a lo largo del tiempo; una UFC puede ser una sola célula bacteriana viable o un grupo que contiene una o más células viables. Se estudian el efecto generado por los compuestos que inducen estrés general, como t-BOOH, y donadores de O_2^- como menadiona y paraquat. Para ello a intervalos regulares, se toman muestras y se realizan mediciones utilizando el recuento de UFC/mL en placas de agar y la DO_{600} .

En la Figura 77A se muestra la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Se aprecia que, a partir de 50 mM de t-BOOH, se produce una detención del crecimiento bacteriano. Por otro lado, la menadiona inhibe el crecimiento de la cepa IC188 a concentraciones de 0,58 mM (Figura 77B).

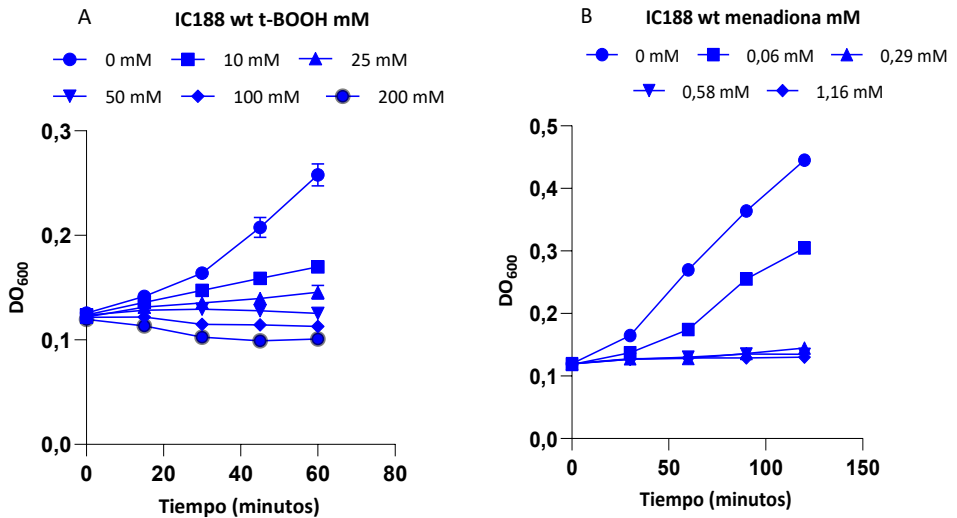


Figura 77: Curvas de crecimiento bacteriano de la cepa IC188 tratada con (A) t-BOOH o (B). Los resultados son la media \pm SD ($n = 3$).

El número de bacterias vivas se puede determinar a través del método de recuento de placas, pero no se puede obtener información directamente sobre los niveles de bacterias muertas. El efecto de t-BOOH sobre la cepa IC188 muestra disminución de UFC/mL en las concentraciones de 100 y 200 mM (Figura 78). Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos a través de la DO_{600} (Figura 77A) y de la viabilidad obtenida con PI (Figura 74).

Resultados

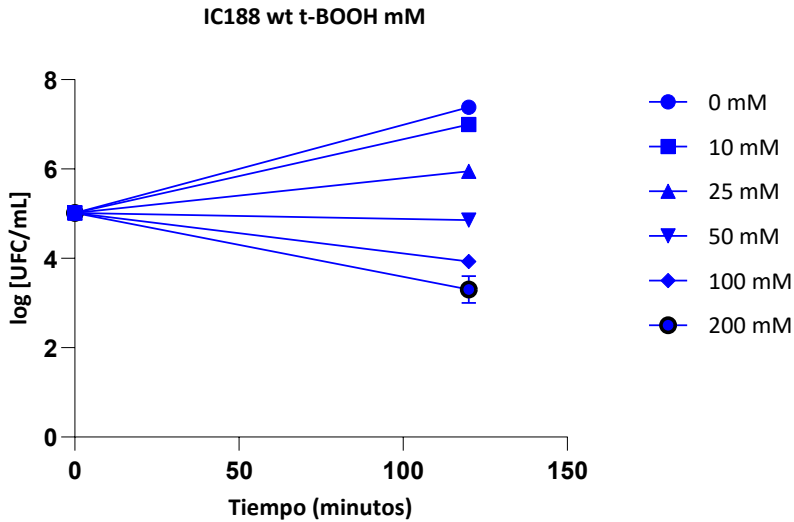


Figura 78: Curva de crecimiento de la cepa IC188 tratada con t-BOOH expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3).

Los ensayos de recuento de colonias para el menadiona se muestran en la Figura 79. El xenobiótico menadiona genera una disminución de las UFC en la cepa deficiente IC5233 en comparación con la cepa wild type. A concentraciones de 0,03 mM de menadiona se observa el efecto sobre la formación de colonias, en cambio, en la cepa IC188 dicho efecto se produce con concentraciones de 0,15 mM del compuesto (Figura 79A y 79B). La cepa IC203 presenta una mayor dificultad al crecimiento en placa como se puede observar atendiendo al número de colonias inicial. Asimismo, los resultados muestran una disminución de la formación de colonias a dosis bajas (Figura 79C).

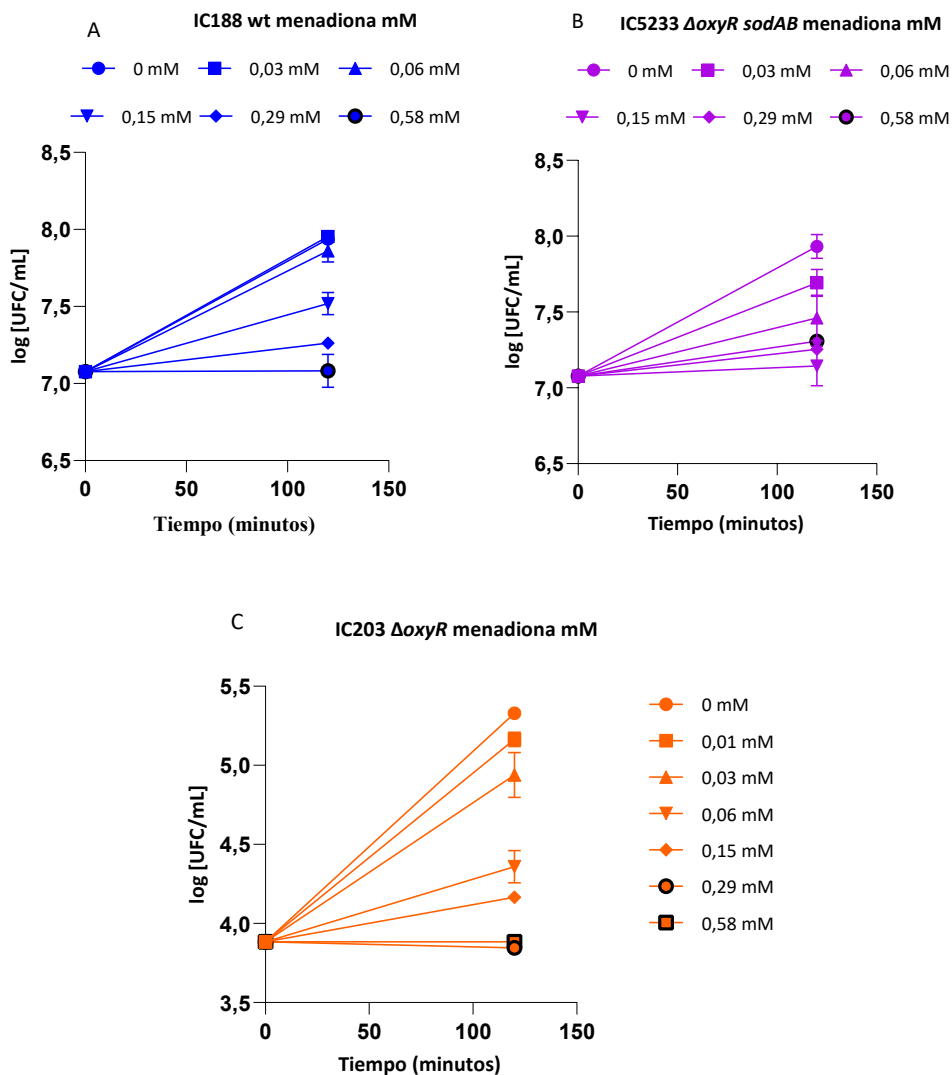


Figura 79: Curva de crecimiento de las cepas (A) IC188, (B) IC5233 e (C) IC203 tratadas con menadiona expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3).

El compuesto paraquat genera un comportamiento similar en las cepas IC188, IC5228 e IC5229 (Figura 80A, 80B y 80C). Los resultados muestran el efecto más pronunciado sobre la bajada en número de colonias para la concentración de 1,56 mM. En contraste, en la cepa IC203 a dosis de 0,39 mM se observa la disminución de la formación de colonias por el efecto del paraquat.

Resultados

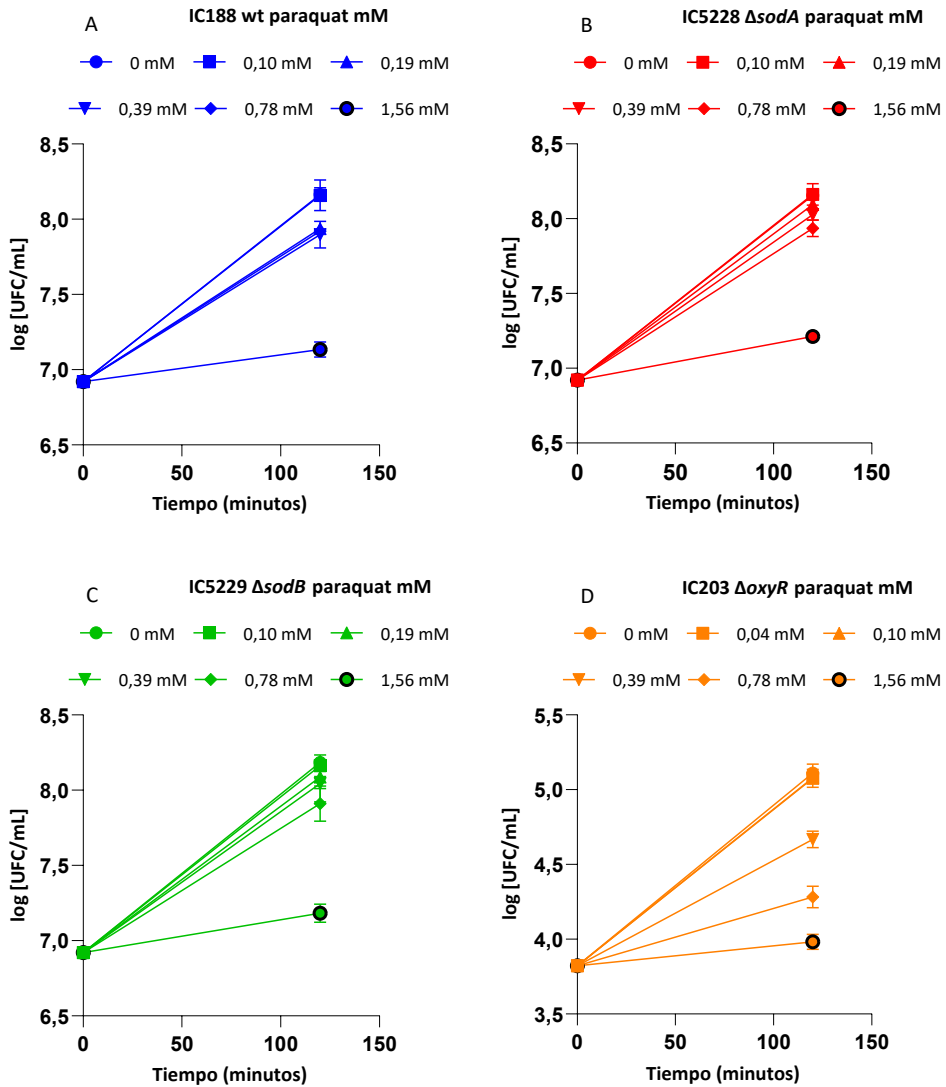


Figura 80: Curva de crecimiento de las cepas (A) IC188, (B) IC5228, (C) IC5229 e (D) IC203 tratadas con paraquat expresada como log [UFC/mL] vs tiempo (minutos). Los resultados son la media \pm SD (n = 3).

5.3.3. Análisis de la viabilidad con SYTO9 y DiBAC₄(3)

El estrés producido por los diferentes compuestos puede desencadenar la aparición de ciertas poblaciones celulares, llamadas células viables pero no cultivables (VBNC), que pierden su capacidad de crecer en medio de agar, pero aún muestran actividad

metabólica. La detección de bacterias VBNC se puede lograr utilizando tinciones de fluorescencia con propiedades celulares específicas.

La tinción de viabilidad con SYTO9 y PI es una herramienta de uso frecuente en estudios microbiológicos. Dichos fluoróforos están basados en la detección de la integridad de la membrana. Durante la tinción conjunta, SYTO 9 puede atravesar todas las membranas bacterianas independientemente de su integridad de membrana, unirse al ADN y al ARN y emitir fluorescencia verde, mientras que PI tiñe a las bacterias con membranas comprometidas, uniéndose al ADN y al ARN y emite una señal fluorescente roja. En la Figura 81 se observa los dot-plots de SYTO9 vs PI de la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Las bacterias sin tratar son positivas para SYTO9. Con dosis crecientes de t-BOOH se aprecia un aumento de la fluorescencia de PI y pérdida de intensidad de fluorescencia de SYTO9, dando lugar a las poblaciones intermedias y muertas.

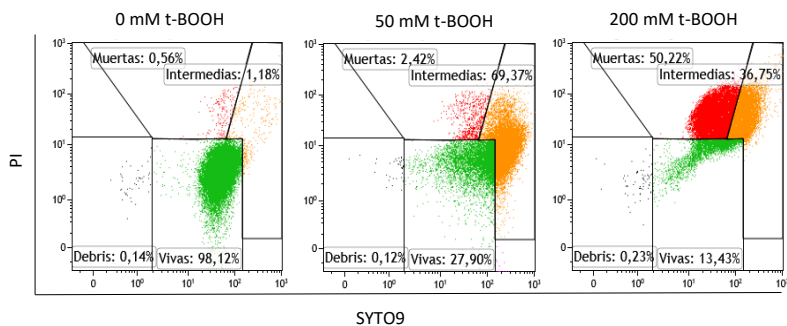


Figura 81: Dot-plots de SYTO9 vs PI de la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Para cada dot-plot se realizan las siguientes regiones: debris, vivas, intermedias y muertas.

La viabilidad de las bacterias también puede evaluarse mediante tinción dual con PI y sondas sensibles al potencial de membrana, como DiBAC₄(3) que penetra a través de membranas despolarizadas. En bacterias metabólicamente activas con membranas citoplasmáticas intactas, típicamente hay una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, con el interior negativo entre 100 y 200 mV con respecto al exterior. Como se muestra en la Figura 82, cuando la cepa IC188 es tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH, se observa un aumento de las bacterias DiBAC₄(3)⁺ PI⁻, es decir despolarizadas. A la dosis de 200 mM se aprecia un incremento del porcentaje de bacterias DiBAC₄(3)⁺ PI⁺ debido a un aumento de

Resultados

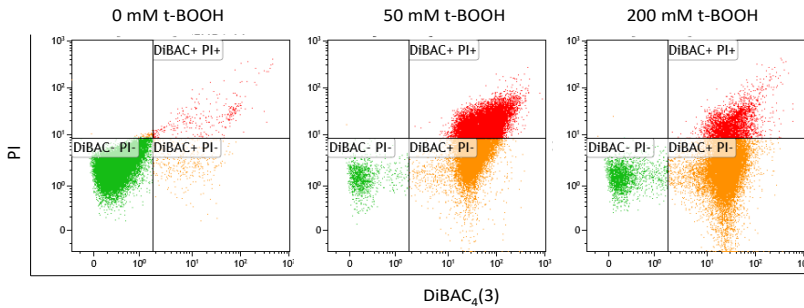


Figura 82: Dot-plots de DiBAC₄(3) vs PI de la cepa IC188 tratada con diferentes concentraciones de t-BOOH. Para cada dot-plot se realizan las siguientes regiones: DiBAC₄(3)⁻ PI⁻, DiBAC₄(3)⁺ PI⁻ y DiBAC₄(3)⁺ PI⁺.

Por otro lado, se evalúa el xenobiótico menadiona con tinción dual de PI con SYTO9 y PI con DiBAC₄(3). Estos fluorocromos permiten la cuantificación de ácidos nucleicos y del potencial de membrana. Las cepas empleadas para este experimento son IC188, wild type, e IC5233, triple mutante, para comparar el efecto que provoca la menadiona. En las Tablas 25 y 26 se resume el efecto del tratamiento de menadiona en las diferentes cepas.

Tabla 25: Porcentajes del análisis de los fluorocromos SYTO9 vs PI y DiBAC₄(3) vs PI de la cepa IC188 expuesta con diferentes dosis de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Menadiona mM	IC188					
	SYTO9 vs PI			DiBAC ₄ (3) vs PI		
	Vivas	Intermedias	Muertas	DiBAC ₄ (3) ⁻ PI ⁻	DiBAC ₄ (3) ⁺ PI ⁻	DiBAC ₄ (3) ⁺ PI ⁺
0	96,29 \pm 0,75	2,33 \pm 0,29	1,15 \pm 0,47	96,98 \pm 0,59	1,75 \pm 0,28	1,19 \pm 0,36
0,06	96,93 \pm 0,65	1,82 \pm 0,21	1,08 \pm 0,44	96,53 \pm 1,99	1,29 \pm 0,11	1,10 \pm 0,71
0,29	95,40 \pm 1,45	2,31 \pm 1,00	1,67 \pm 0,45	96,34 \pm 0,31	3,24 \pm 0,5	1,18 \pm 1,06
0,58	91,99 \pm 0,41	4,36 \pm 0,24	2,79 \pm 0,21	85,43 \pm 2,41	11,96 \pm 1,66	2,48 \pm 0,93
2,35	42,64 \pm 4,29	23,89 \pm 6,67	13,76 \pm 2,07	44,7 \pm 2,84	48,65 \pm 2,76	6,59 \pm 1,56

Tabla 26: Porcentajes del análisis de los fluorocromos SYTO9 vs PI y DiBAC₄(3) vs PI de la cepa IC5233 expuesta con diferentes dosis de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Menadiona mM	IC5233					
	SYTO9 vs PI			DiBAC ₄ (3) vs PI		
	Vivas	Intermedias	Muertas	DiBAC ₄ (3) ⁻ PI ⁻	DiBAC ₄ (3) ⁺ PI ⁻	DiBAC ₄ (3) ⁺ PI ⁺
0	92,90 \pm 0,75	2,99 \pm 0,25	3,17 \pm 0,25	92,27 \pm 0,53	3,09 \pm 0,06	4,16 \pm 0,40
0,06	96,93 \pm 0,46	5,76 \pm 0,25	3,38 \pm 0,36	90,59 \pm 2,10	3,97 \pm 0,95	5,10 \pm 1,40
0,29	79,96 \pm 0,67	10,12 \pm 0,63	7,97 \pm 0,06	70,62 \pm 3,84	14,83 \pm 5,50	13,09 \pm 3,84
0,58	78,76 \pm 0,42	8,04 \pm 0,57	11,05 \pm 0,56	70,64 \pm 1,52	19,90 \pm 1,10	8,39 \pm 0,76
2,35	35,45 \pm 4,11	43,22 \pm 15,06	7,47 \pm 1,80	26,06 \pm 2,56	53,44 \pm 3,05	20,14 \pm 1,98

Se observa una disminución de las células vivas analizadas con SYTO9 y PI similar al porcentaje de bacterias DiBAC₄(3)⁻ PI⁻ con concentraciones crecientes de menadiona. Dicha disminución es mayor en la cepa IC5233. Las bacterias DiBAC₄(3)⁺ PI⁻ presentan despolarización y no permeabilización de la membrana plasmática con porcentajes parecidos a los observados en las bacterias intermedias caracterizados con SYTO9 y PI. Asimismo, el incremento de las bacterias PI⁺ es mayor en la cepa IC5233 que en la cepa control. En cuanto a la dosis de 2,35 mM de menadiona en el análisis con SYTO9 y PI se observa un porcentaje de debris de 18,84 \pm 11,27 para la cepa IC188 y de 17,86 \pm 12,17 para la cepa IC5233.

5.4. Titulación de sustratos fluorogénicos para la determinación de ROS en bacterias

Es necesario definir una concentración óptima de los fluorocromos de estrés oxidativo empleados en las bacterias. Para DHDCF y MitoPY1 se utiliza el t-BOOH para generar la respuesta de estrés oxidativo con la cepa IC188 (Figura 83). Las suspensiones de control de DHDCF (0 μ M) de la cepa IC188 expuestas a 10 mM de t-BOOH muestran un ratio de fluorescencia de alrededor de 1,05 \pm 0,02.

Resultados

Concentraciones de DHDCF que van desde 2,05 μM a 41,04 μM resulta en un aumento de la intensidad de fluorescencia. A 41,04 μM de DCF, el cociente alcanza valores de $3,08 \pm 0,16$. El incremento de concentraciones a 82,08 μM dan como resultado una disminución del cociente. Por lo tanto, se ha seleccionado 41,04 μM como la concentración óptima de DHDCF para medir el estrés oxidativo en *E. coli*.

Para el fluorocromo MitoPY1 se muestra un cociente de fluorescencia de $1,29 \pm 0,14$ para bacterias tratadas y no teñidas. En las concentraciones crecientes de MitoPY1 hasta 2 μM se observa un aumento leve de los cocientes. La concentración óptima es 5 μM con valores de $1,76 \pm 0,03$ ya que concentraciones más altas presentan menores cocientes de fluorescencia.

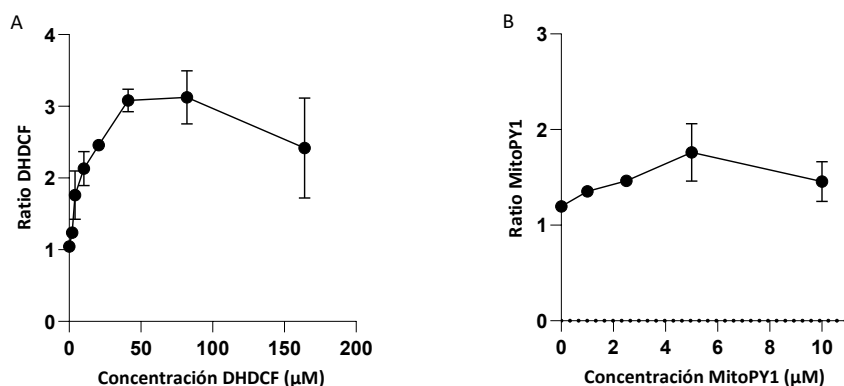


Figura 83: Ratio de las intensidades de fluorescencias de la cepa IC188 expuesta a 10mM de t-BOOH de los fluorocromos (A) DHDCF y (B) MitoPY1. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

Para evaluar la concentración óptima del fluorocromo HE se emplea la cepa IC5233 tratada con dosis de 0,29 mM de menadiona (Figura 84). Las suspensiones de bacterias IC5233 con concentraciones de 0 μM expuestas a 0,29 mM de menadiona presentan un cociente de fluorescencia de alrededor de $1,08 \pm 0,03$. La concentración óptima de HE es 15,88 μM con valores de $2,28 \pm 0,02$. Las concentraciones menores probadas muestran incrementos menores de cocientes y la concentración de 23,81 μM presenta valores de $2,20 \pm 0,21$.

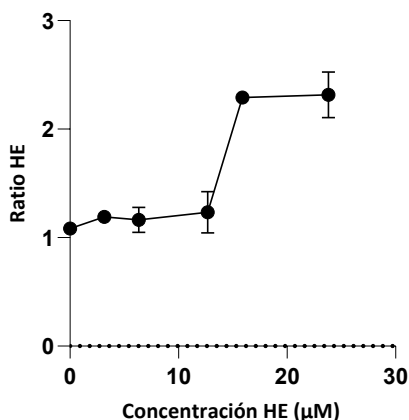


Figura 84: Ratio de las intensidades de fluorescencias de la cepa IC5233 expuesta a 0,29 mM de menadiona del fluorocromo HE. Los resultados son la media \pm SD (n=3).

5.5. Niveles celulares de ROS en cepas de *E. coli* tratadas con prooxidantes exógenos

Las respuestas al estrés oxidativo coordinadas por reguladores específicos aseguran la supervivencia bacteriana durante la exposición episódica a ROS exógenas o a ROS generadas como consecuencia de la respiración aeróbica. Las especies reactivas, como el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el OH^{\cdot} , representan una seria amenaza para la vida aeróbica. A lo largo del camino de la evolución, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de adaptación.

El estudio citómico de ROS se basa en el uso de sustratos fluorogénicos reducidos químicamente, cuya oxidación por diversos ROS genera fluorescencia. Los sustratos fluorogénicos empleados en los experimentos bacterianos son: HE con supuesta especificidad hacia el $O_2^{\cdot-}$ y dos sustratos con supuesta especificidad hacia el H_2O_2 y la actividad peroxidasa, como MitoPY1 y DHDCF.

El regulón OxyR es el encargado de controlar la respuesta frente a los peróxidos regulando positivamente genes tan importantes en la defensa antioxidante como la catalasa y la AhpCF. Los estudios citométricos llevados a cabo consisten en la determinación de los niveles de peróxidos con los fluorocromos DHDCF y MitoPY1 en la cepa salvaje IC188 y en las cepas deficientes en la defensa antioxidante IC203, mutada en el gen *oxyR* e IC5233, triple mutante, mutada en los genes *oxyR*, *sodA* y *sodB*. En estos ensayos se someten a las diferentes cepas de *E. coli* a diversos

Resultados

compuestos generadores de peróxidos como t-BOOH, H₂O₂ y CHP.

El regulón *soxRS* está asociado al control de los niveles de O₂⁻ intracelular en *E. coli*. Interviene en la respuesta frente a los niveles de O₂⁻ y regula positivamente enzimas como MnSOD, codificada por el gen *sodA*. El análisis citómico consiste en la determinación de los niveles del O₂⁻ con la sonda HE en la cepa control IC188 y en las cepas mutantes en los genes *sodA* (IC5228), *sodB* (IC5229), *sodA* y *sodB* (IC5232), *sodA*, *sodB* y *oxyR* (IC5233) y *oxyR* (IC203). En los ensayos se expone a las diversas cepas a diferentes xenobióticos generadores de O₂⁻ como la menadiona y el paraquat.

5.5.1. Efecto de H₂O₂ sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de *E. coli*

Para los ensayos de estrés oxidativo con H₂O₂ se han tratado durante 60 minutos las diferentes cepas de *E. coli* con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100 mM, concentraciones muy inferiores a la IC₅₀ de dicho xenobiótico. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

La incubación con H₂O₂ provoca un aumento estadísticamente significativo del cociente de fluorescencia para las tres sondas empleadas en las tres cepas (Figura 85). Se observa una mayor respuesta por parte del fluorocromo MitoPY1, con una mayor sensibilidad para el H₂O₂ que la sonda DHDCF. La cepa control muestra diferencias significativas en todas las concentraciones con MitoPY1 pero, solo en las dosis altas de 50 y 100 mM de H₂O₂ con DHDCF. Asimismo, mientras que en la cepa IC203, a partir de la concentración 25 mM, el cociente no se incrementa en dosis más altas, en la cepa IC5233 los valores de cociente más altos se reflejan en la dosis de 50 mM con valores de 31,31 ± 3,58. Para DHDCF los resultados del cociente de fluorescencia de las cepas mutadas son similares, con valores para la concentración de 100 mM de H₂O₂ de 7,88 ± 0,46 en la cepa IC203 y de 6,79 ± 0,96 en la cepa IC5233. Por otro lado, HE muestra valores de cociente similares para las tres cepas.

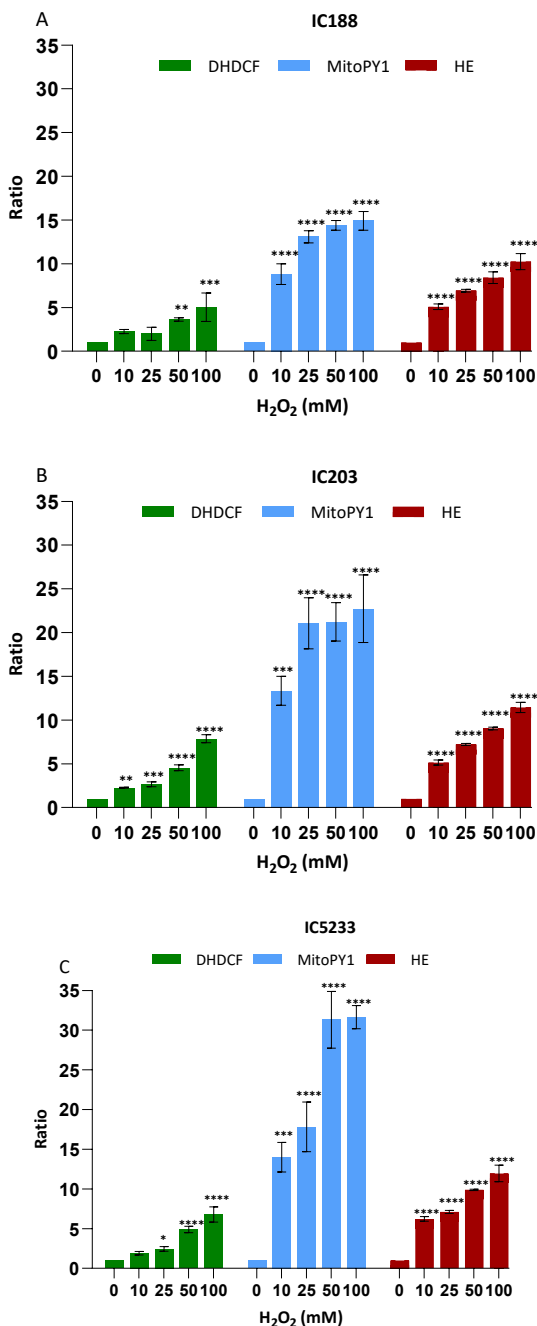
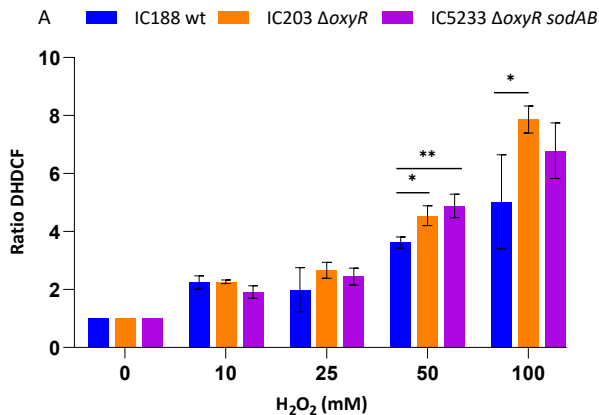


Figura 85: Ratio de DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes dosis de H₂O₂. Los resultados son la media ± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó

Resultados

mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

La comparación de los cocientes de la sonda DHDCF entre la cepa control y las cepas deficientes en genes de la defensa del estrés oxidativo tratadas con H_2O_2 refleja diferencias para la concentración de 50 y 100 mM entre IC188 e IC203 y en la dosis de 50 mM entre IC188 e IC5233 (Figura 86A). Con la cepa IC203 se muestran diferencias significativas en todas las concentraciones de H_2O_2 con respecto a MitoPY1 (Figura 86B). Dichas diferencias son mayores en la cepa IC5233 con respecto a la cepa IC188. Estos resultados confirman la mayor sensibilidad que existe en la respuesta frente a H_2O_2 exógeno en las cepas mutantes para el gen *oxyR*. Asimismo, para las concentraciones de 50 mM y 100 mM, la cepa IC5233 presenta diferencias significativas con respecto a IC203. La mutación en los genes *sodA* y *sodB*, que codifican MnSOD y FeSOD respectivamente, provoca el mayor aumento de los niveles de H_2O_2 reflejado en los altos cocientes de MitoPY1, lo que conlleva la clara caracterización de las cepas a través del estudio de la sonda MitoPY1. Por otro lado, no hay diferencias entre las cepas en cuanto a los cocientes de HE en la mayoría de las concentraciones ensayadas, ya que las tres presentan unos valores semejantes (Figura 86C). A dosis bajas de H_2O_2 existen diferencias entre las cepas IC188 e IC203 respecto a IC5233.



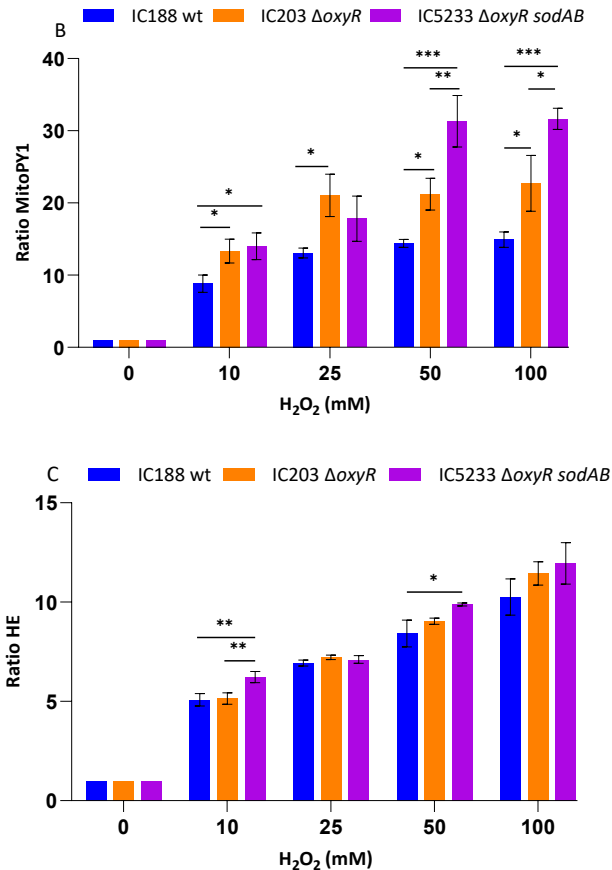


Figura 86: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCF, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

5.5.2. Efecto de t-BOOH sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de *E. coli*

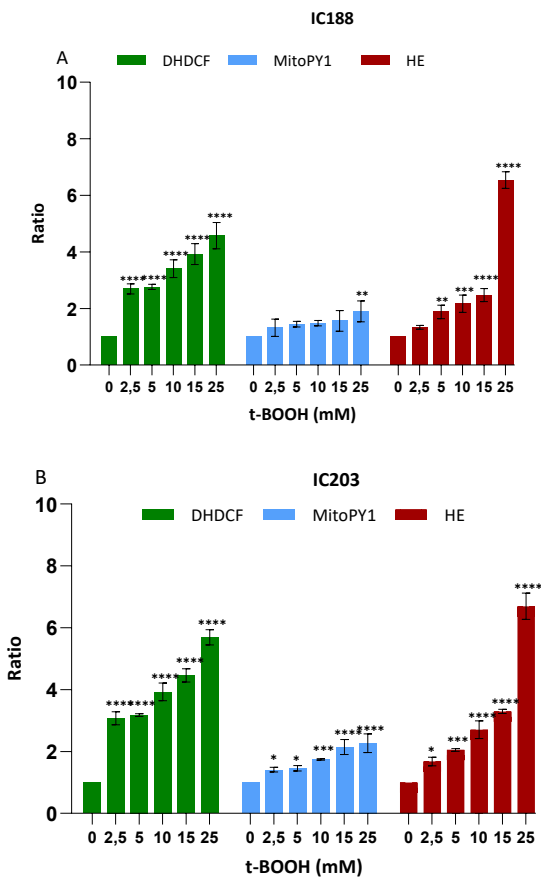
Para los experimentos de estrés oxidativo con t-BOOH se han expuesto durante 60 minutos las diferentes cepas de *E. coli* a dosis de 0, 2,5, 5, 10, 15 y 25 mM. La cuantificación de ROS en las cepas en presencia de t-BOOH se muestra en la Figura 87. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

Se observa en el caso de la sonda DHDCF para las bacterias IC188, un incremento

Resultados

dosis-dependiente significativo en todas las concentraciones del xenobiótico con valores de cociente máximos de $4,58 \pm 0,47$. Por otro lado, con el fluorocromo MitoPY1 el aumento del cociente solo tiene lugar con dosis altas de t-BOOH y con valores menores. Se refleja además un aumento significativo con la sonda HE, destacando un cociente de $6,54 \pm 0,30$ para la concentración de 25 mM (Figura 87A).

Para las cepas mutadas en el gen *oxyR*, la exposición a concentraciones de t-BOOH produce un incremento del cociente para los tres sustratos fluorogénicos de estrés oxidativo (Figura 87B y 87C). El aumento es mayor en la cepa IC5233 y con la sonda DHDCF con valores en la dosis de 25 mM de $9,17 \pm 0,42$. Del mismo modo, el fluorocromo HE presenta los valores de cociente más elevados en dicha dosis para las cepas IC203 e IC5233.



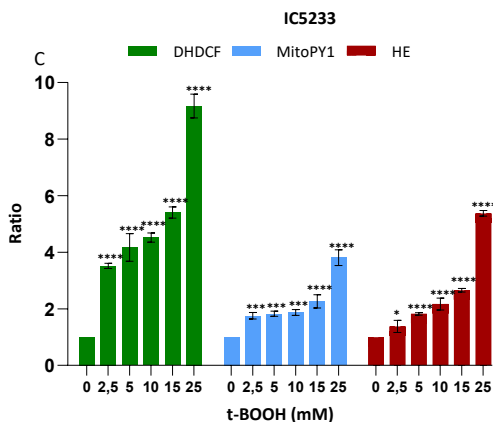


Figura 87: Ratio de los fluorocromos DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

La comparación de la cepa IC188 con las cepas mutadas con el fluorocromo DHDCF se muestra en la Figura 88A. Se observan diferencias significativas a las concentraciones de 5 mM y 25 mM de t-BOOH entre la cepa salvaje y la cepa $\Delta oxyR$. En cambio, los resultados de la cepa triple mutante presentan diferencias significativas con la cepa control en todas las dosis. Además, la comparación entre las cepas deficientes muestra diferencias significativas en todas las concentraciones, lo que demuestra que la mutación en *sodAB* genera un aumento de las ROS mayor.

El mismo patrón se muestra con el fluorocromo MitoPY1 en respuesta al tratamiento de t-BOOH en las cepas IC188 y IC203 (Figura 88B). La presencia del regulón OxyR no confiere una defensa frente al t-BOOH probablemente debido al modo de acción de este compuesto. La delección de los genes *sodA* y *sodB* además de *oxyR* de la cepa IC5233 exhibe diferencias significativas con la cepa control y la cepa IC203 con la determinación del estrés con MitoPY1. Con el fluorocromo HE solo se observan diferencias entre las cepas a dosis altas (15 y 25 mM), destacando el menor cociente de las cepas IC5233 ($5,37 \pm 0,10$) en comparación con IC188 e IC203 con valores de $6,54 \pm 0,30$ y de $6,69 \pm 0,42$ respectivamente (Figura 88C).

Resultados

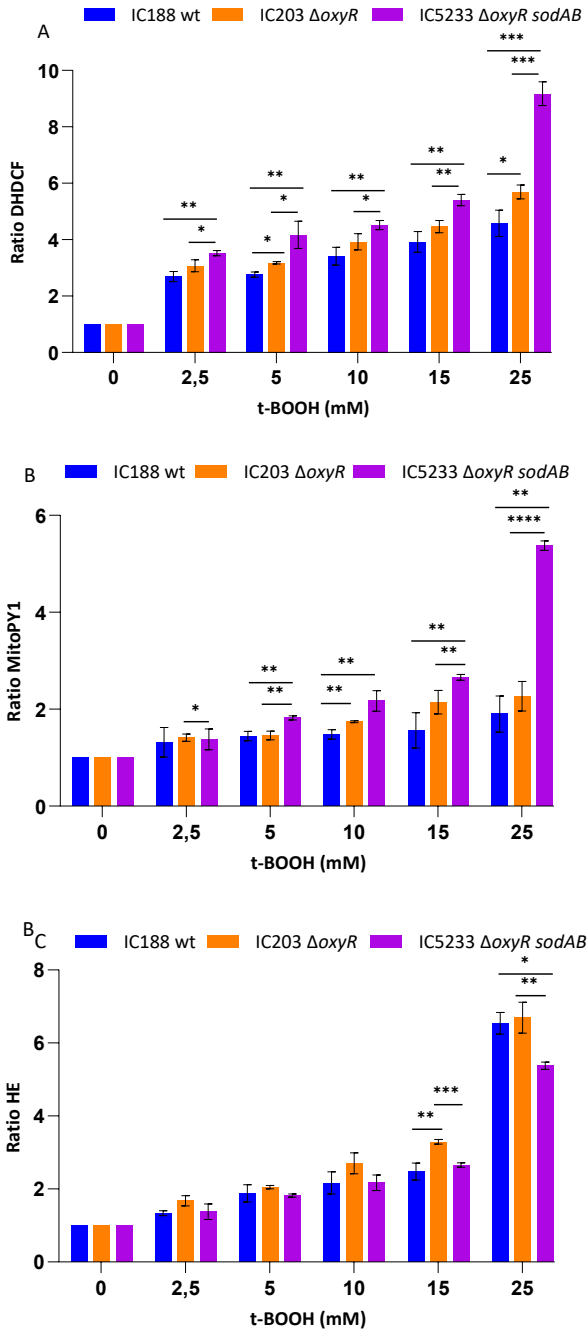


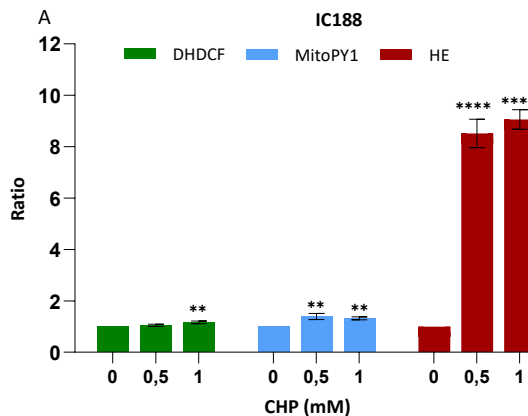
Figura 88: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCE, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de t-BOOH. Los resultados son la

media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

5.5.3. Efecto de CHP sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de *E. coli*

Para los ensayos de estrés oxidativo con CHP se han tratado durante 60 minutos las diferentes cepas de *E. coli* con dosis de 0, 0,5 y 1 mM, concentraciones muy inferiores a la IC₅₀ de dicho xenobiótico. Como indicador cuantitativo y normalizado de la concentración intracelular de ROS se utiliza el cociente de fluorescencia.

Los resultados de los diferentes sustratos fluorógenicos en las cepas IC188, IC203 e IC5233 se muestra en la Figura 89. En cuanto a los cocientes del sustrato fluorogénico DHDCF se observa unos valores mayores en las cepas IC203 e IC5233 con respecto a la cepa control. Se observan resultados significativos para todas las concentraciones de CHP. A la dosis de 1 mM de CHP los valores para la cepa IC203 e IC5233 son de $6,6 \pm 0,35$ y de $9,04 \pm 0,29$. La sonda MitoPY1 aunque presenta cocientes significativos en las concentraciones ensayadas en las tres cepas, el incremento del cociente es menor que con el fluorocromo DHDCF. Destaca el elevado incremento en HE reflejado en las tres cepas con cocientes alrededor de 9.



Resultados

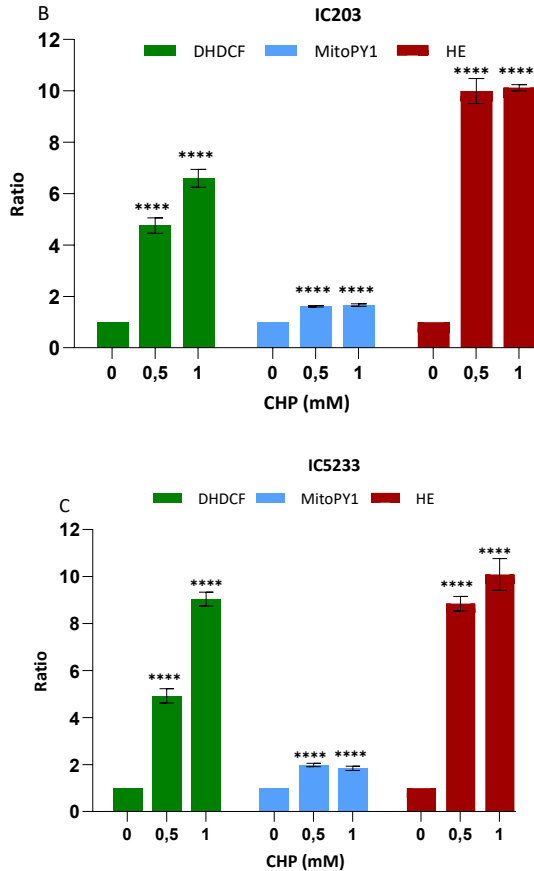


Figura 89: Ratio de los fluorocromos DHDCF, MitoPY1 e HE en las cepas (A) IC188, (B) IC203 e (C) IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

La comparación entre las cepas deficientes y la cepa control evidencian diferencias significativas en todas las concentraciones atendiendo a las sondas DHDCF y MitoPY1 (Figura 90A y 90B). Asimismo, a la dosis de 1 mM de CHP, existen diferencias entre IC203 y IC5233, con un mayor incremento de los cocientes de fluorescencia para la cepa triple mutante. En cambio, con respecto a HE (Figura 90C), aunque existen diferencias entre IC188 y la cepa deficiente en OxyR, IC203, no hay diferencias entre la cepa control e IC5233. Tampoco la delección de los genes *sodA* y *sodB*, muestran un mayor incremento de los niveles de HE, como refleja las cocientes similares de IC203 e IC5233 en la concentración de 1 mM.

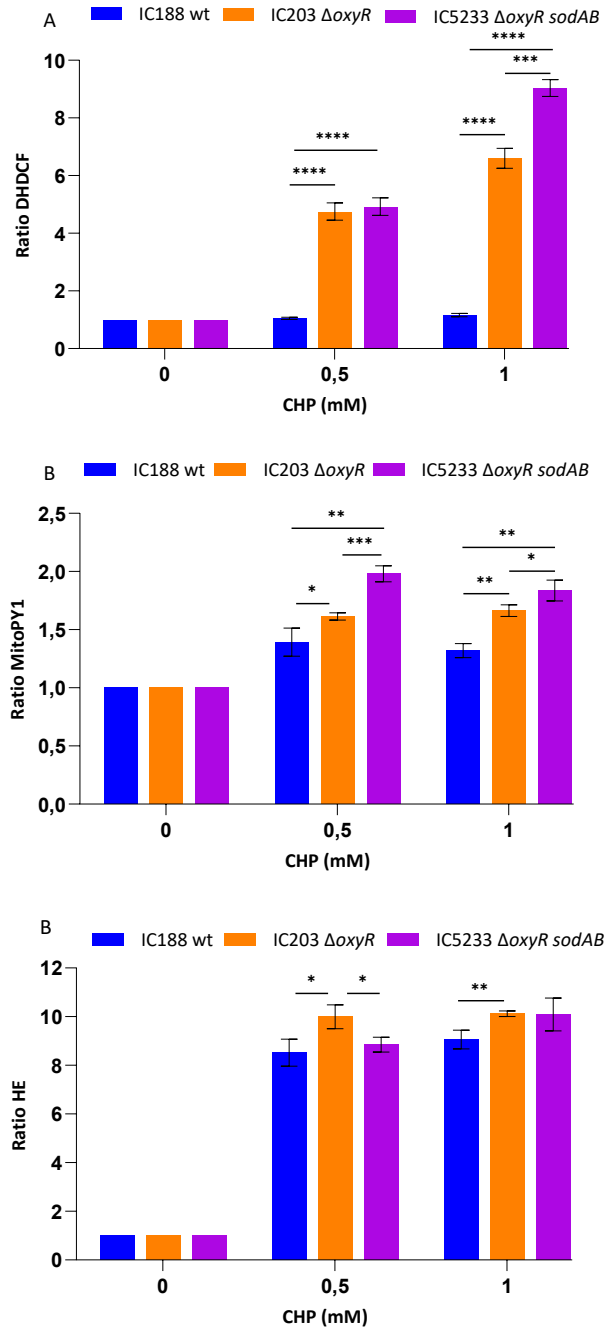


Figura 90: Comparación del ratio del fluorocromo (A) DHDCE, (B) MitoPY1 y (C) HE entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Los resultados son la media

Resultados

± SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001).

5.5.4. Efecto de menadiona sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de *E. coli*

Para los ensayos con menadiona, un compuesto generador de O_2^- , se han tratado durante 120 minutos las cepas IC188, IC203 e IC5233 y además se han probado las cepas IC5228, IC5229 e IC5232, para evaluar el efecto de dicho xenobiótico sobre la enzima SOD (Figura 91). Los cocientes de la sonda fluorescente HE reflejan diferencias significativas en todas las cepas en las mayores concentraciones probadas, con mayores valores para la cepa IC5233 ($6,25 \pm 0,33$).

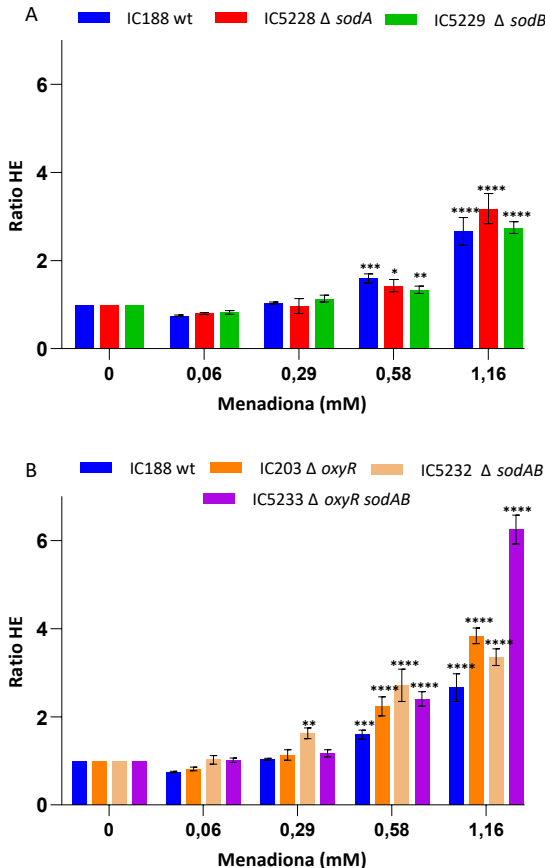


Figura 91: Ratio del fluorocromo HE en las cepas (A) IC188, IC5228 e IC5229 y (B) IC188, IC203 , IC5232 e IC5233 y expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la

media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Atendiendo a los resultados, la comparación de las cepas se realiza con las cepas IC188, IC203, IC5232 e IC5233 en las concentraciones de 0,58 y 1,16 mM de menadiona (Figura 92). A la dosis de 0,58 mM, las cepas deficientes muestran diferencias respecto a la cepa control. A la concentración de 1,16 mM, se mantienen las diferencias respecto al control. Además, se observa que entre las cepas IC188 e IC5232, no existen diferencias significativas, por lo tanto la incubación con menadiona genera el mismo efecto en las bacterias con la mutación *oxyR* o con la mutación *sodAB*. En cambio, todas las cepas muestran diferencias significativas con respecto a IC5233.

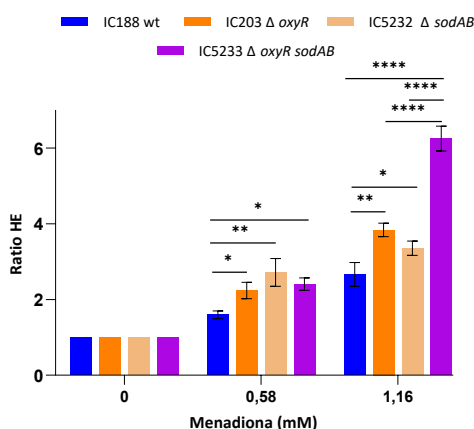


Figura 92: Comparación del ratio del fluorocromo HE entre las cepas IC188, IC203, IC5232 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

A la vista de los resultados obtenidos con HE, se evalúa con DHDCF las cepas IC188, IC203 e IC5233 tratadas con menadiona (Figura 93). Las tres cepas aumentan significativamente el cociente de DHDCF. Se observa un mayor cociente en la cepa IC203 con valores de $4,93 \pm 0,30$. Además, la cepa IC203 refleja diferencias significativas en comparación con la cepa IC188 e IC5233. A pesar de las diferencias mostradas entre la cepa IC188 e IC5233 con la sonda HE (Figura 92), no se aprecian con DHDCF.

Resultados

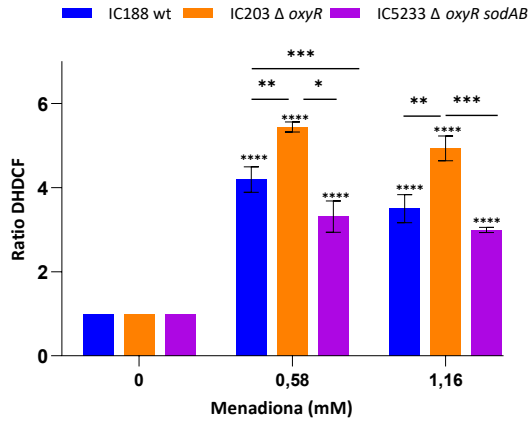


Figura 93: Ratio del fluorocromo DHDCF y comparación del ratio entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de menadiona. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

5.5.5. Efecto de paraquat sobre el estrés oxidativo en diferentes cepas de *E. coli*

Para los experimentos de estrés oxidativo con paraquat se han expuestos durante 120 minutos las cepas de *E. coli* IC188, IC203 e IC5233 a dosis de 0, 0,39, 1,56 y 3,12 mM. La cuantificación de ROS se realiza con el sustrato fluorogénico HE y se muestra en la Figura 94. Se observa que la exposición al paraquat en la cepa IC188 no muestra diferencias significativas en el cociente en las dosis ensayadas. En cambio, las diferencias se reflejan en las concentraciones de 1,56 y 3,12 mM en las cepas deficientes, IC203 e IC5233. El análisis de la comparación entre cepas muestra diferencias significativas entre la cepa control y las mutadas. A diferencia de lo observado con menadiona (Figura 92), el paraquat afecta de forma similar en cuanto a los cocientes de HE, la ausencia o presencia de MnSOD y FeSOD, a la concentración de 3,12 mM pero a dosis de 1,56 si hay diferencias con un cociente mayor en la cepa IC5233.

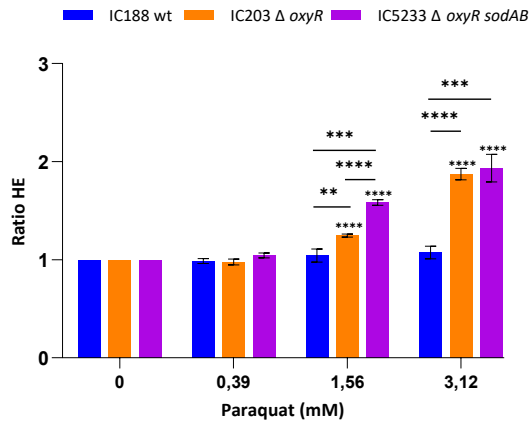


Figura 94: Ratio del fluorocromo HE y comparación del ratio entre las cepas IC188, IC203 e IC5233 expuestas a diferentes concentraciones de paraquat. Los resultados son la media \pm SD (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test One-Way ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).



Discusión

1. Consideraciones sobre el diseño experimental

La CMF se utiliza con gran frecuencia para el estudio cuantitativo de la generación intracelular de ROS y RNS, gracias a la disponibilidad de diversos tipos de sustratos fluorogénicos y fluorocromos (Cottet-Rousselle et al., 2011; De Biasi et al., 2016; Escada-Rebello et al., 2020; Manoil & Bouillaguet, 2018; Shehat & Aranjuez-Tigno, 2019). Sin embargo, como se ha comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la literatura científica plantea numerosos aspectos problemáticos en la aplicación de estos reactivos (Adegoke & Forbes, 2015; Chen et al., 2011; Kalyanaraman et al., 2012; Wu et al., 2019). Ello es debido a la elevada complejidad intrínseca de los procesos bioquímicos en los que ROS y RNS participan e interaccionan entre ellos, así como a las limitaciones en la especificidad de los marcadores fluorescentes empleados para su detección. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios de ROS y RNS mediante CMF se encuadran en modelos experimentales de estrés oxidativo, una situación fisiopatológica o toxicológica que puede conllevar importantes alteraciones funcionales y causar la muerte de las células (Gutteridge & Halliwell, 2018; Valko et al., 2004). Estas fuentes potenciales de artefactos hacen que la determinación cuantitativa de la generación intracelular de ROS y RNS sean un desafío difícil y requiera una cautelosa interpretación de los datos.

El objetivo general de esta Tesis ha sido el de evaluar los problemas de especificidad de las sondas fluorescentes y la participación de diferentes ROS en dos modelos relevantes de estrés oxidativo, basados en la acción de varios prooxidantes que difieren en su metabolismo, biodisponibilidad, reactividad y mecanismos de acción oxidativa. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio sistemático destinado a evaluar cuestiones tan importantes en la aplicación de la CMF, detectar posibles fuentes de error y proporcionar recomendaciones para el diseño adecuado de estudios citométricos de estrés oxidativo.

Precisamente, esta Tesis parte de la hipótesis de que un cuidadoso diseño de los protocolos de estudio por CMF del estrés oxidativo puede prevenir o paliar las limitaciones en su aplicabilidad y en la interpretación de los datos obtenidos. Por ello, para establecer los objetivos metodológicos dirigidos a validar la hipótesis de partida, hemos considerado los siguientes factores como principales limitantes en la detección precisa y reproducible de ROS y RNS:

- Dependientes de los propios ROS y RNS: Baja concentración, corta vida media e interacciones complejas ente ellos.
- Dependientes de los reactivos fluorescentes: Incertidumbre en la especificidad de detección de ROS y RNS y posibles interferencias entre los fluorocromos y de éstos con el proceso de estrés oxidativo.
- Dependientes de las condiciones experimentales: Alteraciones secundarias en los procesos de estrés oxidativo a los efectos tóxicos de los xenobióticos modelo utilizados como prooxidantes (disfunción mitocondrial, pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, muerte celular).

2. Modelo de estrés oxidativo inducido en células Jurkat

Las líneas celulares estables se emplean con gran frecuencia como modelos en múltiples aplicaciones en Biología experimental y Biotecnología. Las células Jurkat, elegidas para nuestro estudio, constituyen un modelo que imita las características de los linfocitos T humanos. Esta línea de linfoblastos T leucémicos crece en suspensión, presenta una tasa de proliferación rápida y expresa moléculas similares a los linfocitos T normales. Por ello, las células Jurkat se suelen utilizar, fundamentalmente, como modelo in vitro de las respuestas de activación de los linfocitos T normales. Por otra parte, gracias a la exhaustiva caracterización de esta línea y la facilidad de su manipulación, las células Jurkat se han convertido en modelos habituales para el estudio de mecanismos citotóxicos inducidos por moléculas y biomateriales (Pshenichnikov et al., 2021), por lo que se eligió como uno de los modelos experimentales in vitro de nuestro estudio. De hecho, muchos de los estudios in vitro con células Jurkat se han realizado por CMF, con un total de 2413 artículos en PubMed entre 1984 y 2022 (PubMed, 2022a), entre los que se cuentan 167 artículos relacionados con el análisis del estrés oxidativo entre 1989 y 2022 (PubMed, 2022b), cifra que representa una fracción importante de los 472 estudios generales sobre estrés oxidativo realizados en células Jurkat entre 1994 y 2022 (PubMed, 2022c).

Las células Jurkat, como modelo eucariótico, aportan un valor añadido a nuestro diseño experimental, al permitir abordar la posible implicación mitocondrial en los mecanismos de estrés oxidativo (Mendivil-Perez et al., 2015) y en la evaluación de la selectividad de la detección subcelular de ROS (O'Connor et al., 2017), aspectos importantes en los objetivos de nuestro estudio.

Una consideración esencial en el diseño de nuestros experimentos ha sido la de evitar o minimizar la influencia de factores de confusión derivados de la inducción de mecanismos de defensa antioxidante o de epifenómenos debidos a los efectos tóxicos de los xenobióticos utilizados. Para ello, seguimos tres aproximaciones, no excluyentes:

- Establecer curvas de citotoxicidad de los xenobióticos modelo y definir el intervalo de concentraciones (“range finding”) en los que la viabilidad celular no disminuye significativamente (Apartado 1 de Resultados).
- Limitar el tiempo de exposición a los tóxicos a 30 o 60 minutos en experimentos de punto final (Apartado 2 de Resultados) o a 10 minutos en experimentos cinéticos (Apartado 3 de Resultados).
- Acotar (“gating”) en cada análisis citométrico la población de células intactas, identificadas por parámetros de fluorescencia (marcadores de viabilidad) y/o dispersión de luz, para cuantificar las medidas de fluorescencia relacionadas con ROS y RNS solo en las células vivas, aún no comprometidas en sus funciones de membrana o en proceso avanzado de apoptosis.

De acuerdo con lo anterior, en una primera serie de experimentos se evaluó por CMF la citotoxicidad de todos los xenobióticos modelo utilizados, lo que permitió establecer los intervalos de concentraciones útiles para los estudios específicos con los fluorocromos e identificar la población de células vivas para acotarlas selectivamente Tabla 27.

Tabla 27: Resumen de las concentraciones empleadas en los ensayos citómicos en las células Jurkat.

Xenobiótico	[μ M]
H ₂ O ₂	0-100-200-400-800-1000
t-BOOH	0-100-200-400-800-1000
CHP	0-10-20-40-80-100
Menadiona	0-10-20-30-50
Plumbagina	0-10-20-30-50

Discusión

Un estudio previo (Chiaramonte et al., 2001) sobre apoptosis en células Jurkat inducidas por la exposición a 100 μM H_2O_2 , mostró que el daño al ADN se producía en los primeros 15 minutos del tratamiento, pero que su reparación se iniciaba en aproximadamente en 60 minutos y no implicaba la transcripción de genes. El tratamiento causó la muerte celular por necrosis y por apoptosis. De relevancia para interpretar nuestros propios resultados, la necrosis comenzó tras 60 minutos de tratamiento y continuó aumentando a lo largo del experimento. La apoptosis se inició solo tras 4 horas de tratamiento y fue notoria entre 6 y 20 horas después, acompañada de la regulación al alza de los genes Bcl-2 y Caspasa, aunque la expresión de los genes Fas y p53 no se alteró en ninguna de las fases, ni se detectó ninguna modulación de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD Cu/Zn o GPx.

También se había demostrado previamente (Beiqing et al., 1996) que los niveles subletales de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 estimulan la activación transcripcional de c-jun (pero no de c-fos) y suprimen la activación del promotor de IL-2 en células Jurkat. El análisis transcriptómico demostró que las señales oxidativas se parecían mucho a las inducidas por la estimulación mitogénica de esta línea linfóide con PHA/PMA, apoyando que nuestro modelo experimental de análisis del estrés oxidativo en condiciones subletales pueda ser de relevancia para estudios de señalización redox en la activación de células T humanas.

3. Modelo de estrés oxidativo inducido en cepas de *E. coli* WP2

Con el fin de validar un modelo bacteriano de estrés oxidativo, hemos caracterizado diferentes cepas bacterianas derivadas de una cepa salvaje de *E. coli* B WP2 (cepa IC188), deficientes en la función OxyR (cepa IC203) o simultáneamente en las funciones OxyR, MnSOD y FeSOD (cepa triple mutante IC5233). Los niveles intracelulares de ROS se han determinado mediante CMF después del tratamiento de cepas con xenobióticos mediante el uso de sustratos fluorogénicos sensibles a ROS.

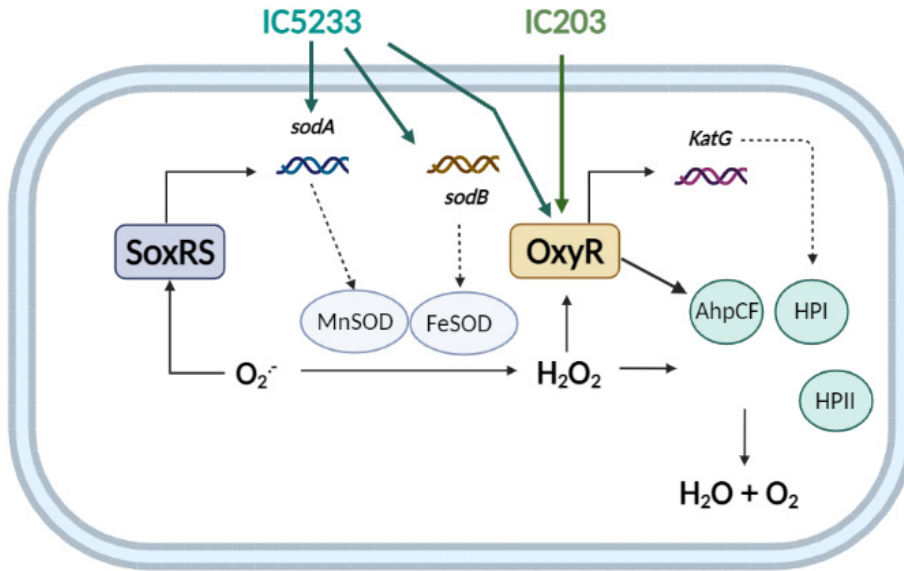
Los mecanismos moleculares y las consecuencias fisiológicas del estrés oxidativo han estado bajo una amplia investigación durante décadas, principalmente en el modelo de investigación *E. coli* (Fu et al., 2015). Comprender las respuestas de ROS en microbios tiene implicaciones importantes para el tratamiento con antibióticos, ya que poseen una acción antimicrobiana eficaz contra un amplio espectro de

patógenos (Kohanski et al., 2007). La eficacia en la inhibición de patógenos microbianos clínicamente importantes, constituyen una opción primordial para el tratamiento de infecciones (Memar et al., 2018).

Además, el uso de bacterias para estudiar los procesos de estrés oxidativo presenta grandes ventajas (Imlay, 2008). Sin embargo, los ensayos de CMF funcional en bacterias vivas aún son limitados. Esto se debe, en parte, a que la pared celular impide la penetración de colorantes vitales en las bacterias, lo que impone procedimientos de permeabilización. Estas manipulaciones requieren tiempo y, sobre todo, pueden afectar a la fisiología celular o a las características físicas de la célula bacteriana, por agregación o lisis.

En estudios previos de nuestro laboratorio (Herrera et al., 2003), demostramos la aplicabilidad de las cepas de *E. coli* B, que expresan de forma constitutiva un lipopolisacárido de pared celular alterado que conlleva un aumento de la permeabilidad de la membrana. Por dicha característica, estas cepas han sido ampliamente utilizadas para ensayos mutagénicos (Blanco et al., 1998; Martínez et al., 2000) y se mostraban como posibles alternativas para ensayos funcionales de CMF, evitando pasos de permeabilización. De hecho, la cepa IC188 de *E. coli* B, con permeabilidad natural incrementada, exhibió una tinción más eficiente con fluorocromos vitales que la cepa salvaje AB1157 de *E. coli* K-12, mientras que mantenía un potencial de membrana similar a ésta. Además, se descubrió que la cepa IC188 es más sensible que AB1157 para revelar estrés oxidativo cuando se enfrenta a prooxidantes (Herrera et al., 2002) lo que apoya su idoneidad como cabeza de serie para el desarrollo de biosensores de estrés oxidativo de aplicación en CMF, como se esquematiza en la Figura 95.

Al igual que en el modelo eucariótico, hemos pretendido reducir la influencia en los resultados de factores de confusión y epifenómenos. Para ello hemos adaptado a las características biológicas y citométricas del modelo bacteriano, las consideraciones planteadas para las células Jurkat, con respecto a la duración de las incubaciones con los xenobióticos, el establecimiento de intervalos óptimos de citotoxicidad de estos y la selección de células bacterianas vivas en el análisis citométrico. Además, el hecho de que las cepas IC203 e IC5233 presentan deficiencias en funciones importantes para la defensa antioxidante, hacía necesario evaluar que el estado fisiológico intrínseco dichas cepas no causara diferencias significativas en su capacidad vital ni su fenotipo oxidativo en estado basal.



Created in BioRender.com bio

Figura 95: Esquema de las modificaciones genéticas inducidas por nuestro laboratorio en la cepa salvaje IC188 para obtener las cepas IC203 (deficiente en OxyR) e IC5233 (deficiente en OxyR, MnSOD y FeSOD).

La comparación de las curvas de crecimiento de las cepas en medio líquido y condiciones aeróbicas (Figura 72) muestra una velocidad de proliferación muy ligeramente superior en el caso de la cepa salvaje IC188 con respecto a ambas cepas mutantes. Sin embargo, estas diferencias solo se hacen patentes cuando los cultivos se acercan DO_{600} de 0,4. Un resultado similar se puede observar cuando se compara la viabilidad de las cepas bacterianas, estimada mediante el recuento en placa de CFU, en muestras obtenidas en las mismas condiciones experimentales de crecimiento aeróbico en ausencia de tóxicos (Figura 79). Por ello, podemos considerar que, en estas condiciones, las cepas mutantes no presentan desventajas evidentes de estado fisiológico frente a la cepa IC188, en relación con posibles procesos de estrés oxidativo inducidos por la utilización del O_2 ambiental.

Al igual que en el modelo de Jurkat, se realizaron experimentos de citotoxicidad para definir el intervalo de concentraciones de los xenobióticos en los que la viabilidad bacteriana no disminuye significativamente (Figuras 73, 74 y 75). En la mayor parte de los experimentos se determinó la viabilidad utilizando el fluorocromo PI como

marcador de células muertas. De esta forma no solo se pudo realizar las curvas de citotoxicidad, calcular la IC_{50} de la mayoría de los xenobióticos y establecer el intervalo de concentraciones, sino que se pudo determinar las características morfológicas para acotar la población de células bacterianas vivas y cuantificar en ellas la fluorescencia de los marcadores de ROS. Hay que destacar que el tratamiento con menadiona produjo efectos inesperados en las propiedades morfológicas de las bacterias que impidieron determinar con precisión la IC_{50} y establecer el intervalo de concentraciones para este xenobiótico, aunque estos efectos se manifestaron solo a las concentraciones más altas probadas de menadiona. Para resolver este problema, se realizaron una serie de experimentos citométricos de viabilidad basados en las combinaciones de los fluorocromos SYTO9/PI o DiBAC₄(3)/PI (Tabla 25 y Tabla 26). De esta forma se logró establecer el intervalo de concentraciones también para este xenobiótico y utilizar concentraciones de menadiona en las que la morfología bacteriana no se veía alterada, permitiendo acotar las células vivas.

4. Xenobióticos modelo elegidos como inductores exógenos de estrés oxidativo

4.1. H_2O_2

Muchos tipos de células generan niveles bajos de H_2O_2 en respuesta a diversos estímulos extracelulares, como citocinas, factores de crecimiento y agonistas de los receptores GPCR, por lo que el H_2O_2 se considera como un segundo mensajero involucrado en la transducción de señales (Marinho et al., 2014). Una de las principales fuentes intracelulares de H_2O_2 es la familia NOX, que catalizan la reducción de O_2 usando NADPH para formar el $O_2^{\cdot-}$, que a su vez, es dismutado a H_2O_2 por las diferentes SOD celulares (Vermot et al., 2021).

Las propiedades específicas de H_2O_2 están determinados principalmente por su reactividad, su potencial redox y su estabilidad relativa (en comparación con otras ROS) en las células, así como su capacidad de difusión a través de las membranas. Es por ello que es un agente oxidante débil (Bienert et al., 2006; Rhee, 1999). A concentraciones fisiológicas es un oxidante relativamente suave que puede oxidar los residuos de Cys de las proteínas o formar puentes disulfuro, que pueden reducirse de nuevo mediante donantes celulares de tioles, como GSH, Grx y Trx. Por ello, el H_2O_2 exógeno modula (activa o inhibe) la actividad de numerosas proteínas intracelulares y de membrana (Davies, 2016).

Discusión

La relevancia del H_2O_2 en el estrés oxidativo deriva de su participación en la producción del altamente reactivo $\text{OH}\cdot$ generado por la reducción de un electrón en presencia de metales de transición (Liochev, 1999). Debido a su vida media extremadamente corta, $\text{OH}\cdot$ es efectivo solo cerca del lugar de su producción (Bergendi et al., 1999).

La eliminación de H_2O_2 en las células está mediada predominantemente por catalasa, GPx y Prx. La catalasa se localiza exclusivamente en peroxisomas, la principal isoforma de GPx se encuentra en el citosol y las mitocondrias, mientras que las seis isoformas de Prx se distribuyen por todo el citosol, las mitocondrias y el retículo endoplásmico (Pham-Huy et al., 2008; Valko et al., 2007).

Cuando las células están expuestas a H_2O_2 externo, el consumo intracelular de H_2O_2 es catalizado por enzimas antioxidantes intracelulares que establecen un gradiente a través de las membranas celulares. Los datos publicados demuestran que, tanto en Jurkat como en *E. coli*, el H_2O_2 atraviesa rápidamente las biomembranas, pero con una capacidad de difusión y acumulación bastante limitada. Como consecuencia, los efectos de $\text{OH}\cdot$ inducidos por H_2O_2 exógeno sobre moléculas adyacentes, se producen a velocidades controladas por difusión (Bienert et al., 2006).

4.2. Peróxidos orgánicos

Los peróxidos orgánicos son compuestos orgánicos que contienen el grupo funcional peróxido (ROOR'). Si R' es H, los compuestos se denominan hidroperóxidos (Uhl et al., 2018). El t-BOOH y el CHP se usan comúnmente como xenobióticos modelo para la inducción y estudio del estrés oxidativo. t-BOOH y CHP se metabolizan por dos rutas y ambas inducen estrés oxidativo (Ayala et al., 2014).

El primero, proporcionado por CYP, conduce a la producción de $\text{ROO}\cdot$ y $\text{RO}\cdot$. Estos radicales inician la lipoperoxidación de los fosfolípidos de membrana con alteraciones posteriores de fluidez y permeabilidad. La segunda vía depende de GPx, produciendo alcoholes como forma de detoxificación. Estos radicales inician la lipoperoxidación de los fosfolípidos de la membrana, induciendo alteraciones en la fluidez y permeabilidad de la membrana y generando ROS de forma secundaria (Ayala et al., 2014; Kučera et al., 2014).

4.3. Compuestos que generan superóxido por redox cycle

Muchos compuestos aromáticos se reducen enzimáticamente para formar radicales libres, actuando, en general, como donantes de electrones múltiples. Estos radicales

libres reducen el O_2 a $O_2^{\cdot-}$ y regeneran el compuesto original sin cambios. Este proceso se conoce como redox cycling. En nuestro estudio hemos seleccionado compuestos que sufren redox cycling y que son comúnmente empleados en la inducción de estrés oxidativo (Blanco et al., 1998) con diferente estructura y mecanismo oxidativo, incluyendo paraquat, perteneciente a la familia de los biperidilos y las naftoquinonas plumbagina y menadiona.

El redox cycle del paraquat tiene dos consecuencias potencialmente importantes para el desarrollo de la toxicidad: la generación del $O_2^{\cdot-}$ y la oxidación de equivalentes reductores, lo que deriva en la interrupción de importantes procesos bioquímicos que requieren NADPH para la correcta función celular (Bonneh-Barkay et al., 2005; Morán et al., 2010). Los radicales de paraquat también son capaces de reaccionar con una variedad de nucleófilos en las células, causando daño directo a los componentes celulares, un proceso que contribuye a la toxicidad (Figura 96) (Fussell et al., 2011).

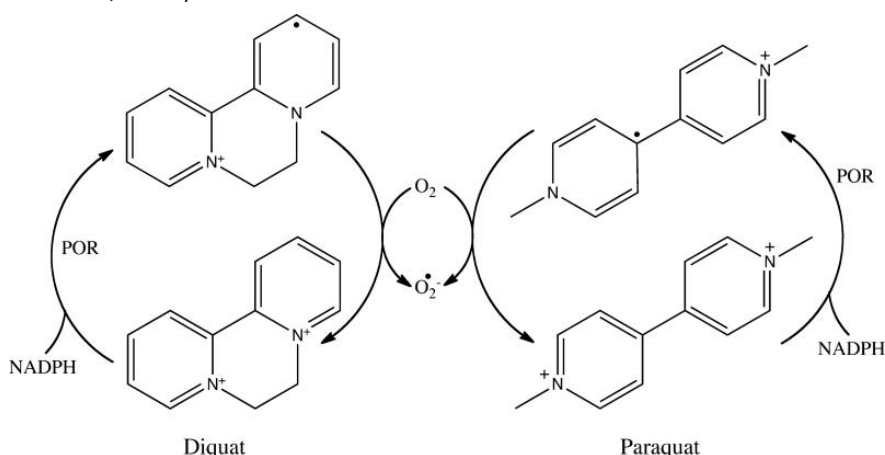


Figura 96: Esquema del redox cycling del paraquat y su biperidínilo homólogo diquat. Tomado de Fussell et al., 2011.

Los compuestos modelo menadiona y plumbagina son sustrato de redox cycle catalizados por diversas enzimas reductoras, incluida la NADPH-citocromo P450 reductasa microsomal y la NADH-ubiquinona oxidorreductasa mitocondrial (o complejo I). Las semiquinonas inestables resultantes pueden entrar fácilmente en un redox cycle en presencia de O_2 , provocando una regeneración de la quinona, con la producción concomitante de ROS. Cuando la hidroquinona y la quinona están presentes, forman una especie de anión radical de semiquinona transitoria, que reacciona con O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$ y regenerar el radical de quinona. El $O_2^{\cdot-}$ producido

las tres cepas bacterianas, pero con una citotoxicidad ligeramente mayor en las bacterias. Sin embargo, t-BOOH y, sobre todo, H_2O_2 , fueron mucho menos tóxicos para *E. coli* que para Jurkat. El orden creciente de citotoxicidad (menor IC_{50}) de los compuestos también fue diferente entre Jurkat y *E. coli*.

- Células Jurkat: $CHP \gg H_2O_2 > t-BOOH$
- Cepas de *E. coli*: $CHP \gg t-BOOH \gg \gg H_2O_2$

Con respecto a los compuestos de ciclo redox menadiona, plumbagina y paraquat utilizados en diversos experimentos de esta Tesis, no hemos podido determinar de forma sistemática los parámetros obtenidos para los peróxidos. En las células Jurkat, tanto la menadiona como la plumbagina resultaron muy poco tóxicas, haciendo imposible calcular sus valores de IC_{50} , ya que se había alcanzado el límite de solubilidad de estos compuestos sin encontrar efecto citotóxico ($IC_{50} > 800 \mu M$).

Hay que destacar que no fue posible caracterizar en las cepas bacterianas la toxicidad de paraquat y menadiona con el mismo protocolo citométrico (viabilidad con PI) utilizado para los peróxidos, al producirse cambios morfológicos inesperados tras el tratamiento, que hacían imposible acotar la población de bacterias individuales para cuantificar la viabilidad. Los estudios de citotoxicidad para establecer un intervalo de concentraciones se realizaron con métodos convencionales de estimación de citotoxicidad en presencia de los compuestos, como son las curvas de crecimiento o el recuento de UFC (Figuras 79 y 80). Además de han completado con técnicas citómicas, con fluorocromos basados en la integridad de membrana SYTO9/PI y en el potencial de membrana, DiBAC₄(3) (Léonard et al., 2016; Robertson et al., 2019; Stiefel et al., 2015).

La toxicidad diferencial de los distintos compuestos oxidantes podría deberse, en principio, a diferencias en su accesibilidad a las dianas celulares, en su potencia oxidante y/o en la capacidad antioxidante de las células expuestas a ellos (Jovanovic & Jovanovic, 2013; Pardillo-Díaz et al., 2015; Sawada et al., 1999).

Para intentar entender los efectos de moléculas activas de características fisico-químicas tan dispares como son H_2O_2 y los peróxidos orgánicos t-BOOH y CHP, es importante considerar el papel de su lipofilicidad y su capacidad de penetración o transporte a través de membranas. En este sentido, un estudio antiguo (Jeroen et al., 1992), demostró diferencias en los efectos oxidativos de CHP y H_2O_2 y en la cinética

Discusión

de su acción en un modelo sencillo de eritrocitos. A concentraciones de oxidante comparables, el estrés oxidativo inducido en la membrana siempre fue mucho mayor con CHP, mientras que con H_2O_2 se observaron efectos oxidativos intracelulares. La acción intracelular de CHP se caracterizaba por una reacción gradual, generando radicales que producen un estrés oxidativo iniciado en la membrana, que aumenta en el tiempo hasta un máximo y luego disminuye gradualmente. Por el contrario, H_2O_2 reaccionaba rápidamente generando radicales muy reactivos hacia componentes intracelulares y no a la membrana, como objetivo principal. El estrés oxidativo inducido por H_2O_2 era máximo inmediatamente después de la adición y desaparecía rápidamente (van den Berg et al., 1992).

La lipofilidad relativa de un compuesto químico se expresa mediante su coeficiente de reparto (Kow), que es la relación de concentraciones del compuesto entre la fase acuosa (w) y la fase orgánica (o) en un sistema de dos disolventes (octanol y agua) inmiscibles en equilibrio. La Tabla 28 permite comparar la lipofilidad (Kow) de los compuestos modelo empleados y su citotoxicidad en células Jurkat y en las cepas de *E.coli* WP2. Los datos tabulados muestran una clara correlación positiva entre la lipofilidad de los tres peróxidos estudiados y su toxicidad sobre *E. coli*, sugiriendo la mayor importancia cuantitativa de los efectos peroxidativos sobre la membrana bacteriana y/o la mayor eficacia de los sistemas de protección (dependientes o no de OxyR) contra los efectos intracelulares de H_2O_2 que contra la peroxidación de membrana.

Aunque no hemos podido realizar un estudio teórico similar con los compuestos de redox cycle empleados, es interesante que, para la menadiona, tanto la lipofilidad como la citotoxicidad son muy similares a las del CHP, apoyando la mayor relevancia en *E. coli* del estrés oxidativo iniciado en membranas.

La correlación entre lipofilidad y citotoxicidad no se sigue estrictamente en células Jurkat, ya que H_2O_2 , que es mucho menos lipofílico que los hidroperóxidos orgánicos, presenta una citotoxicidad intermedia entre CHP y t-BOOH. Sin embargo, se mantiene la correlación entre lipofilidad y citotoxicidad cuando se comparan CHP y t-BOOH. Estos datos muestran la mayor complejidad de los procesos de estrés oxidativo en las células eucarióticas, apuntando hacia una mayor relevancia cuantitativa de los mecanismos oxidativos intracelulares de H_2O_2 , al menos en la línea celular utilizada en esta Tesis.

Tabla 28: Comparación entre la lipofilidad (Kow) de los compuestos modelo empleados y su citotoxicidad en células Jurkat y en las cepas de *E.coli* WP2. Los valores del coeficiente de reparto se expresan en forma logarítmica (Log P).

Compuesto	Kow (Log P)	Jurkat (IC ₅₀ mM)	IC188 (IC ₅₀ mM)	IC203 (IC ₅₀ mM)	IC5233 (IC ₅₀ mM)
H ₂ O ₂	-1,36	28,18	1.342,76	1330,45	847,23
t-BOOH	0,94	86,30	201,37	172,98	199,07
CHP	2,16	10,50	7,45	6,21	7,32
Paraquat	-4,22	---	---	---	---
Menadiona	2,2	> 0,80	> 2,35	---	---
Plumbagina	3,04	> 0,80	---	---	---

Los valores del coeficiente de reparto para cada compuesto se obtuvieron del repositorio PubChem (2022a-2022e), excepto para la plumbagina (Rajalakshmi et al., 2018).

La gran diferencia en la citotoxicidad del H₂O₂ en los dos modelos celulares pudiera deberse a diferencias en la permeabilidad de este peróxido hidrosoluble a través de las membranas de Jurkat y de *E. coli*. Como ya se comentó, el H₂O₂ es permeable a las membranas en ambos tipos celulares, con capacidad de difusión y acumulación bastante limitadas. En el caso de Jurkat, el coeficiente de permeabilidad de H₂O₂ a través de la membrana plasmática es de 2×10^{-4} cm/s (Bienert et al., 2006), mientras que para *E. coli* K12 se ha descrito un coeficiente de permeabilidad de $1,6 \times 10^{-3}$ cm/s (Seaver & Imlay, 2001a). Estos valores implican que la capacidad de entrada de H₂O₂ a través de la membrana de Jurkat es unas 10 veces menor que a través de la membrana de *E. coli*. Teniendo en cuenta que la toxicidad de H₂O₂ es unas 15 veces mayor en Jurkat, no existe correlación entre la capacidad relativa de penetración del H₂O₂ y su toxicidad diferencial en ambos tipos celulares, indicando que las diferencias se deberían a los propios mecanismos de toxicidad oxidativa y/o defensa antioxidante de ambos modelos.

Con respecto a los efectos sobre el estrés oxidativo de las manipulaciones genéticas en nuestro modelo bacteriano, se observa que los valores de IC₅₀ de los tres tóxicos no son muy diferentes en las tres cepas estudiadas, excepto para H₂O₂, que fue más tóxica para la cepa triple deficiente IC5233, como cabía esperar, pero no más tóxica para la cepa deficiente en OxyR (IC203) con respecto a la cepa salvaje IC188. Esta observación sugiere que la sola deficiencia en la función OxyR no desprotege frente

Discusión

a H_2O_2 , aunque sí representa una desventaja frente a los efectos de los peróxidos orgánicos, como muestran las IC_{50} menores en esta cepa de t-BOOH y CHP.

E. coli expresa una AhpCF así como HPI y HPII para detoxificar H_2O_2 , con diferente regulación y mecanismo de reacción. OxyR induce la expresión de AhpCF y HPI en condiciones de estrés oxidativo, mientras que HPII aumenta en la fase estacionaria y no se sobreexpresa en presencia de H_2O_2 . Se ha demostrado que AhpCF actúa como el eliminador principal de H_2O_2 endógeno y es eficaz para desintoxicar concentraciones bajas de H_2O_2 (<20 μ M), mientras que la catalasa domina en la eliminación a concentraciones más altas (>50 μ M), como cabría esperar en nuestras condiciones experimentales, lo que apoyaría el papel mayoritario de catalasa HPII en la cepa IC203 (Adolfson & Brynildsen, 2015; Seaver & Imlay, 2001b; Sen & Imlay, 2021).

5. Fluorocromos y sustratos fluorogénicos elegidos para la determinación de ROS y RNS

El tercer aspecto clave del diseño experimental de esta Tesis abarca la selección y utilización de los fluorocromos para el estudio citométrico de la producción de ROS y RNS inducida por los xenobióticos en ambos modelos experimentales. En el estudio se han incluido una serie de fluorocromos o sustratos fluorogénicos ampliamente usados en CMF, seleccionados mediante una serie de criterios relacionados con la experiencia previa de nuestro laboratorio y con los datos de la literatura sobre sus características espectrales, sus mecanismos químicos de reacción, su localización subcelular y su especificidad relativa hacia las diferentes ROS y RNS de relevancia (Hardy et al., 2018) como se resume a continuación:

- Características espectrales: Se han utilizado fluorocromos y sustratos fluorogénicos compatibles con el láser azul de argón a 488 nm, presente en todos los citómetros de flujo actuales. Se han incluido compuestos con emisiones de fluorescencia en las zonas verde (DHDCF, DHR123, MitoPY1, DAF-FM, CellROX Green y Oxidative Stress Green) y amarillo-naranja-rojo del espectro (HE, MitoSox Red, CellROX Orange, CellROX Deep Red y Superoxide Orange), para facilitar su posible combinación en paneles multicolor de estrés oxidativo.
- Mecanismos de detección: formas dehidro, boronato, DAF.

- Localización intracelular: citosólicos y mitocondriales.
- Especificidad relativa para los diferentes ROS y RNS.

Para evaluar las posibles interferencias en los resultados debidas a posibles interacciones entre ROS y RNS, secundarias a los procesos de estrés oxidativo y defensa antioxidante inducidos por los xenobióticos, además de los estudios iniciales a punto final (incubaciones de 30 o 60 minutos), hemos realizado experimentos cinéticos a corto plazo. Este tipo de experimentos podría aportar, además, información acerca de la mayor o menor eficacia de los fluorocromos para detectar efectos en tiempo real. Esta modalidad especial de estudio por CMF “Análisis In Fluxo” se utiliza con mucha frecuencia en nuestro laboratorio (Balaguer et al., 2017; Herrera et al., 2007; O’Connor et al., 2005).

Por último, el diseño experimental contemplaba un estudio dirigido al desarrollo de paneles de CMF multicolor para el análisis simultáneo de diversas ROS y RNS, aunque los inesperados resultados iniciales han planteado una serie de problemas técnicos que, sin embargo, podrían aportar información relevante acerca de las interacciones entre las especies reactivas a determinar y entre los propios marcadores fluorescentes. Por ello, en la última fase de la Tesis se ha realizado un estudio comparativo de los resultados obtenidos utilizando fluorocromos individuales o en combinaciones espectralmente compatibles.

5.1. Titulación de fluorocromos:

El primer punto que debe abordarse en la citometría funcional es evitar o cuantificar la influencia de las sondas en el sistema experimental. En el caso del estrés oxidativo, todos los sustratos fluorogénicos reducidos están sujetos a autooxidación, que normalmente produce 1O_2 , $O_2^{\cdot -}$ y por su dismutación, H_2O_2 . Si la tasa de autooxidación es significativa, puede resultar en una detección artificial de ROS y un problema especialmente importante para sondas como HE (Dębowska et al., 2015).

La concentración de la sonda también es relevante, ya que puede afectar la estequiometría del proceso en estudio. Además, las sondas fluorescentes en alta concentración pueden perturbar las células y ser tóxicas, así como afectar a la actividad de las enzimas productoras de ROS (Kauffman et al., 2016). Para minimizar estos problemas derivados de una concentración excesiva de sonda, inicialmente

Discusión

valoramos todos los reactivos fluorescentes utilizados en el estudio, tanto en el modelo de células Jurkat como en el modelo bacteriano (Apartados 2.1 y 5.4 de Resultados).

La titulación de fluorocromos es un procedimiento esencial cuando se establece una determinación basada en fluorescencia en CMF, con el fin de definir su concentración óptima para la tinción. Aunque este procedimiento se suele entender como exclusivo en el análisis inmunofenotípico (Cossarizza et al., 2019) en realidad debería aplicarse también a otras áreas de la CMF, como son los estudios funcionales aquí desarrollados.

Al establecer por titulación, tanto en las células Jurkat y en bacterias de tipo salvaje la concentración mínima de la sonda fluorescente requerida para la detección sensible de la especie reactiva utilizada para la titulación, se minimiza la unión inespecífica de ROS. La titulación también reduce el nivel de interferencia biológica de las sondas sobre las especies analizadas y aumenta la sensibilidad de detección. Hay que tener en cuenta que la mayoría de sustratos fluorogénicos usados en CMF de estrés oxidativo son formas químicamente reducidas, por lo que se comportan como teóricos “antioxidantes” que, en exceso, tamponarían las ROS generadas por el proceso oxidativo inducido (O’Connor et al., 2017).

5.2. Consideraciones sobre los resultados

De acuerdo con las consideraciones comentadas en los puntos anteriores, se percibe que nuestro diseño experimental ha sido muy complejo, incluyendo distintos experimentos con dos líneas celulares tumorales (Jurkat y N13), diferentes cepas, once sondas fluorescentes, diferentes concentraciones de nueve inductores de ROS o RNS y experimentos a tiempo final o en cinética. Para poder normalizar y comparar entre sí los resultados de todas y cada una de las condiciones experimentales se han cuantificado los resultados de fluorescencia como ratios o cocientes entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra tratada y la intensidad del correspondiente tubo control no tratado, pero teñido en las mismas condiciones.

Las Tablas 29 y 30 presenta un resumen semicuantitativo de los valores de ratio para cada pareja sonda fluorescente/oxidante en función de los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo de tiempo final sobre las células Jurkat (Tabla 29) y las tres cepas de *E. coli* WP2 (Tabla 30). La comparación visual de los diferentes resultados permite evaluar, de forma general, la mayor o menor sensibilidad y

especificidad de las sondas utilizadas. Por otra parte, el análisis de estas tablas permite identificar combinaciones de sondas/xenobióticos prooxidantes que puedan resultar de interés, por su mayor sensibilidad, para estudios citométricos relacionados con el estrés oxidativo.

Tabla 29: Resumen semicuantitativo de los valores de ratio para cada pareja sonda fluorescente/oxidante en función de los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo de tiempo final sobre las células Jurkat. Símbolos: (-): Ratio de 1 a 2; (+): Ratio de 2 a 5; (++) : Ratio de 5 a 15; (+++): Ratio de 15 a 30; (++++): Ratio de 30 a 60.

	H ₂ O ₂	t-BOOH	CHP	Menadiona	Plumbagina
DHDCF	+	++++	++	+	+
DHR123	+	+++	++++	++	+
MitoPY1	++	+	+	+	-
HE	-	+	+	+	+++
MitoSox Red	-	+	+	++	++

Tabla 30: Resumen semicuantitativo de los valores de ratio para cada pareja sonda fluorescente/oxidante en función de los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo de tiempo final sobre las cepas bacterianas IC188 (Control), IC203 (deficiente en *oxyR*) e IC5233 (deficiente en *oxyR*, *sodA* y *sodB*). Símbolos: (-): Ratio de 1 a 2; (+): Ratio de 2 a 5; (++) : Ratio de 5 a 15; (+++): Ratio de 15 a 30; (++++): Ratio de 30 a 60. ND: No determinado.

		H ₂ O ₂	t-BOOH	CHP	Menadiona	Paraquat
DHDCF	IC188	+	+	+	+	
	IC203	++	++	+	+	ND
	IC5233	++	+++	+	+	
MitoPY1	IC188	++	+	-		
	IC203	+++	+	-	ND	ND
	IC5233	++++	++	-		
HE	IC188	++	++	++	+	-
	IC203	++	++	++	++	+
	IC5233	++	++	++	++	+

Discusión

Nuestros resultados son consistentes con una mayor sensibilidad y especificidad de la sonda MitoPY1 para la detección de H_2O_2 (Tabla 30), especialmente en el modelo bacteriano (Figura 85) y en los experimentos cinéticos con células de hepatoma N13 (Figura 54). De hecho, MitoPY1 es un indicador fluorescente quimioselectivo de la familia de los arilboronatos, con una selectividad mejorada para H_2O_2 sobre otras ROS, basada en la transformación selectiva de arilboronatos en fenoles mediada por H_2O_2 (Dickinson & Chang, 2008). MitoPY1 es una sonda diseñada para su localización mitocondrial por lo que probablemente detecta H_2O_2 que accede a la mitocondria (Zhao, 2009), lo que explicaría la baja respuesta de MitoPY1 frente a los hidroperóxidos orgánicos y a los compuestos de ciclo redox, que generan inicialmente H_2O_2 en los entornos de membrana e inician reacciones en cadena que conducen a la difusión de ROS y la generación del altamente reactivo OH \cdot .

Por tanto, nuestros resultados generales confirman la especificidad de MitoPY1, sonda de emisión verde, como sensor de H_2O_2 intramitocondrial ya descrita en células de mamíferos (Xu et al., 2016) y permiten extenderla a un modelo bacteriano de acumulación intracelular de H_2O_2 . De hecho, MitoPY1 revela claramente diferencias de respuesta al H_2O_2 en las cepas deficientes en los genes *oxyR* (IC203) y *oxyR*, *sodA* y *sodB* (IC5233) con respecto a la cepa de control IC188. Por el contrario, sugerimos que MitoPY1 no sería la sonda fluorescente de elección para estudios de estrés oxidativo inducidos por peróxidos orgánicos o compuestos de redox cycle.

Es interesante comparar el comportamiento de MitoPY1 con el de DHR123, sonda de localización igualmente mitocondrial, pero de especificidad más amplia (Wardman, 2008; Wrona et al., 2005). Como puede verse (Tabla 29), DHR123 es más sensible en células Jurkat a los peróxidos orgánicos, t-BOOH y CHP, que al H_2O_2 , lo que confirma su falta de selectividad hacia H_2O_2 . De hecho, en los experimentos cinéticos con células N13, la respuesta de DHR123 al H_2O_2 es muy baja, mientras que responde muy eficazmente en dicho modelo a la adición del peróxido orgánico CHP. No disponemos de datos con DHR123 en el modelo de cepas bacterianas.

El comportamiento de la sonda mitocondrial DHR123 ha sido muy semejante al de la sonda de localización citosólica DHDCF en casi todos los experimentos en los que ambas sondas se pueden comparar. Los cocientes de fluorescencia en células Jurkat tratadas con H_2O_2 , t-BOOH o plumbagina han sido comparables entre ambas sondas, con ligeras diferencias a favor de una u otra, así como en la respuesta cinética al H_2O_2 en el modelo de células N13. Hay que destacar la mayor sensibilidad

de DHR123 al CHP y a la menadiona. Por lo tanto, ambas sondas de emisión en verde podrían usarse con preferencia a MitoPY1 para estudios de estrés oxidativo que impliquen peróxidos orgánicos que actúan a través de mecanismos parcialmente independientes de H_2O_2 .

Los resultados confirman las advertencias con respecto a DHDCF y DHR123, posiblemente las sondas más utilizadas para detectar estrés oxidativo intracelular. Tradicionalmente se ha supuesto que ambas sondas son oxidadas por H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Gomes et al., 2005; Keston & Brandt, 1965). Sin embargo, ninguna de ellas reacciona directamente con H_2O_2 en ausencia de peroxidasas y la fluorescencia de sus productos intracelulares no es una medida directa de H_2O_2 (Soh, 2006; Wardman et al., 2002). Incluso si la oxidación de las sondas también sucede por acción de H_2O_2 o $O_2^{\cdot -}$ en presencia de Fe^{2+} , el OH^{\cdot} es el responsable de dicha oxidación (Gomes et al., 2005). Esto está de acuerdo con que, en experimentos previos de nuestro grupo, los mutágenos oxidativos sensibles a catalasa fueron pobres inductores de mutaciones derivadas de lesiones de 8-oxoguanina en la cepa IC203, mientras que dichas mutaciones fueron inducidas eficientemente por hidroperóxidos orgánicos (Martínez et al., 2000).

Los fluorocromos de emisión naranja-rojo HE y su derivado de localización mitocondrial MitoSox Red se utilizan ampliamente en CMF como indicadores de elevada especificidad hacia el $O_2^{\cdot -}$ (Benov et al., 1998; Robinson et al., 2008). En consonancia con esta idea, se ha mostrado mayor respuesta en la sonda MitoSox Red al inducir con menadiona y mayor especificidad de HE con plumbagina, ambos xenobióticos dadores de $O_2^{\cdot -}$. En base a estas observaciones, se podría recomendar estas sondas para su uso en estudios de estrés oxidativo en los que se desee cuantificar la generación de $O_2^{\cdot -}$. Un estudio en células HT22 expuestas a menadiona mostraron una acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en las mitocondrias (Fukui et al., 2012). Esto se relaciona con lo observado en las células Jurkat, con mayores cocientes de MitoSox Red, sonda mitocondrial, tras la incubación con menadiona.

En consonancia con la especificidad de HE y MitoSox Red, los resultados con Jurkat (Figuras 33) y en los experimentos cinéticos de N13 (Figura 54) muestran la muy baja respuesta de ambas sondas al tratamiento con H_2O_2 . Sin embargo, ambas presentan respuestas débiles, pero dosis-dependientes, frente a todos los agentes prooxidantes utilizados en el modelo de células Jurkat.

Por otra parte, en el modelo de cepas bacterianas, aunque no disponemos de

Discusión

datos para MitoSox Red, la HE respondió a todos los agentes oxidantes utilizados, con diferentes niveles de intensidad, lo que plantea problemas a la hora de su aplicabilidad directa como sensor específico de $O_2^{\cdot -}$ y requiere una revisión cuidadosa del modelo experimental elegido, para evaluar si el mecanismo oxidativo asociado implica o no la eventual generación de $O_2^{\cdot -}$ e interpretar los resultados obtenidos con HE.

Creemos que el modelo elegido en este trabajo no es lo suficientemente específico para evaluar con precisión la utilidad de HE y MitoSox Red y planteamos futuros experimentos, sobre todo de tipo cinético, utilizando sistemas generadores exclusivamente de $O_2^{\cdot -}$, como son el sistema XO o la adición de $O_2^{\cdot -}$ exógeno.

Durante el desarrollo de nuestro estudio pudimos disponer de forma puntual y limitada de dos series de sondas fluorescentes para la detección de ROS, en concreto los productos de la familia CellROX Oxidative Stress Reagents, comercializados por ThermoFisher (Thermofisher, 2022) y los reactivos incluidos en el sistema ROS-ID® Total ROS/Superoxide detection kit, comercializado por Enzo Lifesciences y presentado como un ensayo simple y específico para la medición en tiempo real de los niveles globales de ROS y específicamente $O_2^{\cdot -}$ en células vivas (Enzo Lifesciences, 2022).

Los reactivos de estrés oxidativo CellROX son sustratos fluorogénicos diseñados para detectar ROS en células vivas. Los reactivos permeables a las células no son fluorescentes o tienen una fluorescencia muy débil, mientras que en un estado reducido y tras la oxidación muestran una fuerte señal fluorogénica. CellROX Green Reagent tras la oxidación, se une al ADN y su señal se localiza principalmente en el núcleo y las mitocondrias. Por el contrario, las señales de los reactivos CellROX Deep Red y CellROX Orange se localizan en el citoplasma (Thermofisher, 2022b).

En cuanto a los reactivos de Enzo Lifesciences, Oxidative Stress Green es una sonda fluorogénica y permeable a las células, que reacciona directamente con una amplia gama de ROS y RNS, generando un producto verde fluorescente indicativo de la presencia intracelular de diferentes tipos de ROS/RNS (Egawa et al., 2021). El reactivo Superoxide Orange, es una sonda permeable a las células que reacciona específicamente con el superóxido y genera un producto fluorescente de color naranja (Ding et al., 2015).

Los resultados obtenidos en nuestros estudios limitados con ambas familias

de productos (Figuras 34, 37 y 42) muestran que, en general, todas las sondas presentan intensidad media-baja en las respuestas a los diferentes prooxidantes utilizados, con una especificidad muy amplia hacia ellos, lo que está de acuerdo con las advertencias de los fabricantes, incluidas en la documentación de los reactivos y kits. Para tener una idea general de la aplicabilidad de estos reactivos, hemos establecido una ordenación de estos según la intensidad creciente de sus ratios de fluorescencia en presencia de distintos xenobióticos:

- **H₂O₂**: CellROX Green < Superoxide Orange < CellROX Orange ≈ CellROX Deep Red < Oxidative Stress Green.
- **t-BOOH**: CellROX Green < CellROX Deep Red < CellROX Orange ≈ Oxidative Stress Detection Reagent ≈ Superoxide Orange.
- **Menadiona**: Oxidative Stress Green < CellROX Green ≈ CellROX Deep Red ≈ CellROX Orange < Superoxide Orange.

5.3. Relevancia de los controles positivos y negativos en el estudio:

Como se ha comentado en la Introducción de esta Tesis, la inclusión de controles positivos y negativos en los estudios experimentales de estrés oxidativo es importante para validar los aspectos metodológicos o técnicos de los experimentos y para interpretar los datos obtenidos en ellos (O'Connor et al., 2017).

Se podría considerar que, en sí misma, esta Tesis es un ejercicio sistemático de validación de protocolos citométricos, utilizando como controles positivos de estrés oxidativo, una serie de compuestos prooxidantes ampliamente empleados por sus características físico-químicas, su reactividad y sus mecanismos bioquímicos de acción. Por otra parte, hemos incluido de forma no sistemática algunos experimentos que sirven de prueba de concepto sobre la relevancia de otros controles, positivos y negativos, para validar las cuestiones técnicas de nuestros métodos y proporcionar información acerca de los reactivos fluorescentes y los modelos experimentales.

Hemos llevado a cabo tres pruebas de concepto de aplicabilidad de controles negativos en el modelo de células Jurkat, basados en el uso de una molécula antioxidante (NAC) o en la inhibición química de enzimas clave de la defensa antioxidante (SOD y catalasa), como se resume a continuación.

- Efecto de la molécula antioxidante soluble NAC

Discusión

El mecanismo antioxidante de NAC deriva de su papel como precursor de la Cys y el GSH intracelulares, y su capacidad de potenciar la captación de radicales libres, ya sea directamente a través del potencial redox de su propio grupo tiol, su transformación en grupos sulfénicos antioxidantes o a través del aumento de los niveles de GSH en las células (Alnahdi et al., 2019).

Como cabía esperar, el tratamiento previo de las células Jurkat con NAC disminuye marcadamente las respuestas de fluorescencia de MitoPY1 frente al H_2O_2 y de MitoSox Red frente a menadiona, dos compuestos solubles con mecanismos diferentes de producción de ROS. Por el contrario, el pretratamiento con NAC inhibe solo ligeramente (pero significativamente) la respuesta de DHR123 frente al hidroperóxido orgánico CHP, un prooxidante altamente lipofílico y que inicia la generación de ROS en el entorno de la membrana plasmática, como hemos comentado anteriormente en la Discusión.

– Efecto de la inhibición de SOD

DETC se ha utilizado ampliamente como inhibidor in vitro de la CuZnSOD, lo que conduce a la acumulación intracelular de radical superóxido (Arnelle et al., 1997; Maître et al., 1993). De acuerdo con el mecanismo de este inhibidor, el pretratamiento de las células Jurkat con DETC conduce a un aumento dosis-dependiente de la respuesta de MitoSox Red a la menadiona, un compuesto que genera $O_2^{\cdot -}$ durante su ciclo redox (Figura 52).

– Efecto de la inhibición de catalasa

El inhibidor irreversible de la catalasa 3-AT es una herramienta muy útil para estudiar mecanismos de estrés oxidativo en los que está implicado el H_2O_2 (Maître et al., 1993; Ruiz-Ojeda et al., 2016). Como cabía esperar, el tratamiento previo de las células Jurkat con 3-AT conduce a un aumento significativo y dosis-dependiente de la respuesta de MitoPY1 al H_2O_2 exógeno (Figura 53).

En futuros experimentos nos planteamos extender sistemáticamente la aplicación de controles negativos como los aquí comentados, basados en moléculas antioxidantes e inhibidores enzimáticos, a todas las condiciones experimentales del presente estudio.

5.4. Relevancia de los resultados obtenidos en el uso de cepas de *E. coli*

La CMF se ha convertido en una metodología de elección para la investigación en Bacteriología (Álvarez-Barrientos et al., 2000). En muchos casos, se han utilizado sondas fluorescentes para intentar definir la participación de la generación de ROS en bacterias (Herrera et al., 2003; Manoil & Bouillaguet, 2018; McBee et al., 2017). Sin embargo, la detección de ROS en bacterias es una tarea aún más compleja que en los modelos eucarióticos debido a las condiciones experimentales derivadas de la biología bacteriana. Además, la eficiencia y la especificidad de diferentes colorantes para detectar diferentes ROS in vitro rara vez se han establecido con confianza (Kalyanaraman et al., 2012), y mucho menos en bacterias.

Las respuestas al estrés oxidativo coordinadas por reguladores específicos, OxyR y SoxRS, aseguran la supervivencia bacteriana durante la exposición a ROS, ya sea exógena o generada durante la respiración normal. La respuesta reguladora de los genes de *E. coli* a $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 está mediada en gran medida por la inducción de SOD y catalasas (Imlay, 2008, 2015). Los genes de MnSOD son regulados por SoxRS mientras que HPI y AhpCF son regulados por OxyR (Pomposiello & Demple, 2001). OxyR protege a *E. coli* contra concentraciones normalmente letales de H_2O_2 o contra la destrucción térmica. La deficiencia de *oxyR* bloquea la síntesis de enzimas antioxidantes inducida por el estrés oxidativo y da como resultado un mayor contenido intracelular de ROS (Christman et al., 1985).

La cepa IC203, deficiente en OxyR, y su cepa precursora *oxyR*⁺ WP2 *uvrA*/pKM101 (IC188) es la base de un ensayo de reversión bacteriana desarrollado por nuestro grupo, el WP2 Mutoxitest, que se ha aplicado con éxito para evaluar la mutagenicidad oxidativa de un gran serie de compuestos químicos (Martínez et al., 2000). Descubrimos que muchos mutágenos oxidativos podrían reconocerse por su mayor respuesta mutagénica en IC203 que en IC188, incluidos los tres peróxidos utilizados en nuestro estudio: H_2O_2 , t-BOOH y CHP. Curiosamente para nuestros resultados, este estudio previo de nuestro grupo demostró que la mutagénesis por t-BOOH y CHP no fue inhibido por catalasa, lo que indica que la generación secundaria de H_2O_2 no estaba involucrada en los mecanismos oxidativos de esos hidroperóxidos orgánicos.

Estos resultados son consistentes con la alta sensibilidad y especificidad de la sonda MitoPY1 para la detección de H_2O_2 , respaldada por su muy baja capacidad frente a los

Discusión

hidroperóxidos orgánicos, como se muestra en las Figuras 85, 87 y 89. Por lo tanto, los datos generales obtenidos con la cepa IC203 permiten extender la especificidad de MitoPY1 para H_2O_2 a un modelo bacteriano controlado de actividad peroxidativa intracelular. Por otro lado, los resultados presentados en la Figura 85 confirman las limitaciones de la sonda DHDCF, que no reacciona directamente con H_2O_2 en ausencia de peroxidasa y $OH\cdot$ es responsable de dicha oxidación. Nuestros datos (Figura 87 y 89) muestran que el DHDCF es más sensible a los peróxidos orgánicos t-BOOH y CHP que al H_2O_2 , lo que confirma la falta de selectividad del DHDCF por el H_2O_2 . Por lo tanto, esta sonda debe usarse en lugar de MitoPY1 para estudios que involucren peróxidos orgánicos que actúan a través de mecanismos independientes de H_2O_2 .

La inclusión de la cepa IC5233 (WP2uvrA $\Delta oxyR/sodAB$ -/pKM101) en nuestro estudio aumentó la relevancia de nuestros datos. Las isoenzimas de la SOD son enzimas antioxidantes clave que se asocian a diferentes cofactores metálicos. La delección de los genes *sodA* y *sodB* además de *oxyR* hace que la cepa IC5233 sea hipersensible con respecto a la mutabilidad por H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, como consecuencia de la acumulación intracelular tanto de H_2O_2 como de $O_2^{\cdot-}$ después del tratamiento con una amplia gama de prooxidantes (Prieto-Alamo et al., 1993). La acumulación de ambos prooxidantes puede conducir a la generación del $OH\cdot$, un oxidante fuerte a través de la reacción de Haber-Weiss, catalizada por iones Fe^{3+} . De acuerdo con este mecanismo, la cepa IC5233 produjo los cambios más altos en las proporciones de fluorescencia de las sondas DHDCF y MitoPY1 (Figuras 85, 87 y 89), para todos los peróxidos exógenos, con la excepción de la detección de H_2O_2 por DHDCF.

Estos resultados respaldan aún más la utilidad de la serie de cepas mutantes de *E. coli* WP2 desarrolladas en nuestro laboratorio y nos permiten sugerir dos combinaciones alternativas de cepa/sonda fluorescente adecuadas para estudios in vitro de actividad peroxidativa por CMF. Por un lado, los procesos peroxidativos dependientes de H_2O_2 pueden investigarse utilizando la cepa IC5233 y la sonda fluorescente MitoPY1. Por otro lado, los mecanismos independientes de H_2O_2 pueden investigarse con la cepa IC5233 y DHDCF.

El análisis de los resultados obtenidos con la sonda HE sensible al $O_2^{\cdot-}$ proporciona información interesante tanto sobre la especificidad de esta sonda como sobre la implicación del $O_2^{\cdot-}$ en las acciones de los peróxidos exógenos ensayados.

La reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y HE genera un producto fluorescente rojo altamente específico,

2-hidroxi-etidio (2-OH-E⁺). Sin embargo, en los sistemas biológicos, también se forma otro producto rojo fluorescente, el etidio (E⁺), generalmente en una concentración mucho más alta que el 2-OH-E⁺. Si bien la mayoría de los informes anteriores indican que HE no reacciona fácilmente con H₂O₂, los peróxidos orgánicos pueden oxidar HE con la formación de un producto fluorescente en presencia de complejos de proteínas de Fe y/o hemo (por ejemplo, citocromos) o en sistemas celulares (Zielonka & Kalyanaraman, 2010).

La cepa triple mutante IC5233, en la que los niveles tanto de H₂O₂ como de O₂⁻ son los más altos, muestra cocientes de fluorescencia de HE similares o más bajos que la cepa IC203 deficiente en *oxyR* y, más sorprendentemente, la cepa de tipo salvaje IC188 después del tratamiento con peróxidos orgánicos. En ambos casos, sin embargo, las proporciones de fluorescencia dependen de la dosis de la concentración de peróxidos exógenos, lo que apunta hacia una oxidación independiente del O₂⁻ de HE para formar E⁺. Solo después del tratamiento con H₂O₂ pudimos observar un aumento de la fluorescencia de HE, lo que sugiere que, en estas condiciones, la oxidación de HE dependiente de O₂⁻ estaba implicada y la generación específica de 2-OH-E⁺ podría explicar la ligera diferencia entre la respuesta IC5233 e IC203 (Figura 86C).

Podemos concluir que el desarrollo de métodos capaces de correlacionar el estrés oxidativo con la respuesta bacteriana y la supervivencia ayudaría a comprender mejor el desarrollo de estrategias de detección para evaluar nuevos fármacos antibacterianos relacionados con el estrés oxidativo. En este sentido, tenemos previsto ampliar el presente estudio a otras cepas mutantes de nuestra colección y nuevas combinaciones de compuestos prooxidantes y sondas fluorescentes.

6. Relevancia de los resultados en los modelos de estrés nitrosativo

Por analogía con el estrés oxidativo, el concepto de estrés nitrosativo se basa en una sobreproducción de NO[•]; pero se entiende como el conjunto de mecanismos y las consecuencias de las reacciones bioquímicas mediadas por la interacción entre NO[•] y O₂⁻. Por ello, el estrés nitrosativo ejerce acciones en paralelo con el estrés oxidativo y contribuye a la disfunción mitocondrial, eventos inflamatorios y patología neurodegenerativa (Di Meo et al., 2016).

El ONOO⁻ producido durante el estrés nitrosativo puede nitrosilar biomoléculas

Discusión

como proteínas, lípidos y ADN, lo que conduce a disfunción y muerte celular (Szabó, 2003). Entre los efectos tóxicos del ONOO^- , la nitración de tirosina de proteínas y la nitración de ácidos grasos poliinsaturados son los más estudiados hasta la fecha. Se ha observado que la nitrosilación de proteínas ocurre *in vitro* e *in vivo* en condiciones fisiopatológicas. Sin embargo, el estrés nitrosativo también se ha relacionado con la regulación de la transducción de señales, la expresión génica y el crecimiento celular y la apoptosis y, por lo tanto, puede estar ampliamente implicado en las acciones fisiológicas y patológicas del NO^\cdot (Wang et al., 2021).

Para abordar por CMF el estrés nitrosativo en el modelo de células Jurkat hemos seguido dos aproximaciones *in vitro* complementarias. Por una parte, hemos utilizado un compuesto que genera exclusivamente NO^\cdot intracelular, el DEA NONOato y, por otra parte, el compuesto SIN-1, agente que libera simultáneamente NO^\cdot y $\text{O}_2^\cdot-$, que reaccionan muy rápidamente para producir ONOO^- . De esta forma contamos con un modelo de iniciación del estrés nitrosativo (DEA Nonoato) y un modelo de estrés nitrosativo en marcha (SIN-1), más relacionado con los aspectos lesivos del mismo.

Para la detección de NO^\cdot hemos utilizado un sustrato fluorogénico de muy alta especificidad y sensibilidad hacia el NO^\cdot . La sonda DAF-FM, permeable a la célula en forma de diacetato, es esencialmente no fluorescente hasta que reaccionan con NO^\cdot para formar un benzotriazol fluorescente (Balcerczyk et al., 2005). Como cabía esperar por las características de esta sonda, DAF-FM permitió detectar los niveles intracelulares de forma muy sensible, mientras que otros sustratos fluorescentes, como presentaron respuestas muy débiles (MitoPY1 y Oxidative Stress Green) o negativas (DHR123) (Figura 46). La superioridad de DAF-FM sobre DHRH123 se comprobó también en el experimento cinético con células N13 de hepatoma de rata (Figura 60). Estos datos confirman la elevada especificidad y sensibilidad de DAF-FM y permiten recomendar esta sonda para estudios dirigidos a cuantificar NO^\cdot intracelular.

Por otra parte, en un experimento independiente destinado a evaluar la sensibilidad de DHDCF hacia el NO^\cdot , pudimos observar la potente respuesta de esta sonda hacia el NO^\cdot generado por DEA NONOato lo que demuestra que DHDCF reacciona también con NO^\cdot , aumentando por tanto la incertidumbre sobre la significación de los resultados obtenidos cuando se aplica esta sonda (Crow, 1997).

En el modelo de SIN-1, caracterizado por la generación de ONOO^- , por el contrario,

DAF-FM presentó una respuesta muy débil, mientras que DHRH123 y, sobre todo, la sonda Oxidative Stress aumentaron notablemente su cociente de fluorescencia (Figura 48), confirmando que ambos reactivos pueden detectar la producción intracelular de ONOO⁻, como ya se había descrito, especialmente para la DHR123 (Wrona et al., 2005). La respuesta débil de DHDCF al SIN-1, indica que esta sonda reacciona débilmente en presencia de ONOO⁻ (Figura 49), reforzando su mayor especificidad relativa hacia el NO[•].

7. Relevancia del análisis cinético por CMF y problemas encontrados en su aplicación

7.1. Puesta en contexto de los ensayos cinéticos de estrés oxidativo

La experiencia previa de nuestro laboratorio nos mostraba que las determinaciones cinéticas por CMF proporcionan una herramienta simple y sensible para evaluar *in vitro* la evolución temporal y la intensidad de las respuestas dinámicas de las células (Herrera et al., 2007). En esta Tesis, hemos puesto a punto ensayos cinéticos por CMF con el modelo de células N13 de hepatoma de rata, que ya había sido utilizado en nuestro laboratorio para aplicaciones de RT-CMF relacionadas con el metabolismo oxidativo (Juan et al., 1996).

Como se desprende de los resultados presentados en el apartado 3 de Resultados esta Tesis, el análisis cinético ha permitido confirmar o interpretar algunos de los resultados obtenidos en los experimentos a punto final sobre la línea celular Jurkat con xenobióticos prooxidantes. En general, los estudios cinéticos revelan más claramente las características de sensibilidad y especificidad de las sondas fluorescentes empleadas para la detección de ROS y RNS. Gracias a estos estudios cinéticos sobre compuestos modelo de estrés oxidativo hemos presentado alguna prueba de concepto sobre su aplicabilidad al estudio de los fármacos propranolol y epinefrina (Figuras 56 y 58), cuyo efecto prooxidante había sido estudiado previamente en nuestro laboratorio (Carvalho, 2016) o a la detección de la producción endógena de ROS inducida por el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 59).

8. Problemas encontrados en los ensayos multiparamétricos de estrés oxidativo

La capacidad de análisis multiparamétrico es una de las ventajas más importantes de

Discusión

la CMF. Nos planteamos la posibilidad de combinar dos o más sondas fluorescentes, compatibles desde el punto de vista espectral y con distinta especificidad frente a ROS y RNS. Como muestran los datos recogidos en el apartado 4 de Resultados, durante la puesta a punto de los ensayos de tiempo final y cinéticos multiparamétricos hemos encontrado discrepancias sorprendentes al comparar las respuestas de los fluorocromos analizados individualmente o en parejas espectralmente compatibles. Dado que en tales experimentos se realizaba compensación de fluorescencia entre las parejas de fluorocromos, los datos obtenidos parecían sugerir la existencia de interferencias bioquímicas entre las sondas de cada pareja y/o de las sondas con el metabolismo de ROS y los procesos oxidativos inducidos por los xenobióticos (O'Connor et al., 2017).

Así, mientras que las distintas sondas fluorescentes respondían individualmente a la adición de compuestos prooxidantes como se esperaba, y como se puede comprobar en los apartados 2 y 3 de Resultados, las sondas en combinación espectral compatible con otras mostraron importantes aumentos o reducciones en la tasa de generación de fluorescencia inducida por el mismo prooxidante. La interpretación es complicada y requiere de experimentos posteriores. Para intentar comprender el sentido de las discrepancias inicialmente observadas, incluimos un estudio sistemático comparando varias parejas de sustratos fluorogénicos de diversa especificidad y localización intracelular frente a distintos xenobióticos prooxidantes.

Los efectos de interacción más claros se observaron en el estudio de tiempo final de los tres peróxidos utilizados previamente, es decir H_2O_2 , t-BOOH y CHP. En estos estudios, casi todas las sondas fluorescentes estudiadas en pareja presentaron una disminución muy marcada de su cociente de fluorescencia con respecto al cociente de sonda individual, con independencia del xenobiótico utilizado. Destacamos los siguientes efectos de las interacciones a punto final:

- La disminución del cociente de la sonda mitocondrial MitoPY1 al combinar con HE y MitoSox Red al inducir con los tres dadores de peróxidos. Este hecho podría interpretarse lógicamente como un efecto de competición entre las sondas por el H_2O_2 generado por los compuestos prooxidantes, habiendo demostrado previamente la especificidad de MitoPY1 por dicha especie reactiva.
- El cociente de fluorescencia de la sonda mitocondrial MitoSox Red aumentó

marcadamente en presencia de la sonda mitocondrial DHR123 cuando se utilizan t-BOOH o CHP como agentes inductores de ROS. Cabría suponer que esta sonda podría estar actuando como un potenciador de la respuesta de MitoSox Red.

- Las sondas HE y MitoSox Red disminuyen la respuesta de la sonda citoplasmática DHDCF, reduciendo el cociente de esta sonda fluorescente en el tratamiento con hidroperóxidos orgánicos, pero no con la incubación de H₂O₂ exógeno.

En los ensayos cinéticos llevados a cabo con los xenobióticos H₂O₂ y CHP no se muestran dichas discrepancias. Solo se muestran diferencias en la disminución de la sonda HE al combinarla con MitoPY1 tras la incubación con H₂O₂.

Las interacciones entre sondas en presencia de Menadiona y Plumbagina, que actúan a través de redox cycle (Apartado 4.4 y 4.5 de Resultados) fueron mucho más complejas y difíciles de resumir e interpretar. Para facilitar la integración de estos resultados, hemos diseñado dos figuras (Figura 98 y Figura 99) en las que los efectos mutuos de la interacción entre las sondas se visualizan de acuerdo a un código de colores que indica el sentido de la variación del cociente de cada sonda en pareja con respecto al cociente de la sonda medida en de forma individual. Como se puede apreciar en ambas Tablas, prácticamente en todas las combinaciones de sondas y oxidantes se detectaron variaciones del cociente que, además, tuvieron sentidos (aumento o disminución) diversos y fueron también bastante diferentes cuando se comparan los efectos de la menadiona y de la plumbagina.

MENADIONA	MITOPY	DHR123	DHDCF
HE	Blue	Red	Blue
MITOSOX	Blue	Red	Red

MENADIONA	HE	MITOSOX
MITOPY	Red	Blue
DHR123	Blue	Blue
DHDCF	Red	Red

Figura 98: Efecto de la menadiona sobre las variaciones en los cocientes de fluorescencia de las sondas fluorescentes cuando se utilizan en parejas. La presencia del fluorocromo de la fila afecta a la sonda de la columna. El color de las celdas indica el efecto de la interacción de una pareja de

Discusión

fluorocromos en relación con el cociente de fluorescencia de la sonda de la columna analizada individualmente. Las celdas en verde indican un aumento del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas rojas indican una disminución del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas azules indican ausencia de efecto del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila.

En presencia de menadiona, se producen los siguientes efectos de interacción entre las sondas:

- Las sondas mitocondriales MitoPY1 y MitoSox Red no compiten entre sí por las ROS generadas por la menadiona, ya que no altera sus cocientes de fluorescencia la combinación de ambas.
- La sonda de localización mitocondrial MitoSox Red podría ejercer un efecto antagonista sobre la detección de ROS por parte de las sondas DHDCF y DHR123, ya que la presencia de MitoSox Red disminuye el cociente de estas sondas, mientras que el propio MitoSox Red presenta el mismo cociente que cuando es analizado individualmente al combinar con DHR123, pero no en presencia de DHDCF, ya que disminuye.
- Las sondas HE y MitoSox Red podrían competir por las ROS generadas por menadiona con DHR123 como se refleja en la disminución de los cocientes de DHR123 al combinar con HE o MitoSox Red.

Plumbagina	HE	MITOSOX
MITOPY	Red	Blue
DHR123	Blue	Green
DHDCF	Red	Green

Plumbagina	MITOPY	DHR123	DHDCF
HE	Blue	Green	Blue
MITOSOX	Red	Green	Blue

Figura 99: Efecto de la plumbagina sobre las variaciones en los cocientes de fluorescencia de las sondas fluorescentes cuando se utilizan en parejas. La presencia del fluorocromo de la fila afecta a la sonda de la columna. El color de las celdas indica el efecto de la interacción de una pareja de fluorocromos en relación con el cociente de fluorescencia de la sonda de la columna analizada individualmente. Las celdas en verde indican un aumento del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas rojas indican una disminución del

cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila. Las celdas azules indican ausencia de efecto del cociente del fluorocromo de la columna en presencia del fluorocromo de la fila.

En presencia de plumbagina, las interacciones entre parejas de sondas fluorescentes son mucho más complejas que en los experimentos con menadiona.

- Se observan posibles efectos de competición de las ROS generadas por plumbagina, en las siguientes combinaciones de sondas fluorescentes: HE con DHDCF y MitoPY1. En combinación, el cocientes de HE disminuye frente a sus valor de cociente individual. Este es el resultado que se observa más frecuentemente al analizar las posibles combinaciones de sondas fluorescentes.
- La sonda mitocondrial DHR123 y la sonda citosólica DHDCF potencian la respuesta de la sonda mitocondrial MitoSox Red, aumentando el cociente de esta sonda fluorescente con respecto a al observado para el fluorocromo individual.
- Las sondas MitoSox Red y DHR123 parecen ser sinérgicas entre sí, ya que sus cocientes en combinación son en ambos casos mayores que los cocientes de las sondas fluorescentes analizadas individualmente.

En cuanto a los resultados de las interacciones de las sondas en los ensayos citómicos se observa el mismo patrón en cuanto al cociente de la sonda MitoPY1, cuya combinación con HE no genera ningún cambio frente a los valores de la sonda individual, pero existe una disminución de los valores de MitoPY1 al combinar con MitoSox Red. Las demás discrepancias entre las sondas con plumbagina (Tabla 20) son complejas.

Los datos aquí resumidos son de muy difícil interpretación y requieren de experimentos cuidadosamente diseñados y controles biológicos para poder extraer conclusiones sobre los mecanismos implicados y su posible significación biológica y metodológica. Sin embargo, es evidente que, en este momento, debemos ser escépticos sobre la posibilidad inmediata de aplicar paneles multiparamétricos para el estudio cuantitativo por CMF de la generación intracelular de ROS.

9. Integración de las estrategias citómicas en el análisis de estrés oxidativo

Los resultados de los análisis multiparamétricos con dos sondas fluorescentes ponen de manifiesto la complejidad de los mecanismos de generación y eliminación de ROS, que hacen que su cuantificación sea casi imposible en los sistemas celulares y sus microambientes. Sobre todo, nuestros resultados apuntan hacia el papel importante que pueden tener los reactivos fluorescentes utilizados en afectar el sistema biológico en estudio (O'Connor et al., 2017).

La CMF representa claramente la herramienta más rápida y potente para investigar ROS a nivel de una sola célula, permitiendo la generación de información múltiple sobre células individuales de una manera de alto rendimiento, con alta sensibilidad y reproducibilidad (De Biasi et al., 2016; Mukhopadhyay et al., 2007).

La investigación científica en el campo de las funciones biológicas asociadas a ROS requiere continuamente nuevas herramientas sensibles y específicas que puedan permitir una visión más profunda de sus mecanismos de acción. Sin embargo, las especies reactivas presentan algunas características que las hacen difíciles de detectar. Es, por tanto, imprescindible desarrollar metodologías capaces de superar este tipo de obstáculos. La metodología de fluorescencia, asociada con el uso de sondas adecuadas, es un excelente enfoque para medir ROS (Gomes et al., 2005).

La sonda fluorescente debe presentar una serie de criterios que debería cumplir para ser un indicador "ideal" de ROS. Estos criterios incluyen la selectividad para especies concretas de ROS, cinéticas rápidas y reversibles, con una compartimentación subcelular adecuada. También es deseable ser excitable a una longitud de onda visible, ser resistentes y no mostrar ninguna toxicidad en general y, en particular, fototoxicidad (Woolley et al., 2013).

Las características que debe presentar una sonda ideal se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31: Características de un marcador fluorescente ideal para detectar ROS (Woolley et al., 2013).

Características	
Quimioselectividad	Quimioselectividad para las ROS y sin reactividad cruzada entre ellas para distinguir correctamente las especies reactivas involucradas
Permeabilidad	Elevada permeabilidad de la membrana, pero poca difusión para permitir la localización de la reacción
Sensibilidad	Alta sensibilidad para detectar la concentración de ROS
Excitación/Emisión	Picos estrechos de espectros de excitación y emisión para permitir la detección simultánea de más de un fluorocromo
Fotoestabilidad	Baja fotooxidación
Fijación	Retención después de la fijación
Respuesta lineal	Relación lineal entre la señal fluorescente y la concentración de ROS para permitir estudios cuantitativos de la generación de ROS
Ruido de fondo	Baja autofluorescencia
No toxicidad	No toxicidad de la sonda para no interferir con otros procesos biológicos
Capacidad in vivo	Posibilidad del uso de la sonda en los estudios in vivo

Por nuestra experiencia en los estudios funcionales por CMF, a estos criterios se debe añadir el de no interferir con el proceso biológico en estudio (O'Connor et al., 2017). Además, como se discutirá a continuación, las principales limitaciones en las mediciones de ROS están relacionadas con la selectividad.

En la Figura 100 se presenta una descripción general de las principales vías de ROS y RNS para enfatizar los desafíos en el diseño y selección de sustratos fluorogénicos y para proporcionar un marco para evaluar la reactividad de los fluorocromos. En la respiración mitocondrial, el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el OH^{\cdot} se generan secuencialmente mediante una serie de reducciones parciales. La incorporación de un electrón en el O_2 da lugar a $O_2^{\cdot-}$, un radical poco reactivo con los compuestos biológicos. El $O_2^{\cdot-}$ da lugar a H_2O_2 por reacción espontánea o por la acción de SOD (Liochev & Fridovich, 2007). La SOD cataliza eficientemente la reacción (Figura 1, reacción 1) y por lo tanto constituye un controlador importante de la concentración de $O_2^{\cdot-}$ en las células (Fridovich, 1995).

El H_2O_2 presenta un desafío oxidativo importante, aunque es eliminado eficientemente por la GSH peroxidasa, la catalasa y la Trx peroxidasa (reacción

Discusión

2). Sin embargo, en presencia de metales redox (principalmente Fe(II) y Cu(I)), se generan OH· altamente reactivos a través de la reacción de Fenton (reacción 3) (Goldstein et al., 1993). El metal catalítico se puede reciclar con O₂^{·-} (reacción 4). En presencia de cloruro y mieloperoxidasa, H₂O₂ forma HOCl (reacción 5), un poderoso oxidante y agente clorante que reacciona rápidamente con O₂^{·-} para formar OH· (reacción 6). Debido a la alta reactividad de HOCl, es probable que su concentración sea generalmente baja. Por lo tanto, excepto en fagocitos, la reacción 6 no es una fuente significativa de OH· (Babior, 2000).

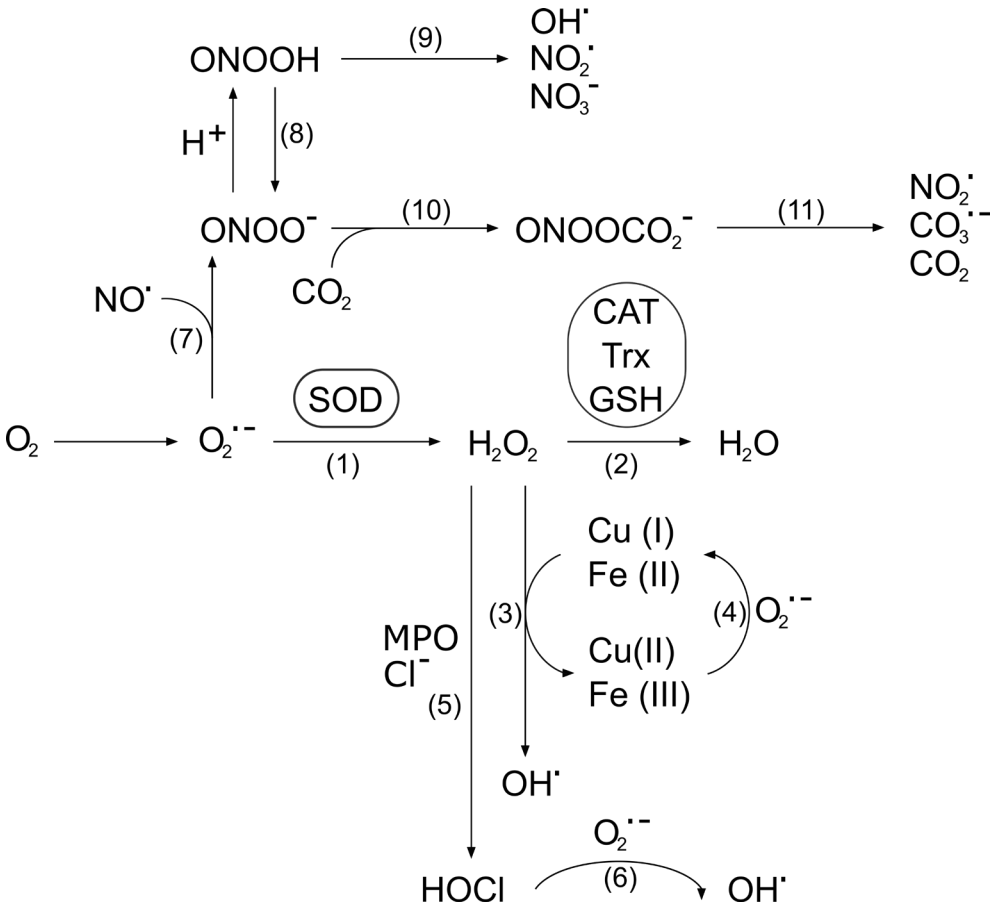


Figura 100: Principales vías de ROS y RNS.

El NO· reacciona con O₂^{·-} para formar ONOO⁻ (reacción 7). El ONOO⁻ existe en equilibrio rápido y dinámico con su conjugado ONOOH en condiciones fisiológicas. La vida media efectiva de ONOO⁻/ONOOH es de 0,7 segundos en ausencia de otros reactivos (reacción 8). Esta vida media es importante porque permite evaluar la

importancia de las vías alternativas de descomposición. El ONOOH puede formar OH \cdot , NO $_2\cdot$ y NO $_3\cdot$ (reacción 9) (Radi et al., 2001). Asimismo, el CO $_2$ reacciona con ONOO $^-$ para formar un intermediario inestable ONOOCO $_2^-$ (reacción 10) que se descompone para producir NO $_2\cdot$, CO $_3\cdot$ y CO $_2$ (reacción 11) (Denicola et al., 1996; Radi et al., 2001).

Por otra parte, es importante tener en cuenta la diferente velocidad de reacción de las sondas fluorescentes en combinación y su localización intracelular. Las ROS más reactivas alcanzan un estado estacionario en el que su tasa de generación es igual a su tasa de desaparición, siendo la tasa de desaparición la suma de las velocidades de reacción de la ROS con componentes del sistema, más la velocidad de autorreacción y más la velocidad de reacción con la sonda fluorescente (Wrona et al., 2005). Diferencias en la velocidad de reacción de las sondas hacia una misma ROS afectarían a la disponibilidad de esta ROS (o sus derivados con poder oxidante) para dichas sondas. Por ejemplo, MitoPY1 ha sido descrita como una sonda de ROS con cinética lenta de reacción (Dickinson et al., 2013). Hay que tener en cuenta que, dependiendo de las especies de ROS y los entornos celulares, la vida útil de una molécula de las especies reactivas en los sistemas biológicos varía de nanosegundos a segundos, un intervalo temporal compatible con la temporalización de eventos básicos en CMF: una vida media de nanosegundos del estado excitado de un fluorocromo y una duración de microsegundos del pulso de luz emitido en la secuencia de generación de datos por cada célula sucesiva (Shapiro, 2005).

Dado que las ROS de baja reactividad (incluyendo los productos secundarios de ROS de alta reactividad) se acumulan con el tiempo, exploraremos la posibilidad de incorporar a eventuales ensayos multiparamétricos sondas marcadoras de productos estables o finales de oxidación, como por ejemplo los fluorocromos cis-parinárico o C11-Bodipy, indicadores de peróxidos lipídicos en entornos de membrana, anticuerpos fluorescentes contra aductos oxidativos en lípidos, proteínas o ADN, o fluorocromos específicos de moléculas antioxidantes, como clorometil fluoesceína o monoclorobimano, que detectan GSH (O'Connor et al., 2017). Asimismo, con el objetivo de mejorar la detección de ROS y RNS, en los últimos años se han propuesto nuevas generaciones de sondas fluorescentes (Chen et al., 2011, 2016; Wu et al., 2019).

Nuestros estudios de interacción entre sondas muestran también la influencia que los reactivos ejercen sobre su entorno y que depende de sus características físico-

Discusión

químicas intrínsecas que, por otra parte, les confieren su capacidad de detección. Un indicador fluorescente de ROS es una molécula que debe competir con los antioxidantes y generar productos con fluorescencia modificada, que puedan ser visualizados y cuantificados (Dikalov & Harrison, 2014).

DHDCF es la sonda más utilizada para detectar H_2O_2 y estrés oxidativo. Sin embargo, la química redox intracelular de DHDCF es compleja y existen varias limitaciones (Bonini et al., 2006; Hempel et al., 1999). Es esencial tener en cuenta estas limitaciones para una interpretación adecuada de los datos obtenidos con la sonda. DHDCF no reacciona directamente con H_2O_2 para formar el producto fluorescente. Por lo tanto, la fluorescencia DHDCF no se puede utilizar como una medida directa de H_2O_2 . Además, varias especies oxidantes de un electrón oxidarán DHDCF. Estos incluyen $OH\cdot$, $HOCl$ formado a partir de la MPO (Kalyanaraman et al., 2012) y especies reactivas formadas a partir de la descomposición de peroxinitrito ($ONOO\cdot/ONOOH$) como $NO_2\cdot$ y $NO_3\cdot$ (Wrona et al., 2005). También DHDCF puede sufrir fotorreducción ya sea en presencia de luz visible, o por acción de la radiación UVA (Chignell & Sik, 2003).

Un aspecto relevante en el uso de la sonda DHDCF es que su radical intermediario, reacciona ávidamente con el $O_2\cdot^-$, generando O_2 . La dismutación de $O_2\cdot^-$ genera H_2O_2 , lo que puede amplificar la intensidad de la señal de fluorescencia (Folkes et al., 2009). Incluso metales como Fe^{2+} pueden promover la oxidación de DCFH en presencia de oxígeno o H_2O_2 (Qian & Buettner, 1999).

Con respecto a HE, se ha descrito que la sonda aumenta la tasa de dismutación de $O_2\cdot^-$ a H_2O_2 y que altas concentraciones de la sonda podrían conducir a un aumento de la fluorescencia independiente de $O_2\cdot^-$. Por otra parte, el citocromo c es capaz de oxidar a HE y a MitoSox Red, efecto que podría ser importante si el xenobiótico oxidante induce un proceso apoptótico en las células diana (Tarpey et al., 2004; Zielonka & Kalyanaraman, 2010).

Un aspecto a tener en cuenta en relación a las interferencias entre sondas es la diferente localización subcelular (citósol, mitocondria, núcleo) del sustrato fluorogénico y/o su producto final de oxidación. En principio, las interacciones entre sondas fluorescentes que ocupan el mismo entorno subcelular deberían ser estadísticamente más probables, aunque esta posibilidad está muy matizada por la diferente capacidad de difusión y vida media de las ROS primarias o secundarias, como hemos comentado.

La localización de la sonda o su producto oxidado también está relacionada con la capacidad de retención intracelular, especialmente en modelos oxidativos en los que puede producirse una alteración de la permeabilidad de la membrana. Por ejemplo, la oxidación intracelular de DHDCF tiende a ir acompañada de fugas del producto oxidado, mientras que los productos fluorescentes de HE y MitoSox Red quedan retenidos por su intercalación con el DNA genómico o mitocondrial (Gomes et al., 2005).

Otro aspecto a tener en cuenta en la interacción entre sondas de localización mitocondrial (MitoPY1 o DHR123 con MitoSox Red) es el posible efecto de estas sondas sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las sondas de localización mitocondrial son moléculas con grupos catiónicos (trifenilfosfonio para MitoSox Red y MitoPY1; grupo imino para la DHR123) que son atraídos por la carga eléctrica negativa generada por la respiración mitocondrial. Una entrada excesiva de sonda de carga positiva podría reducir la carga negativa neta de la mitocondria y disminuir la captación de nuevas moléculas catiónicas.

En nuestros futuros experimentos tendremos en cuenta estas consideraciones para intentar discernir y, si es posible, evitar o corregir, las causas de interferencia que impiden aplicar paneles multicolor para la detección precisa de producción de ROS. Para ello proponemos utilizar sistemas más específicos de generación de ROS, utilizar las tecnologías de citometría de imagen en flujo y de análisis de alto contenido por bioimagen, ambas disponibles en nuestros laboratorios y aprovechar las características únicas de nuestra colección de cepas de *E. coli* WP2 con deficiencias únicas o múltiples en genes de la defensa antioxidante.

9.1. Propuesta de paneles de análisis in vitro de ROS y RNS por CMF

Posiblemente, la aplicación más frecuente y estandarizada de la CMF en el estudio del estrés oxidativo sea el análisis *ex vivo* del estallido respiratorio en fagocitos humanos y su papel diagnóstico o pronóstico en patologías como la Enfermedad Granulomatosa Crónica y la sepsis (Cossarizza et al., 2019). En el área de la Biología Celular y la Biotecnología, por el contrario, las aplicaciones *in vitro* más relevantes de la CMF del estrés oxidativo serían, a nuestro juicio, la evaluación de la potencia antioxidante de fármacos y compuestos naturales (Urios et al., 2003) y la detección (Alvarez et al., 1997) de toxicidad oxidativa y sus mecanismos (Clothier et al., 2013).

Uno de los objetivos generales de esta Tesis ha sido, precisamente, el de integrar

Discusión

el conocimiento adquirido en nuestro estudio al diseño de paneles racionales y evaluados de estudio citométrico del estrés oxidativo, que pudieran ser de interés en las aplicaciones que acabamos de mencionar. Como resumen final de este trabajo hemos diseñado la Tabla 32 que esquematiza una propuesta de criterios, basada en nuestros resultados, para diseñar experimentos in vitro destinados a evaluar por CMF efectos y mecanismos relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante.

Tabla 32: Resumen de recomendaciones para el diseño de paneles de estudio in vitro de estrés oxidativo, basadas en los resultados obtenidos sobre células Jurkat, N13 y cepas de *E. coli* WP2.

Compuesto	Mecanismo	ROS/RNS Principales	Sonda Recomendada
H ₂ O ₂	Prooxidante hidrosoluble	H ₂ O ₂ OH·	MitoPY1
t-BOOH	Hidroperóxido Lipofílico	RO· ROO·	DHDCF
CHP	Hidroperóxido Lipofílico	RO· ROO·	DHR123
Menadiona	Redox cycle	O ₂ ^{·-} H ₂ O ₂ OH·	MitoSox Red
Plumbagina	Redox cycle	O ₂ ^{·-} H ₂ O ₂ OH·	HE
FCCP	Desacoplante mitocondrial	O ₂ ^{·-} H ₂ O ₂ OH·	DHDCF
DEA NONOato	Dador de NO·	NO·	DAF-FM
SIN-1	Dador de NO· y O ₂ ^{·-}	ONOO·	Oxidative Stress Green
NAC	Antioxidante soluble Precursor de Cys y GSH	Disminución general de ROS	N.A
DETIC	Inhibidor de SOD	Aumento de O ₂ ^{·-}	MitoSox Red HE
3-AT	Inhibidor de Catalasa	Aumento de H ₂ O ₂	MitoPY1

Conclusiones

VI

1. Hemos diseñado y desarrollado un estudio sistemático dirigido a evaluar de forma objetiva las ventajas y limitaciones de una serie de sondas fluorescentes de relevancia en estudios experimentales de estrés oxidativo o nitrosativo.
2. Hemos puesto a punto modelos experimentales basados en la detección por CMF del efecto del tratamiento a corto plazo con xenobióticos prooxidantes en líneas celulares de mamífero o en cepas de *E. coli* WP2 con deficiencias en genes de la defensa antioxidante.
3. La aplicación de la CMF a estos modelos nos ha permitido evaluar de forma objetiva las características de sensibilidad y especificidad de las diferentes sondas utilizadas y sus limitaciones.
4. Hemos puesto a punto ensayos cinéticos para la detección de ROS y RNS mediante RT-CMF, que aceleran la obtención de resultados, minimizan las interferencias debidas al progreso de los procesos oxidativos y revelan mejor las diferencias en capacidad de detección entre las sondas utilizadas.
5. Hemos puesto a punto ensayos de CMF de detección de ROS utilizando simultáneamente dos sondas, compatibles espectralmente. Interacciones entre ellas, que aún no podemos explicar, afectan sensiblemente a su capacidad de detección.
6. Hemos podido proponer una serie de recomendaciones para el diseño de paneles de estudio in vitro por CMF de estrés oxidativo, basadas en los resultados obtenidos con los modelos experimentales.

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y.-S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R., & Andrews, S. C. (1999). Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and fur Mutants are Iron Deficient. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1415-1428.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: Basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Adegoke, O., & Forbes, P. B. C. (2015). Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: A review. *Analytica Chimica Acta*, 862, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.036>
- Adolfson, K. J., & Brynildsen, M. P. (2015). A Kinetic Platform to Determine the Fate of Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *PLOS Computational Biology*, 11(11), e1004562. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004562>
- Aebi, H. (1974). Catalase. En H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition) (pp. 673-684). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Agnez-Lima, L. F., Melo, J. T. A., Silva, A. E., Oliveira, A. H. S., Timoteo, A. R. S., Lima-Bessa, K. M., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Galhardo, R. S., & Menck, C. F. M. (2012). DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 751(1), 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.005>
- Ahn, H.-Y., Fairfull-Smith, K. E., Morrow, B. J., Lussini, V., Kim, B., Bondar, M. V., Bottle, S. E., & Belfield, K. D. (2012). Two-Photon Fluorescence Microscopy Imaging of Cellular Oxidative Stress Using Profluorescent Nitroxides. *Journal of the American Chemical Society*, 134(10), 4721-4730. <https://doi.org/10.1021/ja210315x>
- Aiba, H., Matsuyama, S., Mizuno, T., & Mizushima, S. (1987). Function of micF as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the ompF gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3007-3012. <https://doi.org/10.1128/jb.169.7.3007-3012.1987>

Bibliografía

- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, 357(3), 593-615.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2067-2075.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1999). Alteration of the Repressor Activity of MarR, the Negative Regulator of the Escherichia coli marRAB Locus, by Multiple Chemicals In Vitro. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4669-4672. <https://doi.org/10.1128/JB.181.15.4669-4672.1999>
- Almirón, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved Escherichia coli. *Genes & Development*, 6(12b), 2646-2654. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2646>
- Alnahdi, A., John, A., & Raza, H. (2019). N-acetyl cysteine attenuates oxidative stress and glutathione-dependent redox imbalance caused by high glucose/high palmitic acid treatment in pancreatic Rin-5F cells. *PloS One*, 14(12), e0226696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226696>
- Altuvia, S., Almiron, M., Huisman, G., Kolter, R., & Storz, G. (1994). The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and σ in stationary phase. *Molecular Microbiology*, 13(2), 265-272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00421.x>
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., & Storz, G. (1997). A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell*, 90(1), 43-53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80312-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80312-8)
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A., & Storz, G. (1998). The Escherichia coli OxyS regulatory RNA represses fhfA translation by blocking ribosome binding. *The EMBO Journal*, 17(20), 6069-6075. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6069>
- Alvarez, A. M., Callaghan, R. C., & O'Connor, J. E. (1997). Análisis del estrés oxidativo por citometría de flujo. *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo*, 337-364.

- Álvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C., & Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 167-195.
- Amábile-Cuevas, C. F., & Demple, B. (1991). Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: Two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Research*, 19(16), 4479-4484. <https://doi.org/10.1093/nar/19.16.4479>
- Anand, A., Chen, K., Catoiu, E., Sastry, A. V., Olson, C. A., Sandberg, T. E., Seif, Y., Xu, S., Szubin, R., Yang, L., Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2020). OxyR Is a Convergent Target for Mutations Acquired during Adaptation to Oxidative Stress-Prone Metabolic States. *Molecular Biology and Evolution*, 37(3), 660-667. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz251>
- Anbar, A. D. (2008). Elements and Evolution. *Science*, 322(5907), 1481-1483.
- Andrew, P. J., & Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43(3), 521-531. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00115-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00115-7)
- Andrews, S. C. (2010). The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.05.010>
- Andreyev, A. Yu., Kushnareva, Yu. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0102-7>
- Anjem, A., & Imlay, J. A. (2012). Mononuclear Iron Enzymes Are Primary Targets of Hydrogen Peroxide Stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15544-15556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330365>
- Anjem, A., Varghese, S., & Imlay, J. A. (2009). Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 72(4), 844-858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06699.x>
- Antonenkov, V. D., Grunau, S., Ohlmeier, S., & Hiltunen, J. K. (2010). Peroxisomes

Bibliografía

- Are Oxidative Organelles. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(4), 525-537. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2996>
- Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Letters*, 475(2), 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01638-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01638-0)
- Arnelle, D. R., Day, B. J., & Stamler, J. S. (1997). Diethyl dithiocarbamate-induced decomposition of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1(1), 56-64. <https://doi.org/10.1006/niox.1996.0107>
- Arnoldini, M., Heck, T., Blanco-Fernández, A., & Hammes, F. (2013). Monitoring of Dynamic Microbiological Processes Using Real-Time Flow Cytometry. *PLOS ONE*, 8(11), e80117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080117>
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., & Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(6), 593-597. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X)
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—Disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6161-6165.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, e360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Ayala, A., Parrado, J., Bougria, M., & Machado, A. (1996). Effect of Oxidative Stress, Produced by Cumene Hydroperoxide, on the Various Steps of Protein Synthesis: MODIFICATIONS OF ELONGATION FACTOR-2 *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23105-23110. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23105>
- Aykac, K., Ozsurekci, Y., Yayla, B. C. C., Gurlevik, S. L., Oygur, P. D., Bolu, N. B., Tasar, M. A., Erdinc, F. S., Ertem, G. T., Neselioglu, S., Erel, O., Cengiz, A. B., & Ceyhan, M. (2021). Oxidant and antioxidant balance in patients with COVID-19.

- Pediatric Pulmonology, 56(9), 2803-2810. <https://doi.org/10.1002/ppul.25549>
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P., & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327(0), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 109(1), 33-44. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00481-2)
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(3), 741-744. <https://doi.org/10.1172/JCI107236>
- Babior, B. M., Lambeth, J. D., & Nauseef, W. (2002). The Neutrophil NADPH Oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 342-344. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2642>
- Baez, A., & Shiloach, J. (2013). *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microbial Cell Factories*, 12, 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>
- Balaguer, S., Diaz, L., Gomes, A., Herrera, G., O'Connor, J.-E., Urios, A., Felipo, V., & Montoliu, C. (2017). Real-time cytometric assay of nitric oxide and superoxide interaction in peripheral blood monocytes: A no-wash, no-lyse kinetic method. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 92(3), 211-217. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21237>
- Balcerczyk, A., Soszynski, M., & Bartosz, G. (2005). On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(3), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017>
- Ballatori, N., Krance, S. M., Marchan, R., & Hammond, C. L. (2009). Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.004>
- Barbacanne, M.A., Souchard, J.P., Darblade, B., Iliou, J.P., Nepveu, F., Pipy, B.,

Bibliografía

- Bayard, F., & Arnal, J.-F. (2000). Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), 388-396. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00336-1)
- Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A., & Getzoff, E. D. (2004). Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry*, 43(25), 8038-8047. <https://doi.org/10.1021/bi0496081>
- Barth, E., Gora, K. V., Gebendorfer, K. M., Settele, F., Jakob, U., & Winter, J. 2009. (2009). Interplay of cellular cAMP levels, σ S activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(5), 1680-1689. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026021-0>
- Basak, S., & Jiang, R. (2012). Enhancing *E. coli* Tolerance towards Oxidative Stress via Engineering Its Global Regulator cAMP Receptor Protein (CRP). *PLoS ONE*, 7(12), e51179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051179>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 65, 189-213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1620-1624.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), C1424-C1437. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
- Bedwell, S., Dean, R. T., & Jessup, W. (1989). The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochemical Journal*, 262(3), 707-712.
- Beiqing, L., Chen, M., & Whisler, R. L. (1996). Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter

- activation in Jurkat T cells. *The Journal of Immunology*, 157(1), 160-169.
- Benedikter, B. J., Weseler, A. R., Wouters, E. F. M., Savelkoul, P. H. M., Rohde, G. G. U., & Stassen, F. R. M. (2018). Redox-dependent thiol modifications: Implications for the release of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(13), 2321-2337. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2806-z>
- Bennik, M. H. J., Pomposiello, P. J., Thorne, D. F., & Demple, B. (2000). Defining a rob Regulon in *Escherichia coli* by Using Transposon Mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3794-3801.
- Benov, L., Chang, L. Y., Day, B., & Fridovich, I. (1995). Copper, Zinc Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*: Periplasmic Localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(2), 508-511. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1324>
- Benov, L., Szejnberg, L., & Fridovich, I. (1998). Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7), 826-831. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00163-4)
- Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z., & Ferenčík, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(18), 1865-1874. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00439-7)
- Bernas, T., Grégori, G., Asem, E. K., & Robinson, J. P. (2006). Integrating Cytomics and Proteomics *. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(1), 2-13. <https://doi.org/10.1074/mcp.R500014-MCP200>
- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759-4761. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32488-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32488-8)
- Bielski, B. H. J., & Cabelli, D. E. (1995). Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. En C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, & J. F. Liebman (Eds.), *Active Oxygen in Chemistry* (pp. 66-104). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0874-7_3
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen

Bibliografía

- peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), 994-1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Blanchard, J. L., Wholey, W.-Y., Conlon, E. M., & Pomposiello, P. J. (2007). Rapid Changes in Gene Expression Dynamics in Response to Superoxide Reveal SoxRS-Dependent and Independent Transcriptional Networks. *PLoS ONE*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001186>
- Blanco, M., Martínez, A., Urios, A., Herrera, G., & O'Connor, J. E. (1998). Detection of oxidative mutagenesis by isoniazid and other hydrazine derivatives in *Escherichia coli* WP2 tester strain IC203, deficient in OxyR: Strong protective effects of rat liver S9. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417(1), 39-46. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00096-5)
- Blanco, M., Urios, A., & Martínez, A. (1998). New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 413(2), 95-101. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00013-8)
- Blanco-Ayala, T., Andérica-Romero, A. C., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radical Research*, 48(6), 623-640. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.899694>
- Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J., & Ramírez, R. M. (2019). Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1626654. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., & Mason, R. P. (2006). The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 968-975. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.042>
- Bonneh-Barkay, D., Reaney, S. H., Langston, W. J., & DiMonte, D. A. (2005). Redoxcycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Molecular Brain Research*, 134(1), 52-56. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.005>
- Borras, C., Mas-Bargues, C., Sanz-Ros, J., Román-Domínguez, A., Gimeno-Mallench, L., Inglés, M., Gambini, J., & Viña, J. (2020). Extracellular vesicles and redox

- modulation in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 149, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.032>
- Bortner, C. D., Gómez-Angelats, M., & Cidlowski, J. A. (2001). Plasma Membrane Depolarization without Repolarization Is an Early Molecular Event in Anti-Fas-induced Apoptosis *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4304-4314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005171200>
- Bradley, J. M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Hemmings, A. M., Moore, G. R., & Le Brun, N. E. (2020). Bacterial iron detoxification at the molecular level. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(51), 17602-17623. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007746>
- Bradley, T. M., Hidalgo, E., Leautaud, V., Ding, H., & Demple, B. (1997). Cysteine-to-Alanine Replacements in the Escherichia Coli SoxR Protein and the Role of the [2Fe-2S] Centers in Transcriptional Activation. *Nucleic Acids Research*, 25(8), 1469-1475. <https://doi.org/10.1093/nar/25.8.1469>
- Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- Bretón-Romero, R., & Lamas, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*, 2, 529-534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3289-3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 Pt 2), 1221-1229.
- Broxton, C. N., & Culotta, V. C. (2016). SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005295. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005295>
- Brunelli, L., Yermilov, V., & Beckman, J. S. (2001). Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*,

Bibliografía

30(7), 709-714. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00512-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00512-8)

- Buxser, S. E., Sawada, G., & Raub, T. J. (1999). Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. En *Methods in Enzymology* (Vol. 300, pp. 256-275). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)00133-0)
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79-110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The Lag Phase. *Free Radical Research*, 28(6), 601-609. <https://doi.org/10.3109/10715769809065816>
- Cardoso, A. R., Chausse, B., da Cunha, F. M., Luévano-Martínez, L. A., Marazzi, T. B. M., Pessoa, P. S., Queliconi, B. B., & Kowaltowski, A. J. (2012). Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(11), 2201-2208. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.008>
- Carlioz, A., & Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: Is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO Journal*, 5(3), 623-630.
- Carter, W. O., Narayanan, P. K., & Robinson, J. P. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(2), 253-258. <https://doi.org/10.1002/jlb.55.2.253>
- Carvalho, Â. S. (2016). Development Of An Oxidative Cytomic Panel Of High-Content Miniaturized Assays for Detection of In Vitro Cytotoxicity and Prediction of Acute Toxicity of Drugs and Xenobiotics [Tesis Doctoral]. Universitat de València.
- Catling, D. C., Glein, C. R., Zahnle, K. J., & McKay, C. P. (2005, junio 7). Why O₂ Is Required by Complex Life on Habitable Planets and the Concept of Planetary «Oxygenation Time» (2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA) [Research-article]. <https://Home.Liebertpub.Com/Ast>; Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA. <https://doi.org/10.1089/ast.2005.5.415>
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493. <https://doi.org/10.1093/>

oxfordjournals.bmb.a072625

- Chen, F., Castranova, V., & Shi, X. (2001). New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. *The American Journal of Pathology*, 159(2), 387-397. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61708-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61708-7)
- Chen, H., Wilson, J., Ercanbrack, C., Smith, H., Gan, Q., & Fan, C. (2021). Genome-Wide Screening of Oxidizing Agent Resistance Genes in *Escherichia coli*. *Antioxidants*, 10(6), 861. <https://doi.org/10.3390/antiox10060861>
- Chen, K., Thomas, S. R., Albano, A., Murphy, M. P., & Keaney, J. F. (2004). Mitochondrial Function Is Required for Hydrogen Peroxide-induced Growth Factor Receptor Transactivation and Downstream Signaling *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 35079-35086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404859200>
- Chen, X., Tian, X., Shin, I., & Yoon, J. (2011). Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chemical Society Reviews*, 40(9), 4783-4804. <https://doi.org/10.1039/C1CS15037E>
- Chen, X., Wang, F., Young Hyun, J., Wei, T., Qiang, J., Ren, X., Shin, I., & Yoon, J. (2016). Recent progress in the development of fluorescent, luminescent and colorimetric probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chemical Society Reviews*, 45(10), 2976-3016. <https://doi.org/10.1039/C6CS00192K>
- Cheung, K. J., Badarinarayana, V., Selinger, D. W., Janse, D., & Church, G. M. (2003). A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Research*, 13(2), 206-215. <https://doi.org/10.1101/gr.401003>
- Chiancone, E., & Ceci, P. (2010). The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 798-805. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.013>
- Chiang, S. M., & Schellhorn, H. E. (2012). Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.013>

Bibliografía

org/10.1016/j.abb.2012.02.007

- Chiaradia, E., Tancini, B., Emiliani, C., Delo, F., Pellegrino, R. M., Tognoloni, A., Urbanelli, L., & Buratta, S. (2021). Extracellular Vesicles under Oxidative Stress Conditions: Biological Properties and Physiological Roles. *Cells*, 10(7), 1763. <https://doi.org/10.3390/cells10071763>
- Chiaromonte, R., Bartolini, E., Riso, P., Calzavara, E., Erba, D., Testolin, G., Comi, P., & Sherbet, G. V. (2001). Oxidative stress signalling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(3), 437-444. <https://doi.org/10.1002/jcb.1158>
- Chignell, C. F., & Sik, R. H. (2003). A photochemical study of cells loaded with 2',7'-dichlorofluorescein: Implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation1. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(8), 1029-1034. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00022-4)
- Chiueh, C. C. (1999). Neuroprotective Properties of Nitric Oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890(1), 301-311. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08007.x>
- Choi, H.-J., Kim, S.-J., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J.-R., Storz, G., & Ryu, S.-E. (2001). Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell*, 105(1), 103-113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00300-2)
- Chou, J. H., Greenberg, J. T., & Dempfle, B. (1993). Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the micF antisense RNA by the soxRS locus. *Journal of Bacteriology*, 175(4), 1026-1031. <https://doi.org/10.1128/jb.175.4.1026-1031.1993>
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., & Ames, B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 41(3), 753-762. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80056-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80056-8)
- Christman, M. F., Storz, G., & Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(10), 3484-3488. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3484>
- Claiborne, A., & Fridovich, I. (1979). Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 254(10), 4245-4252. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50722-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50722-5)
- Clothier, R., Gómez-Lechón, M. J., Kinsner-Ovaskainen, A., Kopp-Schneider, A., O'Connor, J. E., Prieto, P., & Stanzel, S. (2013). Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(4), 1347-1356. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.015>
- Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, 174(4432), 689-691. <https://doi.org/10.1038/174689a0>
- Compan, I., & Touati, D. (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 175(6), 1687-1696. <https://doi.org/10.1128/jb.175.6.1687-1696.1993>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cooper, S., & Helmstetter, C. E. (1968). Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *Journal of Molecular Biology*, 31(3), 519-540. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90425-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90425-7)
- Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L. N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C. T., Bari, S., ... Zychlinsky, A. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology*, 49(10), 1457-1973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
- Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverage, X., & Mayol, J.-F. (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*,

Bibliografía

79A(6), 405-425. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>

Coulter, W. H. (1956). High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Proceedings of the National Electronics Conference, 12, 1034.

Crack, J., Green, J., & Thomson, A. J. (2004). Mechanism of Oxygen Sensing by the Bacterial Transcription Factor Fumarate-Nitrate Reduction (FNR)*. Journal of Biological Chemistry, 279(10), 9278-9286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309878200>

Crow, J. P. (1997). Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. Nitric Oxide, 1(2), 145-157. <https://doi.org/10.1006/niox.1996.0113>

Cunningham, L., Gruer, M. J., & Guest, J. R. (1997). Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. Microbiology (Reading, England), 143 (Pt 12), 3795-3805. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3795>

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 10(2), 389-406. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(10), 813-824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>

D'Autréaux, B., Tucker, N. P., Dixon, R., & Spiro, S. (2005). A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. Nature, 437(7059), 769-772. <https://doi.org/10.1038/nature03953>

Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. Biochemical Journal, 473(7), 805-825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>

Davison, C. A., Durbin, S. M., Thau, M. R., Zellmer, V. R., Chapman, S. E., Diener, J., Wathen, C., Leevy, W. M., & Schafer, Z. T. (2013). Antioxidant Enzymes Mediate Survival of Breast Cancer Cells Deprived of Extracellular Matrix. Cancer Research, 73(12), 3704-3715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.

CAN-12-2482

- De Biasi, S., Gibellini, L., Bianchini, E., Nasi, M., Pinti, M., Salvioli, S., & Cossarizza, A. (2016). Quantification of mitochondrial reactive oxygen species in living cells by using multi-laser polychromatic flow cytometry. *Cytometry Part A*, 89(12), 1106-1110. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22936>
- De Grey, A. D. N. J. (2002). HO₂*: The forgotten radical. *DNA and Cell Biology*, 21(4), 251-257. <https://doi.org/10.1089/104454902753759672>
- Dębowska, K., Dębski, D., Hardy, M., Jakubowska, M., Kalyanaraman, B., Marcinek, A., Michalski, R., Michałowski, B., Ouari, O., Sikora, A., Smulik, R., & Zielonka, J. (2015). Towards selective detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of fluorogenic probes – limitations, progress, and perspectives. *Pharmacological reports : PR*, 67(4), 756-764. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.016>
- del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827-2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
- DeLeon, E. R., Gao, Y., Huang, E., Arif, M., Arora, N., Divietro, A., Patel, S., & Olson, K. R. (2016). A case of mistaken identity: Are reactive oxygen species actually reactive sulfide species? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(7), R549-R560. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00455.2015>
- Delgado-Roche, L., & Mesta, F. (2020). Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Archives of Medical Research*, 51(5), 384-387. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.019>
- Delihias, N., & Forst, S. (2001). MicF: An antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. Edited by D. Draper. *Journal of Molecular Biology*, 313(1), 1-12. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5029>
- DeLoughery, Z., Luczak, M. W., & Zhitkovich, A. (2014). Monitoring Cr Intermediates and Reactive Oxygen Species with Fluorescent Probes during Chromate Reduction. *Chemical Research in Toxicology*, 27(5), 843-851. <https://doi.org/10.1021/tx500028x>

Bibliografía

- Demple, B. (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon—A review. *Gene*, 179(1), 53-57. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00329-0)
- Demple, B., & Amábile-Cuevas, C. F. (1991). Redox redux: The control of oxidative stress responses. *Cell*, 67(5), 837-839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90355-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90355-3)
- Demple, B., Johnson, A., & Fung, D. (1986). Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(20), 7731-7735. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7731>
- Deng, Y., Wang, L., Chen, Y., & Long, Y. (2020). Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: Interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*. *BioTechniques*, 69(2), 88-98. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0036>
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., & Radi, R. (1996). Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 333(1), 49-58. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0363>
- Derouiche, S. (2020). Oxidative stress associated with SARS-Cov-2 (COVID-19) increases the severity of the lung disease—a systematic review. *J Infect Dis Epidemiol*, 6(121).
- Desideri, A., & Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1322-1325. <https://doi.org/10.1042/bst0311322>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2008). A Targetable Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in the Mitochondria of Living Cells. *Journal of the*

- American Chemical Society, 130(30), 9638-9639. <https://doi.org/10.1021/ja802355u>
- Dickinson, B. C., Lin, V. S., & Chang, C. J. (2013). Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. *Nature protocols*, 8(6), 1249-1259. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.064>
- Dietrich, L. E. P., & Kiley, P. J. (2011). A shared mechanism of SoxR activation by redox-cycling compounds. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1119-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07552.x>
- Dietrich, L. E. P., Teal, T. K., Price-Whelan, A., & Newman, D. K. (2008). Redox-Active Antibiotics Control Gene Expression and Community Behavior in Divergent Bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5893), 1203-1206. <https://doi.org/10.1126/science.1160619>
- Dikalov, S. I., & Harrison, D. G. (2014). Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2), 372-382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>
- Ding, H., & Demple, B. (1997). In vivo kinetics of a redox-regulated transcriptional switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8445-8449.
- Ding, H., & Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5146-5150. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5146>
- Ding, H., Hidalgo, E., & Demple, B. (1996). The Redox State of the [2Fe-2S] Clusters in SoxR Protein Regulates Its Activity as a Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33173-33175. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33173>
- Ding, Z., Liu, S., Wang, X., Deng, X., Fan, Y., Sun, C., Wang, Y., & Mehta, J. L. (2015). Hemodynamic Shear Stress via ROS Modulates PCSK9 Expression in Human Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells and Along the Mouse Aorta. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(9), 760-771. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6054>

Bibliografía

- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement^{1, 2} This article is part of a series of reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. ²Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102-1115. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00826-2)
- Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., & Gajewski, E. (1991). Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(2), 317-324. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90366-q](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90366-q)
- Djaman, O., Outten, F. W., & Imlay, J. A. (2004). Repair of Oxidized Iron-Sulfur Clusters in *Escherichia coli**. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44590-44599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406487200>
- Djordjević, V. B. (2004). Free Radicals in Cell Biology. En *International Review of Cytology* (Vol. 237, pp. 57-89). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37002-6)
- Dolz, M., O'Connor, J.-E., & Lequerica, J. L. (2004). Flow cytometric kinetic assay of the activity of Na⁺/H⁺ antiporter in mammalian cells. *Cytometry Part A*, 61A(2), 99-104. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20077>
- Donaldson, M. S. (2004). Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-19>
- Dong, T., Kirchhof, M. G., & Schellhorn, H. E. (2008). RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(3), 267-277. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0311-4>
- Douki, T., & Cadet, J. (1996). Peroxynitrite Mediated Oxidation of Purine Bases of Nucleosides and Isolated DNA. *Free Radical Research*, 24(5), 369-380. <https://doi.org/10.3109/10715769609088035>
- Drescher, H., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2021). Flow Cytometry: A Blessing and a Curse. *Biomedicines*, 9(11), 1613. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/316)

biomedicines9111613

- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Drouet, M., & Lees, O. (1993). Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 73-78. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90117-w](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90117-w)
- Duan, J., & Kasper, D. L. (2011). Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, 21(4), 401-409. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq171>
- Duarte, V., & Latour, J.-M. (2010). PerR vs OhrR: Selective peroxide sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular BioSystems*, 6(2), 316-323. <https://doi.org/10.1039/B915042K>
- Dubbs, J. M., & Mongkolsuk, S. (2012). Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(20), 5495-5503. <https://doi.org/10.1128/JB.00304-12>
- Dubrac, S., & Touati, D. (2000). Fur Positive Regulation of Iron Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*: Functional Analysis of the *sodB* Promoter. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3802-3808.
- Duval, V., & Lister, I. M. (2013). MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli* – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response. *International journal of biotechnology for wellness industries*, 2(3), 101-124. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2013.02.03.2>
- Egawa, N., Tanaka, T., Matsufuji, S., Yamada, K., Ito, K., Kitagawa, H., Okuyama, K., Kitajima, Y., & Noshiro, H. (2021). Antitumor effects of low-dose tipifarnib on the mTOR signaling pathway and reactive oxygen species production in HIF-1 α -expressing gastric cancer cells. *FEBS Open Bio*, 11(5), 1465-1475. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13154>
- Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., Olasso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O. S., Afonso, C. B., Andreadou,

Bibliografía

- I., Antelmann, H., ... Daiber, A. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology*, 13, 94-162. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.007>
- Eisenstark, A., Calcutt, M. J., Becker-Hapak, M., & Ivanova, A. (1996). Role of *Escherichia coli* rpos and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(7), 975-993. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00154-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00154-2)
- Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J., & Jones, H. P. (1987). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(6), 1564-1570. <https://doi.org/10.1172/JCI112990>
- Engwa, G. A., EnNwekegwa, F. N., & Nkeh-Chungag, B. N. (2020). Free Radicals, Oxidative Stress-Related Diseases and Antioxidant Supplementation. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, AT6236.
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. En D. Armstrong (Ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* (pp. 57-72). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Escada-Rebelo, S., Mora, F. G., Sousa, A. P., Almeida-Santos, T., Paiva, A., & Ramalho-Santos, J. (2020). Fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 22(5), 465-471. https://doi.org/10.4103/aja.aja_132_19
- Estevam, Nasim, M. J., Faulstich, L., Hakenesch, M., Burkholz, T., & Jacob, C. (2015). A Historical Perspective on Oxidative Stress and Intracellular Redox Control. En S. M. Roberts, J. P. Kehrer, & L.-O. Klotz (Eds.), *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology* (pp. 3-20). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9_1
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1-61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>

- Fahey, R. C. (2013). Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3182-3198. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.006>
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820-832. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>
- Farr, S. B., D'Ari, R., & Touati, D. (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8268-8272. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8268>
- Farrant, J. L., Sansone, A., Canvin, J. R., Pallen, M. J., Langford, P. R., Wallis, T. S., Dougan, G., & Kroll, J. S. (1997). Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Molecular Microbiology*, 25(4), 785-796. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5151877.x>
- Fasnacht, M., & Polacek, N. (2021). Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 671037. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037>
- Fawcett, W. P., & Wolf, R. E. (1994). Purification of a MaIE-SoxS fusion protein and identification of the control sites of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Molecular Microbiology*, 14(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01305.x>
- Fileiko, N., Spiro, S., Browning, D. F., Squire, D., Overton, T. W., Cole, J., & Constantinidou, C. (2007). The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4410-4417. <https://doi.org/10.1128/JB.00080-07>
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 247-254. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00002-4)
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Valentine, J. S. (2016). How did life survive Earth's great oxygenation? *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.013>

Bibliografía

- Flint, D. H., & Emptage, M. H. (1988). Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 263(8), 3558-3564. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68961-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68961-6)
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., & Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22369-22376. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41538-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41538-4)
- Folkes, L. K., Patel, K. B., Wardman, P., & Wrona, M. (2009). Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: Implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484(2), 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.014>
- Forest, K. T., Langford, P. R., Kroll, J. S., & Getzoff, E. D. (2000). Cu, Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with a conserved dimer interface¹¹Edited by D. C. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 145-153. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3448>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829-837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D., & Toledano, M. B. (2010). Activation of NRF2 by Nitrosative Agents and H₂O₂ Involves KEAP1 Disulfide Formation *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8463-8471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051714>
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412-426.
- Frei, B., Stocker, R., & Ames, B. N. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9748-9752. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9748>
- Frey, P. A., & Reed, G. H. (2012). The Ubiquity of Iron. *ACS Chemical Biology*, 7(9), 1477-1481. <https://doi.org/10.1021/cb300323q>
- Fridovich, I. (1978). The Biology of Oxygen Radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.

<https://doi.org/10.1126/science.210504>

- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90526-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90526-6)
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97-112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18517. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), 1203-1209. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A. R., Taylor, E. L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A. C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H. E., Grune, T., Schmidt, H. H. H. W., & Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144-1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Fu, H., Yuan, J., & Gao, H. (2015). Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 584, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.012>
- Fujikawa, M., Kobayashi, K., & Kozawa, T. (2012). Direct Oxidation of the [2Fe-2S] Cluster in SoxR Protein by Superoxide DISTINCT DIFFERENTIAL SENSITIVITY TO SUPEROXIDE-MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35702-35708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395079>
- Fujita, S., & Steenken, S. (1981). Pattern of hydroxyl radical addition to uracil and methyl- and carboxyl-substituted uracils. Electron transfer of hydroxyl adducts with N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine and tetranitromethane. *Journal of the American Chemical Society*, 103(10), 2540-2545.
- Fukui, M., Choi, H. J., & Zhu, B. T. (2012). Rapid generation of mitochondrial

Bibliografía

superoxide induces mitochondrion-dependent but caspase-independent cell death in hippocampal neuronal cells that morphologically resembles necroptosis. *Toxicology and applied pharmacology*, 262(2), 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.030>

Fulwyler, M. J. (1965). Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science*, 150(3698), 910-911. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.910>

Fussell, K. C., Udasin, R. G., Gray, J. P., Mishin, V., Smith, P. J. S., Heck, D. E., & Laskin, J. D. (2011). Redox Cycling and Increased Oxygen Utilization Contribute to Diquat-induced Oxidative Stress and Cytotoxicity in Chinese Hamster Ovary Cells Overexpressing NADPH-cytochrome P450 Reductase. *Free radical biology & medicine*, 50(7), 874-882. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.035>

Gaascht, F., Teiten, M.-H., Cerella, C., Dicato, M., Bagrel, D., & Diederich, M. (2014). Plumbagin Modulates Leukemia Cell Redox Status. *Molecules*, 19(7), 10011-10032. <https://doi.org/10.3390/molecules190710011>

Gabig, T. G., & Babior, B. M. (1979). The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(18), 9070-9074.

Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(4), 393-410.

Garaschuk, O., Semchyshyn, H. M., & Lushchak, V. I. (2018). Healthy brain aging: Interplay between reactive species, inflammation and energy supply. *Ageing Research Reviews*, 43, 26-45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.02.003>

García-Giménez, J. L., Markovic, J., Dasí, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C. H., & Pallardó, F. V. (2013). Nuclear glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3304-3316. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.005>

Gardner, A. M., & Gardner, P. R. (2002). Flavohemoglobin Detoxifies Nitric Oxide in Aerobic, but Not Anaerobic, *Escherichia coli*: EVIDENCE FOR A NOVEL INDUCIBLE ANAEROBIC NITRIC OXIDE-SCAVENGING ACTIVITY*. *Journal of*

- Biological Chemistry, 277(10), 8166-8171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110470200>
- Gardner, A. M., Gessner, C. R., & Gardner, P. R. (2003). Regulation of the Nitric Oxide Reduction Operon (norRVW) in *Escherichia coli*: ROLE OF NorR AND $\zeta 54$ IN THE NITRIC OXIDE STRESS RESPONSE*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10081-10086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212462200>
- Gardner, A. M., Helmick, R. A., & Gardner, P. R. (2002). Flavorubredoxin, an Inducible Catalyst for Nitric Oxide Reduction and Detoxification in *Escherichia coli* *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8172-8177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110471200>
- Gaudu, P., Dubrac, S., & Touati, D. (2000). Activation of SoxR by Overproduction of Desulfoferrodoxin: Multiple Ways To Induce the soxRS Regulon. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1761-1763.
- Gaudu, P., Moon, N., & Weiss, B. (1997). Regulation of the soxRS Oxidative Stress Regulon REVERSIBLE OXIDATION OF THE Fe-S CENTERS OF SoxR IN VIVO. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5082-5086. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5082>
- Gaudu, P., & Weiss, B. (1996). SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19), 10094-10098. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10094>
- Gaudu, P., & Weiss, B. (2000). Flavodoxin Mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1788-1793. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1788-1793.2000>
- Gebicka, L., & Didik, J. (2009). Catalytic scavenging of peroxyxynitrite by catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(10), 1375-1379. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.07.011>
- Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/antiox6020038>
- Giles, G. I., Tasker, K. M., & Jacob, C. (2001). Hypothesis: The role of reactive sulfur

Bibliografía

- species in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(10), 1279-1283. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00710-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00710-9)
- Giró, M., Carrillo, N., & Krapp, A. R. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152(4), 1119-1128. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28612-0>
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
- Goldstein, B. D., Lodi, C., Collinson, C., & Balchum, O. J. (1969). Ozone and lipid peroxidation. *Archives of Environmental Health*, 18(4), 631-635. <https://doi.org/10.1080/00039896.1969.10665464>
- Goldstein, M., & Kastan, M. B. (2015). The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 129-143. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-081313-121208>
- Goldstein, S., Meyerstein, D., & Czapski, G. (1993). The Fenton reagents. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4), 435-445. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90043-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90043-T)
- Gomberg, M. (1900). AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL. | *Journal of the American Chemical Society*. *J. Am. Chem. Soc.*, 22(11), 757-771. <https://doi.org/10.1021/ja02049a006>
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2), 45-80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gonzalez-Flecha, B., & Boveris, A. (1995). Mitochondrial sites of hydrogen peroxide production in reperfused rat kidney cortex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1243(3), 361-366. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)00160-Y](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)00160-Y)
- González-Flecha, B., & Demple, B. (1997a). Homeostatic regulation of intracellular

- hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 382-388. <https://doi.org/10.1128/jb.179.2.382-388.1997>
- González-Flecha, B., & Demple, B. (1997b). Transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *oxyR* gene as a function of cell growth. *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6181-6186. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6181-6186.1997>
- González-Flecha, B., & Demple, B. (1999). Role for the *oxyS* Gene in Regulation of Intracellular Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3833-3836. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3833-3836.1999>
- Gort, A. S., Ferber, D. M., & Imlay, J. A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32(1), 179-191. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01343.x>
- Gort, A. S., & Imlay, J. A. (1998). Balance between Endogenous Superoxide Stress and Antioxidant Defenses. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1402-1410.
- Gottesman, S. (2019). Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 294(31), 11685-11700. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.005593>
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., & Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, 183(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0739-4>
- Gray, M. J., Wholey, W.-Y., & Jakob, U. (2013). Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annual review of microbiology*, 67, 141-160. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102912-142520>
- Green, J., & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 954-966. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1022>
- Greenberg, J. T., & Demple, B. (1989). A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, 171(7), 3933-3939. <https://doi.org/10.1128/>

Bibliografía

jb.171.7.3933-3939.1989

- Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D., & Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6181-6185.
- Griffith, K. L., Shah, I. M., & Wolf, R. E. (2004). Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1801-1816. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03952.x>
- Gros, L., Sapparbaev, M. K., & Laval, J. (2002). Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*, 21(58), 8905-8925. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206005>
- Gu, M., & Imlay, J. A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Molecular microbiology*, 79(5), 1136-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2018). Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 502(2), 183-186. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.045>
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 129-135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-q)
- Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., & Roe, J.-H. (2002). Role of OxyR as a Peroxide-Sensing Positive Regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 184(19), 5214-5222. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5214-5222.2002>
- Haider, K., Haider, M. R., Neha, K., & Yar, M. S. (2020). Free radical scavengers: An overview on heterocyclic advances and medicinal prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112607. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112607>
- Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: Some new concepts. *The FASEB Journal*, 1(5), 358-364. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.5.2824268>

- Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, 70(6), 737-757.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3, Supplement 3), S14-S22. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7)
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 637-644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>
- Halliwell, B. (2015). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. En ELS (pp. 1-9). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3>
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), 10-13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*, 92(9), 3007-3017. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.9.3007>
- Hanes, J. W., Thal, D. M., & Johnson, K. A. (2006). Incorporation and Replication of 8-Oxo-deoxyguanosine by the Human Mitochondrial DNA Polymerase *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36241-36248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607965200>

Bibliografía

- Hardy, M., Zielonka, J., Karoui, H., Sikora, A., Michalski, R., Podsiadły, R., Lopez, M., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., & Ouari, O. (2018). Detection and Characterization of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems by Monitoring Species-Specific Products. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(15), 1416-1432. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7398>
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harrison, A., Ray, W. C., Baker, B. D., Armbruster, D. W., Bakaletz, L. O., & Munson, R. S. (2007). The OxyR Regulon in Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 1004-1012. <https://doi.org/10.1128/JB.01040-06>
- Harskamp, J., Britz-McKibbin, P., & Wilson, J. Y. (2012). Functional Screening of Cytochrome P450 Activity and Uncoupling by Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 84(2), 862-866. <https://doi.org/10.1021/ac202787n>
- Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1979). Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 196(2), 385-395. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90289-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90289-3)
- Hausladen, A., Gow, A. J., & Stamler, J. S. (1998). Nitrosative stress: Metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14100. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14100>
- Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., & Stamler, J. S. (1996). Nitrosative Stress: Activation of the Transcription Factor OxyR. *Cell*, 86(5), 719-729. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80147-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80147-6)
- Haynes, V., Elfering, S., Traaseth, N., & Giulivi, C. (2004). Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase: Enzyme Expression, Characterization, and Regulation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4), 341-346. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041765.27145.08>
- Hazra, D. K., & Steenken, S. (1983). Pattern of OH Radical Addition to Cytosine and

- 1-, 3-, 5-, and 6-Substituted Cytosines. Electron Transfer and Dehydration Reactions of the OH Adducts. *Journal of the American Chemical Society*, 105(13), 4380-4386. Scopus. <https://doi.org/10.1021/ja00351a042>
- Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., & Cohen, G. (1976). In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethylthiocarbamate. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2182-2185. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33675-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33675-X)
- Helmann, J. D. (2002). OxyR: A molecular code for redox sensing? *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(157), pe46. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.157.pe46>
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., & Flaherty, D. M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1), 146-159. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00061-1)
- Henderson, L. M., & Chappell, J. B. (1993). Dihydrorhodamine 123: A fluorescent probe for superoxide generation? *European Journal of Biochemistry*, 217(3), 973-980. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18328.x>
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 373-395. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002>
- Heo, Y.J., Chung, I.Y., Cho, W.-J., Lee, B.-Y., Kim, J.H., Choi, K.H., Lee, J.W., Hassett, D. J., & Cho, Y.H. (2010). The Major Catalase Gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Is under both Positive and Negative Control of the Global Transactivator OxyR in Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 381-390. <https://doi.org/10.1128/JB.00980-09>
- Herrera, E., & Barbas, C. (2001). Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(1), 43-56. <https://doi.org/10.1007/BF03179812>
- Herrera, G., Diaz, L., Martinez-Romero, A., Gomes, A., Villamón, E., Callaghan, R. C.,

Bibliografía

- & O'Connor, J.-E. (2007). Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicology in Vitro*, 21(2), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.07.003>
- Herrera, G., Martínez, A., Blanco, M., & O'Connor, J.-E. (2002). Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function. *Cytometry*, 49(2), 62-69. <https://doi.org/10.1002/cyto.10148>
- Herrera, G., Martínez, A., O'Connor, J.-E., & Blanco, M. (2003). Functional Assays of Oxidative Stress Using Genetically Engineered *Escherichia coli* Strains. *Current Protocols in Cytometry*, 24(1), 11.16.1-11.16.9. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1116s24>
- Hidalgo, E., Bollinger, J. M., Bradley, T. M., Walsh, C. T., & Dimple, B. (1995). Binuclear [2Fe-2S] Clusters in the *Escherichia coli* SoxR Protein and Role of the Metal Centers in Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 20908-20914. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.20908>
- Hidalgo, E., & Dimple, B. (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO Journal*, 13(1), 138-146. Scopus.
- Hidalgo, E., & Dimple, B. (1997). Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. *The EMBO Journal*, 16(5), 1056-1065. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1056>
- Hideg, É. (2004). Detection of Free Radicals and Reactive Oxygen Species. En R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols* (pp. 249-260). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-799-8:249>
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A. G., & Loewen, P. C. (2000). Modulation of the Activities of Catalase–Peroxidase HPI of *Escherichia coli* by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 39(19), 5868-5875. <https://doi.org/10.1021/bi0000059>
- Hille, R., & Massey, V. (1981). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(17), 9090-9095. <https://doi.org/10.1074/jbc.256.17.9090>

org/10.1016/S0021-9258(19)52512-1

- Hiraku, Y., Kawanishi, S., Ichinose, T., & Murata, M. (2010). The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203(1), 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05602.x>
- Hitchon, C. A., & El-Gabalawy, H. S. (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6(6), 265. <https://doi.org/10.1186/ar1447>
- Hoffstein, S. T., Gennaro, D. E., & Manzi, R. M. (1985). Neutrophils may directly synthesize both H₂O₂ and O₂⁻ since surface stimuli induce their release in stimulus-specific ratios. *Inflammation*, 9(4), 425-437. <https://doi.org/10.1007/BF00916342>
- Hogg, M., Wallace, S. S., & Doublí, S. (2005). Bumps in the road: How replicative DNA polymerases see DNA damage. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1), 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.014>
- Holden, E. R., & Webber, M. A. (2020). MarA, RamA, and SoxS as Mediators of the Stress Response: Survival at a Cost. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00828>
- Hondorp, E. R., & Matthews, R. G. (2004). Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli*. *PLOS Biology*, 2(11), e336. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020336>
- Hong, C.-O., Rhee, C. H., Won, N.-H., Choi, H.-D., & Lee, K.-W. (2013). Protective effect of 70% ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* Blume on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.032>
- Hou, N., Yan, Z., Fan, K., Li, H., Zhao, R., Xia, Y., Xun, L., & Liu, H. (2019). OxyR senses sulfane sulfur and activates the genes for its removal in *Escherichia coli*. *Redox Biology*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101293>
- Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). Chapter Two—Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. En J. P. Hardwick (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 74, pp. 35-84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>

Bibliografía

- Hutchinson, F. (1985). Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation. En W. E. Cohn & K. Moldave (Eds.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 32, pp. 115-154). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60347-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60347-5)
- Hwang, J.-M., Tseng, T.-H., Hsieh, Y.-S., Chou, F.-P., Wang, C. J., & Chu, C.-Y. (1996). Inhibitory effect of atractylon on tert-butyl hydroperoxide induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 70(10), 640-644. <https://doi.org/10.1007/s002040050323>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9265-9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- Imlay, J. A. (2002). How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. En *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 46, pp. 111-153). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46003-1)
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 395-418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry*, 77, 755-776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7), 443-454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
- Imlay, J. A. (2015a). Diagnosing oxidative stress in bacteria: Not as easy as you might think. *Current opinion in microbiology*, 24, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.004>
- Imlay, J. A. (2015b). Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. *Annual review of microbiology*, 69, 93-108. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104322>
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental microbiology*, 21(2), 521-530. <https://doi.org/10.1111/1462->

2920.14445

- Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 6957-6965. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)89596-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89596-9)
- Imlay, J. A., & Linn, S. (1986). Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 166(2), 519-527.
- Imlay, J. A., Sethu, R., & Rohaun, S. K. (2019). Evolutionary adaptations that enable enzymes to tolerate oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 140, 4-13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.048>
- Imlay, K. R., & Imlay, J. A. (1996). Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2564-2571. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2564-2571.1996>
- Ischiropoulos, H., & Al-Mehdi, A. B. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Letters*, 364(3), 279-282. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00307-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00307-U)
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313-322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
- Jakober, C. A., Robert, M. A., Riddle, S. G., Destailats, H., Charles, M. J., Green, P. G., & Kleeman, M. J. (2008). Carbonyl Emissions from Gasoline and Diesel Motor Vehicles. *Environmental Science & Technology*, 42(13), 4697-4703. <https://doi.org/10.1021/es7029174>
- Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., & Haq, Q. M. R. (2015). Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29592-29630. <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>
- Jang, S., & Imlay, J. A. (2007). Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts

Bibliografía

- Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 929-937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607646200>
- Jang, S., & Imlay, J. A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology*, 78(6), 1448-1467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07418.x>
- Janion, C. (2008). Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 338-344.
- Jiang, D., Hatahet, Z., Blaisdell, J. O., Melamede, R. J., & Wallace, S. S. (1997). Escherichia coli endonuclease VIII: Cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3773-3782. <https://doi.org/10.1128/jb.179.11.3773-3782.1997>
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4), 340-352. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.006>
- Johnson, S., Nguyen, V., & Coder, D. (2013). Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*, 64(1), 9.2.1-9.2.26. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0902s64>
- Johnsson, K., Froland, W. A., & Schultz, P. G. (1997). Overexpression, Purification, and Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2834-2840. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2834>
- Johnston, P. A. (2011). Redox cycling compounds generate H₂O₂ in HTS buffers containing strong reducing reagents – real hits or promiscuous artifacts? *Current opinion in chemical biology*, 15(1), 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.022>
- Jones, D. P. (2006, septiembre 20). Redefining Oxidative Stress (2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA) [Research-article]. <https://Home.Liebertpub.Com/Ars; Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA>. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>

- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(9), 734-746. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>
- Jovanovic, Z., & Jovanovic, S. (2013). Comparison of the effects of cumene hydroperoxide and hydrogen peroxide on Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Experimental Animals*, 62(1), 9-17. <https://doi.org/10.1538/expanim.62.9>
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Juan, G., Gil-Benso, R., O'Connor, J-E., & Callaghan, R. C. (1996). Oxidative metabolism in a rat hepatoma (N13) and isolated rat hepatocytes: A flow cytometric comparative study. *Hepatology*, 24(2), 385-390.
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., & Ischiropoulos, H. (2012a). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*, 52(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., & Ischiropoulos, H. (2012b). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*, 52(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Kamentsky, L. A., Melamed, M. R., & Derman, H. (1965). Spectrophotometer: New Instrument for Ultrarapid Cell Analysis. *Science*, 150(3696), 630-631. <https://doi.org/10.1126/science.150.3696.630>
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J., & Blattner, F. R. (2005). Genome-Wide Expression Analysis Indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 Regulates a Large Number of Genes of Unknown Function. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 1135-1160. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1135-1160.2005>

Bibliografía

- Kanofsky, J. R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions*, 70(1), 1-28. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(89\)90059-8](https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90059-8)
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A.-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1(1), 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
- Karin, M. (2009). NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a000141. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000141>
- Kasai, H., & Nishimura, S. (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research*, 12(4), 2137-2145. <https://doi.org/10.1093/nar/12.4.2137>
- Kauffman, M. E., Kauffman, M. K., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 2(5), 361-370. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Kaur, S., & Benov, L. T. (2020). Methylene blue induces the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Chemico-Biological Interactions*, 329, 109222. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109222>
- Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M., & Wink, D. A. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *En Methods in Enzymology* (Vol. 268, pp. 281-293). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68030-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68030-6)
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)
- Kępczyński, J., & Cembrowska-Lech, D. (2018). Application of flow cytometry with a fluorescent dye to measurement of intracellular nitric oxide in plant cells. *Planta*, 248(2), 279-291. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2901-2>
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., & Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(3), 221-237. <https://doi.org/10.1038/nrd3373>

- Keston, A. S., & Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 11(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90034-5)
- Khademian, M., & Imlay, J. A. (2017). Escherichia coli cytochrome c peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as a terminal electron acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(33), E6922-E6931. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701587114>
- Khademian, M., & Imlay, J. A. (2021). How Microbes Evolved to Tolerate Oxygen. *Trends in Microbiology*, 29(5), 428-440. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.001>
- Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A., & Antonenko, Y. N. (2017). Effect of cyanide on mitochondrial membrane depolarization induced by uncouplers. *Biochemistry (Moscow)*, 82(10), 1140-1146. <https://doi.org/10.1134/S0006297917100066>
- Khil, P. P., & Camerini-Otero, R. D. (2002). Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 44(1), 89-105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02878.x>
- Kim, S. O., Merchant, K., & Nudelman, R. (2002). OxyR: A Molecular Code for Redox-Related Signaling. *Cell*, 109(3), 383-396. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00723-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00723-7)
- Kim, S. Y., Kim, E. J., & Park, J.-W. (2002). Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in Escherichia coli. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 353-357. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.4.353>
- Kim, Y. J., Kim, E.-H., & Hahm, K. B. (2012). Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(6), 1004-1010. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x>
- Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 239-267. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>
- Klotz, L.O., Hou, X., & Jacob, C. (2014). 1,4-Naphthoquinones: From Oxidative

Bibliografía

- Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling. *Molecules*, 19(9), 14902-14918. <https://doi.org/10.3390/molecules190914902>
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298(Pt 2), 249-258.
- Kobayashi, K., Fujikawa, M., & Kozawa, T. (2014). Oxidative stress sensing by the iron–sulfur cluster in the transcription factor, SoxR. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 133, 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.11.008>
- Kobayashi, K., Fujikawa, M., & Kozawa, T. (2015). Binding of Promoter DNA to SoxR Protein Decreases the Reduction Potential of the [2Fe–2S] Cluster. *Biochemistry*, 54(2), 334-339. <https://doi.org/10.1021/bi500931w>
- Kobayashi, K., Mizuno, M., Fujikawa, M., & Mizutani, Y. (2011). Protein Conformational Changes of the Oxidative Stress Sensor, SoxR, upon Redox Changes of the [2Fe–2S] Cluster Probed with Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry*, 50(44), 9468-9474. <https://doi.org/10.1021/bi201526y>
- Kobayashi, K., & Tagawa, S. (1999). Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 451(3), 227-230. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00565-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00565-7)
- Kobayashi, K., & Tagawa, S. (2004). Activation of SoxR-Dependent Transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biochemistry*, 136(5), 607-615. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh168>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Kóňa, J., & Brinck, T. (2006). A combined molecular dynamics simulation and quantum chemical study on the mechanism for activation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(18), 3468-3478. <https://doi.org/10.1039/B604602A>
- Kontos, H. A., Wei, E. P., Ellis, E. F., Jenkins, L. W., Povlishock, J. T., Rowe, G. T., & Hess, M. L. (1985). Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circulation Research*, 57(1), 142-151. <https://doi.org/10.1161/01.RES.57.1.142>

- Koo, M.S., Lee, J.H., Rah, S.Y., Yeo, W.S., Lee, J.W., Lee, K.L., Koh, Y.S., Kang, S.O., & Roe, J.H. (2003). A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 22(11), 2614-2622. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg252>
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., & Beckman, J. S. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(2), 149-156. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90138-4)
- Korshunov, S., & Imlay, J. A. (2006). Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6326-6334. <https://doi.org/10.1128/JB.00554-06>
- Korshunov, S. S., & Imlay, J. A. (2002). A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 43(1), 95-106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02719.x>
- Kramer, G. F., & Ames, B. N. (1987). Oxidative mechanisms of toxicity of low-intensity near-UV light in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 2259-2266.
- Krapp, A. R., Humbert, M. V., & Carrillo, N. (2011). The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 4), 957-965. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039461-0>
- Kučera, O., Endlicher, R., Roušar, T., Lotková, H., Garnol, T., Drahotka, Z., & Červinková, Z. (2014). The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, e752506. <https://doi.org/10.1155/2014/752506>
- Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M. B., & Storz, G. (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for DNA binding and multimerization. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1285-1291.
- Kullik, I., Toledano, M. B., Tartaglia, L. A., & Storz, G. (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for oxidation and transcriptional activation. *Journal of Bacteriology*, 177(5),

Bibliografía

1275-1284. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1275-1284.1995>

- Kunduzova, O. R., Bianchi, P., Parini, A., & Cambon, C. (2002). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmacology*, 448(2), 225-230. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01913-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01913-1)
- Kuo, C. F., Mashino, T., & Fridovich, I. (1987). alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4724-4727. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61255-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61255-4)
- Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9880-9884. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81740-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81740-9)
- Kuršvietienė, L., Mongirdienė, A., Bernatoniene, J., Šulinskienė, J., & Stanevičienė, I. (2020). Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status. *Antioxidants*, 9(1), 80. <https://doi.org/10.3390/antiox9010080>
- Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2014). Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 94(3), 739-777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>
- Laforge, M., Elbim, C., Frère, C., Hémadi, M., Massaad, C., Nuss, P., Benoliel, J.-J., & Becker, C. (2020). Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 515-516. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>
- Lane, N. (2002). *Oxygen: The Molecule that Made the World*. Oxford University Press.
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 5(1), 49-59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01825.x>
- Latour, J.M. (2015). Manganese, the stress reliever. *Metallomics*, 7(1), 25-28. <https://doi.org/10.1039/c4mt00180j>

- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, 5(2), 227-231.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W.-S., Yu, M.-H., Storz, G., & Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(12), 1179-1185. <https://doi.org/10.1038/nsmb856>
- Lee, J.H., Lee, K.L., Yeo, W.S., Park, S.J., & Roe, J.-H. (2009). SoxRS-Mediated Lipopolysaccharide Modification Enhances Resistance against Multiple Drugs in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4441-4450. <https://doi.org/10.1128/JB.01474-08>
- Lee, J.-H., Yeo, W.-S., & Roe, J.-H. (2004). Induction of the *sufA* operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: Involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1745-1755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03946.x>
- Lee, J.W., & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 440(7082), 363-367. <https://doi.org/10.1038/nature04537>
- Lee, K.C., Yeo, W.-S., & Roe, J.H. (2008). Oxidant-Responsive Induction of the *suf* Operon, Encoding a Fe-S Assembly System, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(24), 8244-8247. <https://doi.org/10.1128/JB.01161-08>
- Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2016). Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01225>
- Lerner, R. A., & Eschenmoser, A. (2003). Ozone in biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3013-3015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730791100>
- Li, H., Zhou, X., Huang, Y., Liao, B., Cheng, L., & Ren, B. (2021). Reactive Oxygen

Bibliografía

- Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622534>
- Li, Y., Huang, T.-T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., & Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 11(4), 376-381. <https://doi.org/10.1038/ng1295-376>
- Li, Z., & Dimple, B. (1994). SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(28), 18371-18377.
- Ligeza, A., Tikhonov, A. N., Hyde, J. S., & Subczynski, W. K. (1998). Oxygen permeability of thylakoid membranes: Electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(3), 453-463. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00098-X)
- Lillig, C. H., Berndt, C., & Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), 1304-1317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.06.003>
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Lingappan, K. (2018). NF- κ B in Oxidative Stress. *Current opinion in toxicology*, 7, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.002>
- Liochev, S. I. (1999). The Mechanism of "Fenton-Like" Reactions and Their Importance for Biological Systems. A Biologist's View. *En Metal Ions in Biological Systems*. Routledge.
- Liochev, S. I., Benov, L., Touati, D., & Fridovich, I. (1999). Induction of the soxRS Regulon of *Escherichia coli* by Superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9479-9481. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9479>
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (1992). Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5892-5896.

- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (2007). The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), 1465-1469. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.015>
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (2011). Is superoxide able to induce SoxRS? *Free Radical Biology and Medicine*, 50(12), 1813. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.029>
- Liochev, S. I., Hausladen, A., & Fridovich, I. (1999). Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3537-3539. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3537>
- Little, J. W. (1996). The SOS Regulatory System. In E. C. C. Lin & A. S. Lynch (Eds.), *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* (pp. 453-479). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8601-8_22
- Liu, Y., Bauer, S. C., & Imlay, J. A. (2011). The YaaA Protein of the *Escherichia coli* OxyR Regulon Lessens Hydrogen Peroxide Toxicity by Diminishing the Amount of Intracellular Unincorporated Iron. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2186-2196. <https://doi.org/10.1128/JB.00001-11>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Loew, O. (1900). A New Enzyme of General Occurrence in Organisms. *Science*. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.11.279.701>
- Loewen, P. C., & Switala, J. (1986). Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry and Cell Biology*, 64(7), 638-646. <https://doi.org/10.1139/o86-088>
- Loewen, P. C., Switala, J., & Triggs-Raine, B. L. (1985). Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243(1), 144-149. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90782-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90782-9)
- Loewen, P. C., & Triggs, B. L. (1984). Genetic mapping of katF, a locus that with katE affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *Journal*

Bibliografía

- of Bacteriology, 160(2), 668-675. <https://doi.org/10.1128/jb.160.2.668-675.1984>
- Lombardo, M.-J., Aponyi, I., & Rosenberg, S. M. (2004). General Stress Response Regulator RpoS in Adaptive Mutation and Amplification in *Escherichia coli*. *Genetics*, 166(2), 669-680. <https://doi.org/10.1093/genetics/166.2.669>
- Lomonosova, E. E., Kirsch, M., Rauen, U., & de Groot, H. (1998). The Critical Role of Hemes in SIN-1 Cytotoxicity, Peroxynitrite Versus Hydrogen Peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(4), 522-528. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00295-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00295-5)
- Loui, C., Chang, A. C., & Lu, S. (2009). Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. *BMC Microbiology*, 9, 183. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-183>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3143-3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Lu, Z., & Imlay, J. A. (2021). When anaerobes encounter oxygen: Mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence. *Nature Reviews Microbiology*, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00583-y>
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957-1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Lushchak, V. I. (2007). Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Moscow)*, 72(8), 809-827. <https://doi.org/10.1134/S0006297907080020>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

- Lushchak, V. I. (2016). Time-course and intensity-based classifications of oxidative stresses and their potential application in biomedical, comparative and environmental research. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 21(6), 262-270. <https://doi.org/10.1080/13510002.2015.1126940>
- Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 20, 956-967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., & Hearst, J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 16(1), 45-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x>
- Macey, M. G. (2007). Principles of Flow Cytometry. En M. G. Macey (Ed.), *Flow cytometry* (pp. 1-16). Humana Press.
- Maehly, A. C., & Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357-424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Mahmood, D. F. D., Abderrazak, A., El Hadri, K., Simmet, T., & Rouis, M. (2013). The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(11), 1266-1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4757>
- Maiorino, F. M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., & Flohé, L. (1995). [5] Diversity of glutathione peroxidases. En *Methods in Enzymology* (Vol. 252, pp. 38-53). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52007-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52007-4)
- Maître, B., Jornot, L., & Junod, A. F. (1993). Effects of inhibition of catalase and superoxide dismutase activity on antioxidant enzyme mRNA levels. *The American Journal of Physiology*, 265(6 Pt 1), L636-643. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1993.265.6.L636>
- Manchado, M., Michán, C., & Pueyo, C. (2000). Hydrogen Peroxide Activates the SoxRS Regulon In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6842-6844. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6842-6844.2000>

Bibliografía

doi.org/10.1128/JB.182.23.6842-6844.2000

- Mancini, S., & Imlay, J. A. (2015). The induction of two biosynthetic enzymes helps *Escherichia coli* sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. *Molecular Microbiology*, 96(4), 744-763. <https://doi.org/10.1111/mmi.12967>
- Manoil, D., & Bouillaguet, S. (2018). Oxidative stress in bacteria measured by flow cytometry. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 8(1).
- Mansuy, P., Mougnot, N., Ramirez-Gil, J. F., Bonnefont-Rousselot, D., Raillecove, F., Komajda, M., & Lechat, P. (2000). Effects of Prolonged Propranolol Treatment on Left Ventricular Remodeling and Oxidative Stress After Myocardial Infarction in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35(5), 806-813.
- Mao, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., & Stone, M. P. (1999). Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6615-6620. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6615>
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2, 535-562. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>
- Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7634-7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7634>
- Marklund, S. L. (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochemical Journal*, 220(1), 269-272. <https://doi.org/10.1042/bj2200269>
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1-2), 83-95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00010-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00010-x)
- Martin, J. C., & Swartzendruber, D. E. (1980). Time: A New Parameter for Kinetic Measurements in Flow Cytometry. *Science*, 207(4427), 199-201. <https://doi.org/10.1126/science.6153131>

- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & De Paz, P. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(s2), 67-78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Martín-Fernández, M., Aller, R., Heredia-Rodríguez, M., Gómez-Sánchez, E., Martínez-Paz, P., Gonzalo-Benito, H., Sánchez-de Prada, L., Gorgojo, Ó., Carnicero-Frutos, I., Tamayo, E., & Tamayo-Velasco, Á. (2021). Lipid peroxidation as a hallmark of severity in COVID-19 patients. *Redox Biology*, 48, 102181. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102181>
- Martínez, A., Urios, A., & Blanco, M. (2000). Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR+ parent WP2 uvrA/pKM101: Detection of 31 oxidative mutagens. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(1), 41-53. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00020-6)
- Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4620-4625. <https://doi.org/10.1073/pnas.032066599>
- Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22459-22462. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31664-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31664-2)
- Maurya, R., & Namdeo, M. (2021). Superoxide dismutase: A key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. *Reactive Oxygen Species*.
- McBee, M. E., Chionh, Y. H., Sharaf, M. L., Ho, P., Cai, M. W. L., & Dedon, P. C. (2017). Production of Superoxide in Bacteria Is Stress- and Cell State-Dependent: A Gating-Optimized Flow Cytometry Method that Minimizes ROS Measurement Artifacts with Fluorescent Dyes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00459>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Bibliografía

- McHugh, J. P., Rodríguez-Quiñones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E., & Andrews, S. C. (2003). Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*: A NEW MECHANISM FOR IRON HOMEOSTASIS*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29478-29486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303381200>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Memar, M. Y., Ghotaslou, R., Samiei, M., & Adibkia, K. (2018). Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. *Infection and Drug Resistance*, 11, 567-576. <https://doi.org/10.2147/IDR.S142397>
- Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2015). Doxorubicin induces apoptosis in Jurkat cells by mitochondria-dependent and mitochondria-independent mechanisms under normoxic and hypoxic conditions. *Anti-Cancer Drugs*, 26(6), 583-598. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000223>
- Mendoza-Chamizo, B., Løbner-Olesen, A., & Charbon, G. (2018). Coping with Reactive Oxygen Species to Ensure Genome Stability in *Escherichia coli*. *Genes*, 9(11), 565. <https://doi.org/10.3390/genes9110565>
- Messner, K. R., & Imlay, J. A. (2002). Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42563-42571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204958200>
- Miao, L., & St. Clair, D. K. (2009). Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free radical biology & medicine*, 47(4), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>
- Michaelis, L. (1939). Free Radicals as Intermediate Steps of Oxidation-Reduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 7, 33-49. <https://doi.org/10.1101/SQB.1939.007.01.003>
- Miller, A.F. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS*

- Letters, 586(5), 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>
- Mills, S. A., & Marletta, M. A. (2005). Metal Binding Characteristics and Role of Iron Oxidation in the Ferric Uptake Regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 44(41), 13553-13559. <https://doi.org/10.1021/bi0507579>
- Miripour, Z. S., Sarrami-Forooshani, R., Sanati, H., Makarem, J., Taheri, M. S., Shojaeian, F., Eskafi, A. H., Abbasvandi, F., Namdar, N., Ghafari, H., Aghaee, P., Zandi, A., Faramarzpour, M., Hoseinyazdi, M., Tayebi, M., & Abdollahad, M. (2020). Real-time diagnosis of reactive oxygen species (ROS) in fresh sputum by electrochemical tracing; correlation between COVID-19 and viral-induced ROS in lung/respiratory epithelium during this pandemic. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112435. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112435>
- Mishra, S., & Imlay, J. (2012). Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of biochemistry and biophysics*, 525(2), 145-160. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.014>
- Monteiro, M.-C., Gonçalves, M.-J., Sansonetty, F., & O'Connor, J.-E. (2003). Flow Cytometric Analysis of Calcium Mobilization in Whole-Blood Platelets. *Current Protocols in Cytometry*, 24(1), 9.20.1-9.20.8. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0920s24>
- Monteiro, M.-C., Sansonetty, F., Gonçalves, M. J., & O'Connor, J. E. (1999). Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets using Fluo-3 and CD41. *Cytometry*, 35(4), 302-310.
- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J. (2004). Isoprostanes: Markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal*, 18(15), 1791-1800. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2330rev>
- Morán, J. M., Ortiz-Ortiz, M. A., Ruiz-Mesa, L. M., & Fuentes, J. M. (2010). Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(6), 402-409. <https://doi.org/10.1002/jbt.20348>
- Mordukhova, E. A., & Pan, J.-G. (2013). Evolved Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) Improves the Acetate and Thermal Tolerance of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7905-7915. <https://doi.org/10.1128/AEM.79.24.7905-7915.2013>

Bibliografía

doi.org/10.1128/AEM.01952-13

- Morgan, M. J., & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103-115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Morikawa, K., Ohniwa, R. L., Kim, J., Maruyama, A., Ohta, T., & Takeyasu, K. (2006). Bacterial nucleoid dynamics: Oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes to Cells*, 11(4), 409-423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00949.x>
- Morimyo, M. (1982). Anaerobic incubation enhances the colony formation of a *polA recB* strain of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 208-214. <https://doi.org/10.1128/jb.152.1.208-214.1982>
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., & Roberts, L. J. (1990). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9383-9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.23.9383>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B. J., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature protocols*, 2(9), 2295-2301. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.327>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G., & Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(1), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.106>
- Mukhopadhyay, S., & Schellhorn, H. E. (1997). Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of *Escherichia coli*: Genes that require OxyR for expression. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 330-338.
- Müller, I. E., Rubens, J. R., Jun, T., Graham, D., Xavier, R., & Lu, T. K. (2019). Gene networks that compensate for crosstalk with crosstalk. *Nature Communications*, 10(1), 4028. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12021-y>

- Mulvey, M. R., & Loewen, P. C. (1989). Nucleotide sequence of katF of Escherichia coli suggests KatF protein is a novel σ transcription factor. *Nucleic Acids Research*, 17(23), 9979-9991. <https://doi.org/10.1093/nar/17.23.9979>
- Münzel, T., Afanas'ev, I. B., Kleschyov, A. L., & Harrison, D. G. (2002). Detection of Superoxide in Vascular Tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), 1761-1768. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000034022.11764.EC>
- Murphy, M. P. (2008). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., & Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, 65(10), 1575-1582. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00083-2)
- Nakajima, H., Kobayashi, M., Negishi, T., & Aono, R. (1995). SoxRS Gene Increased the Level of Organic Solvent Tolerance in Escherichia coli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(7), 1323-1325. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1323>
- Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8841-8848. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>
- Nishida, T., Orikasa, Y., Watanabe, K., & Okuyama, H. (2006). The cell membrane-shielding function of eicosapentaenoic acid for Escherichia coli against exogenously added hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 580(28), 6690-6694. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.030>
- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., & Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS Journal*, 275(13), 3278-3289. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x>
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the

Bibliografía

- licentiate thesis “Thioredoxin reductase—Interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4. Free Radical Biology and Medicine, 31(11), 1287-1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Nunoshiba, T., deRojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., & Demple, B. (1993). Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 9993-9997. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.9993>
- Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Cuevas, C. F. A., & Demple, B. (1992). Two-stage control of an oxidative stress regulon: The *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *Journal of Bacteriology*, 174(19), 6054-6060. <https://doi.org/10.1128/jb.174.19.6054-6060.1992>
- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annual Review of Microbiology*, 58, 161-181. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123818>
- O’Brian, M. R. (2015). Perception and Homeostatic Control of Iron in the Rhizobia and Related Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 229-245. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104432>
- O’Connor, J.E., Callaghan, R. C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.-C., & Montolú, H. (2001). The Relevance of Flow Cytometry for Biochemical Analysis. *IUBMB Life*, 51(4), 231-239. <https://doi.org/10.1080/152165401753311771>
- O’Connor, J.E., Herrera, G., Martínez-Romero, A., Bodi, C., Valero, C., Callaghan, R., & Monteiro, M.-C. (2005). 7. La citometría de flujo en el análisis citómico: In vivo, in vitro ¿in fluxo? En M. Cascales Angosto, M. J. Gómez Lechón, & J.-E. O’Connor (Eds.), *Las Omicas Genómica, Proteómica, Citómica y Metabólica: Modernas Tecnologías Para el Desarrollo de Fármacos* (pp. 183-206). Instituto de España-Real Academia Nacional de Farmacia.
- O’Connor, J.E., Herrera, G., Sala-de-Oyanguren, F., Jávega, B., & Martínez-Romero, A. (2017a). Cytomics of Oxidative Stress: Probes and Problems. En J. P. Robinson & A. Cossarizza (Eds.), *Single Cell Analysis: Contemporary*

- Research and Clinical Applications (pp. 83-118). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4499-1_4
- O'Connor, J.E., Herrera, G., Sala-de-Oyanguren, F., Jávega, B., & Martínez-Romero, A. (2017b). Cytomics of Oxidative Stress: Probes and Problems. En J. P. Robinson & A. Cossarizza (Eds.), *Single Cell Analysis: Contemporary Research and Clinical Applications* (pp. 83-118). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4499-1_4
- Oh, S.Y., Shin, J.H., & Roe, J.H. (2007). Dual Role of OhrR as a Repressor and an Activator in Response to Organic Hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 189(17), 6284-6292. <https://doi.org/10.1128/JB.00632-07>
- Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T., Watanabe, K., & Morita, N. (2007). Bacterial Genes Responsible for the Biosynthesis of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids and Their Heterologous Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 665-670. <https://doi.org/10.1128/AEM.02270-06>
- Outten, F. W., Djaman, O., & Storz, G. (2004). A suf operon requirement for Fe–S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 52(3), 861-872. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18-35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Pardillo-Díaz, R., Carrascal, L., Ayala, A., & Nunez-Abades, P. (2015). Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neuroscience*, 289, 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.055>
- Park, S., You, X., & Imlay, J. A. (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9317-9322. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502051102>

Bibliografía

- Parke, D. V. (1994). The cytochromes P450 and mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 102(10), 852-853. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102852>
- Partridge, J. D., Poole, R. K., & Green, Jeffrey. Y. 2007. (2007). The *Escherichia coli* *yhjA* gene, encoding a predicted cytochrome c peroxidase, is regulated by FNR and OxyR. *Microbiology*, 153(5), 1499-1509. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004838-0>
- Parvez, S., Long, M. J. C., Poganik, J. R., & Aye, Y. (2018). Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants. *Chemical Reviews*, 118(18), 8798-8888. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00698>
- Patten, C. L., Kirchhof, M. G., Schertzberg, M. R., Morton, R. A., & Schellhorn, H. E. (2004). Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(5), 580-591. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1089-2>
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends in biochemical sciences*, 40(8), 435-445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89-96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Pomposiello, P. J., & Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*, 19(3), 109-114.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01542-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01542-0)

- Poole, L. B. (2005). Bacterial defenses against oxidants: Mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 240-254. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.006>
- Pridmore, R. D., Pittet, A.-C., Praplan, F., & Cavadini, C. (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters*, 283(2), 210-215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01176.x>
- Prieto-Alamo, M. J., Abril, N., & Pueyo, C. (1993). Mutagenesis in *Escherichia coli* K-12 mutants defective in superoxide dismutase or catalase. *Carcinogenesis*, 14(2), 237-244. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.2.237>
- Prieto-Álamo, M.-J., Jurado, J., Gallardo-Madueño, R., Monje-Casas, F., Holmgren, A., & Pueyo, C. (2000). Transcriptional Regulation of Glutaredoxin and Thioredoxin Pathways and Related Enzymes in Response to Oxidative Stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13398-13405. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13398>
- Pruchniak, M. P., Arażna, M., & Demkow, U. (2016). Biochemistry of Oxidative Stress. En M. Pokorski (Ed.), *Advances in Clinical Science* (pp. 9-19). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/5584_2015_161
- Pryor, W. A. (1976). CHAPTER 1—The Role of Free Radical Reactions in Biological Systems. En W. A. Pryor (Ed.), *Free Radicals in Biology* (pp. 1-49). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-566501-8.50008-0>
- Pshenichnikov, S., Omelyanchik, A., Efremova, M., Lunova, M., Gazatova, N., Malashchenko, V., Khaziakhmatova, O., Litvinova, L., Perov, N., & Panina, L. (2021). Control of oxidative stress in Jurkat cells as a model of leukemia treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 523, 167623.
- Puget, K., & Michelson, A. M. (1974). Isolation of a new copper—Containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 58(3), 830-838. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(74\)80492-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(74)80492-4)

Bibliografía

- Qian, S. Y., & Buettner, G. R. (1999). Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: An electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(11), 1447-1456. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00002-7)
- Rabin, R. S., & Stewart, V. (1993). Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3259-3268. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3259-3268.1993>
- Radaković, M., Borozan, S., Djelić, N., Ivanović, S., Miladinović, D. Č., Ristanić, M., Spremo-Potparević, B., & Stanimirović, Z. (2018). Nitroso-Oxidative Stress, Acute Phase Response, and Cytogenetic Damage in Wistar Rats Treated with Adrenaline. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, e1805354. <https://doi.org/10.1155/2018/1805354>
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxy-nitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(5), 463-488. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00373-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00373-7)
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 2014, 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahman, S., Mathew, S., Nair, P., Ramadan, W. S., & Vazhappilly, C. G. (2021). Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. *Inflammopharmacology*, 29(4), 907-923. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00799-7>
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. 2012. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123>
- Rajalakshmi, S., Vyawahare, N., Pawar, A., Mahaparale, P., & Chellampillai, B. (2018). Current development in novel drug delivery systems of bioactive molecule plumbagin. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 209-218. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1417865>

- Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9149. <https://doi.org/10.3390/ijms21239149>
- Rau, J., & Stolz, A. (2003). Oxygen-Insensitive Nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* Function under Anaerobic Conditions as Lawsone-Dependent Azo Reductases. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3448-3455. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3448-3455.2003>
- Read, A. D., Bentley, R. ET., Archer, S. L., & Dunham-Snary, K. J. (2021). Mitochondrial iron–sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox Biology*, 47, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>
- Rhee, S. G. (1999). Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & Molecular Medicine*, 31(2), 53-59. <https://doi.org/10.1038/emm.1999.9>
- Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J. E., Corvilain, B., Miot, F., & De Deken, X. (2009). Activation of Dual Oxidases Duox1 and Duox2*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6725-6734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806893200>
- Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., & Swift, S. (2019). Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00801>
- Robinett, N. G., Peterson, R. L., & Culotta, V. C. (2018). Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4636-4643. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000182>
- Robinson, K. M., Janes, M. S., & Beckman, J. S. (2008). The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature Protocols*, 3(6), 941-947. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.56>
- Rocha, A. G., & Dancis, A. (2016). Life without Fe–S clusters. *Molecular Microbiology*, 99(5), 821-826. <https://doi.org/10.1111/mmi.13273>

Bibliografía

- Ron, E. Z. (2013). Bacterial Stress Response. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* (pp. 589-603). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_79
- Rothe, G., & Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, 47(5), 440-448.
- Royall, J. A., & Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302(2), 348-355. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1222>
- Rudra, S., Mukherjee, D., Dutta, M., Ghosh, A. K., Dey, M., Basu, A., Pattari, S. K., Chattopadhyay, A., & Bandyopadhyay, D. (2014). Orally administered melatonin protects against adrenaline-induced oxidative stress in rat liver and heart: Involvement of antioxidant mechanism (s). *J. Pharm. Res*, 8, 303-320.
- Ruis, H., & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17(11), 959-965. <https://doi.org/10.1002/bies.950171109>
- Ruiz-Ojeda, F. J., Gomez-Llorente, C., Aguilera, C. M., Gil, A., & Rupérez, A. I. (2016). Impact of 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT)-Derived Increase in Hydrogen Peroxide Levels on Inflammation and Metabolism in Human Differentiated Adipocytes. *PLOS ONE*, 11(3), e0152550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152550>
- Russell, E. G., & Cotter, T. G. (2015). New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 319, 221-254. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.004>
- Saito, Y., Uraki, F., Nakajima, S., Asaeda, A., Ono, K., Kubo, K., & Yamamoto, K. (1997). Characterization of endonuclease III (nth) and endonuclease VIII (nei) mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3783-3785. <https://doi.org/10.1128/jb.179.11.3783-3785.1997>

- Sammartano, L. J., Tuveson, R. W., & Davenport, R. (1986). Control of sensitivity to inactivation by H₂O₂ and broad-spectrum near-UV radiation by the *Escherichia coli* katF locus. *Journal of Bacteriology*, 168(1), 13-21. <https://doi.org/10.1128/jb.168.1.13-21.1986>
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Sawada, G. A., Barsuhn, C. L., Lutzke, B. S., Houghton, M. E., Padbury, G. E., Ho, N. F., & Raub, T. J. (1999). Increased lipophilicity and subsequent cell partitioning decrease passive transcellular diffusion of novel, highly lipophilic antioxidants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(3), 1317-1326.
- Scandalios, J. G. (2002). Oxidative stress responses—What have genome-scale studies taught us? *Genome Biology*, 3(7), reviews1019.1-reviews1019.6.
- Schellhorn, H. E. (1995). Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 131(2), 113-119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07764.x>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 383-393. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>
- Schreck, R., Albermann, K., & Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear Factor K_b: An Oxidative Stress-Responsive Transcription Factor of Eukaryotic Cells (A Review). *Free Radical Research Communications*, 17(4), 221-237. <https://doi.org/10.3109/10715769209079515>
- Schreck, R., Rieber, P., & Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*, 10(8), 2247-2258.
- Schröder, P., & Krutmann, J. (2005). Environmental Oxidative Stress – Environmental Sources of ROS. En T. Grune (Ed.), *Reactions, Processes: Oxidants and Antioxidant Defense Systems* (pp. 19-31). Springer. <https://doi.org/10.1007/>

Bibliografía

b101144

- Schulz, E., Wenzel, P., Münzel, T., & Daiber, A. (2014). Mitochondrial Redox Signaling: Interaction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with Other Sources of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2), 308-324. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4609>
- Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H., & Kiley, P. J. (2001). IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 14895-14900. <https://doi.org/10.1073/pnas.251550898>
- Ściskalska, M., Zalewska, M., Grzelak, A., & Milnerowicz, H. (2014). The Influence of the Occupational Exposure to Heavy Metals and Tobacco Smoke on the Selected Oxidative Stress Markers in Smelters. *Biological Trace Element Research*, 159(1), 59-68. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9984-9>
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2001a). Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7173-7181. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001>
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2001b). Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7182-7189. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7182-7189.2001>
- Sedoud, A., López-Igual, R., ur Rehman, A., Wilson, A., Perreau, F., Boulay, C., Vass, I., Krieger-Liszkay, A., & Kirilovsky, D. (2014). The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher. *The Plant Cell*, 26(4), 1781-1791. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123802>
- Segal, A. W. (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 197-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
- Seib, K. L., Wu, H.-J., Srikhanta, Y. N., Edwards, J. L., Falsetta, M. L., Hamilton, A. J., Maguire, T. L., Grimmond, S. M., Apicella, M. A., McEwan, A. G., & Jennings, M. P. (2007). Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*.

- Molecular Microbiology, 63(1), 54-68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05478.x>
- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138(3479), 32-32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: Principal remaining problems and misconceptions. *Canadian Medical Association Journal*, 115(1), 53-56.
- Semchyshyn, H., Bagnyukova, T., & Lushchak, V. (2005). Involvement of soxRS regulon in response of *Escherichia coli* to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(11), 1238-1244. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0253-6>
- Semchyshyn, H. M. (2014). Reactive Carbonyl Species In Vivo: Generation and Dual Biological Effects. *The Scientific World Journal*, 2014, e417842. <https://doi.org/10.1155/2014/417842>
- Sen, A., & Imlay, J. A. (2021). How Microbes Defend Themselves From Incoming Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Immunology*, 12, 667343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667343>
- Sen, A., Zhou, Y., & Imlay, J. A. (2020). During Oxidative Stress the Clp Proteins of *Escherichia coli* Ensure that Iron Pools Remain Sufficient To Reactivate Oxidized Metalloenzymes. *Journal of Bacteriology*, 202(18), e00235-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00235-20>
- Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R., & Palsson, B. O. (2015). Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Reports*, 12(8), 1289-1299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.043>
- Seth, D., Hausladen, A., & Stamler, J. S. (2019). Anaerobic Transcription by OxyR: A Novel Paradigm for Nitrosative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(12), 803-816. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7921>
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.-J., & Stamler, J. S. (2012). Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: Regulation by OxyR. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 470-473. <https://doi.org/10.1126/science.1215643>

Bibliografía

- Seth, D., Hess, D. T., Hausladen, A., Wang, L., Wang, Y.-J., & Stamler, J. S. (2018). A Multiplex Enzymatic Machinery for Cellular Protein S-nitrosylation. *Molecular Cell*, 69(3), 451-464.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.025>
- Shao, C., Folkard, M., & Prise, K. M. (2008). Role of TGF- β 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene*, 27(4), 434-440. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210653>
- Shapiro, H. M. (1983). Multistation multiparameter flow cytometry: A critical review and rationale. *Cytometry*, 3(4), 227-243. <https://doi.org/10.1002/cyto.990030402>
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons.
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.00694>
- Shehat, M. G., & Aranjuez-Tigno, J. (2019). Flow Cytometric Measurement Of ROS Production In Macrophages In Response To Fc γ R Cross-linking. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 145, 10.3791/59167. <https://doi.org/10.3791/59167>
- Sheplock, R., Recinos, D. A., Mackow, N., Dietrich, L. E. P., & Chander, M. (2013). Species-specific residues calibrate SoxR sensitivity to redox-active molecules. *Molecular microbiology*, 87(2), 368-381. <https://doi.org/10.1111/mmi.12101>
- Shimada, H., Yamaoka, Y., Morita, R., Mizuno, T., Gotoh, K., Higuchi, T., Shiraishi, T., & Imamura, Y. (2012). Possible mechanism of superoxide formation through redox cycling of plumbagin in pig heart. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.007>
- Siedler, S., Schendzielorz, G., Binder, S., Eggeling, L., Bringer, S., & Bott, M. (2014). SoxR as a Single-Cell Biosensor for NADPH-Consuming Enzymes in *Escherichia*

- coli. *ACS Synthetic Biology*, 3(1), 41-47. <https://doi.org/10.1021/sb400110j>
- Siems, W. G., Grune, T., & Esterbauer, H. (1995). 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sciences*, 57(8), 785-789. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02006-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02006-5)
- Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. En *Oxidative Stress* (pp. 1-8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H. (2014). Role of Metabolic H₂O₂ Generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8735-8741. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>
- Sies, H. (2019). Chapter 13 - Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. En G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>
- Sies, H. (2020a). Chapter 1 - Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. En H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress* (pp. 3-12). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>
- Sies, H. (2020b). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>

Bibliografía

- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative Stress*. En G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Second Edition) (pp. 45-48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sies, H., & Menck, C. F. M. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/DNAging*, 275(3), 367-375. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90039-R](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90039-R)
- Singh, A. K., Shin, J.-H., Lee, K.-L., Imlay, J. A., & Roe, J.-H. (2013). Comparative study of SoxR activation by redox-active compounds. *Molecular Microbiology*, 90(5), 983-996. <https://doi.org/10.1111/mmi.12410>
- Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E., & Kalyanaraman, B. (1999). The peroxyxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 361(2), 331-339. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1007>
- Singh, S. K., SaiSree, L., Amrutha, R. N., & Reddy, M. (2012). Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Molecular Microbiology*, 86(5), 1036-1051. <https://doi.org/10.1111/mmi.12058>
- Ślesak, I., Kula, M., Ślesak, H., Miszański, Z., & Strzałka, K. (2019). How to define obligatory anaerobiosis? An evolutionary view on the antioxidant response system and the early stages of the evolution of life on Earth. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.004>
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity, 2019, e6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Sobota, J. M., & Imlay, J. A. (2011). Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(13), 5402-5407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100410108>
- Soh, N. (2006). Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), 532-543. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0366-9>
- Spielmann, A., Baumgart, M., & Bott, M. (2019). NADPH-related processes studied with a SoxR-based biosensor in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 8(7), e00785. <https://doi.org/10.1002/mbo3.785>
- Srinivas, P., Gopinath, G., Banerji, A., Dinakar, A., & Srinivas, G. (2004). Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 40(4), 201-211. <https://doi.org/10.1002/mc.20031>
- Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J.-P., & Fleury, M. J. J. (2017). Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 110, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015>
- Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), 931-936. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90269-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90269-0)
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *The Journal of Neuroscience*, 24(36), 7779-7788. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004>
- Staudinger, B. J., Oberdoerster, M. A., Lewis, P. J., & Rosen, H. (2002). mRNA expression profiles for *Escherichia coli* ingested by normal and phagocyte oxidase-deficient human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1151-1163. <https://doi.org/10.1172/JCI15268>
- Steenken, S. (1987). Addition–elimination paths in electron-transfer reactions

Bibliografía

between radicals and molecules. Oxidation of organic molecules by the OH radical. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 83(1), 113-124. <https://doi.org/10.1039/F19878300113>

Steinman, H. M. (1993). Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 175(4), 1198-1202.

Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*, 15, 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>

Storz, G., & Altuvia, S. (1994). [17] OxyR regulon. En *Methods in Enzymology* (Vol. 234, pp. 217-223). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34088-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34088-9)

Storz, G., & Tartaglia, L. A. (1992). OxyR: A Regulator of Antioxidant Genes. *The Journal of Nutrition*, 122(suppl_3), 627-630. https://doi.org/10.1093/jn/122.suppl_3.627

Storz, G., Tartaglia, L. A., & Ames, B. N. (1990a). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4952), 189-194. <https://doi.org/10.1126/science.2183352>

Storz, G., Tartaglia, L. A., & Ames, B. N. (1990b). The OxyR regulon. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 58(3), 157-161. <https://doi.org/10.1007/BF00548927>

Ströher, E., & Millar, A. H. (2012). The biological roles of glutaredoxins. *Biochemical Journal*, 446(3), 333-348. <https://doi.org/10.1042/BJ20112131>

Sun, J., Druhan, L. J., & Zweier, J. L. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(2), 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.11.019>

Szabó, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141, 105-112. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00507-6)

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the

- Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
- Tahara, E. B., Navarete, F. D. T., & Kowaltowski, A. J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9), 1283-1297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W.-B., Karbownik, M., & Calvo, J. R. (2000). Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products. *Neurosignals*, 9(3-4), 137-159. <https://doi.org/10.1159/000014635>
- Tang, Y., Quail, M. A., Artymiuk, P. J., Guest, J. R., & Green, J. (2002). *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: Post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 4), 1027-1037. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1027>
- Tao, K. (1997). OxyR-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, 179(18), 5967-5970. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5967-5970.1997>
- Tao, K. (1999). In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 457(1), 90-92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01013-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01013-3)
- Tao, K., Fujita, N., & Ishihama, A. (1993). Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Molecular Microbiology*, 7(6), 859-864. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01176.x>
- Tardat, B., & Touati, D. (1991). Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). *Molecular Microbiology*, 5(2), 455-465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02129.x>
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: In vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative*

Bibliografía

- and Comparative Physiology, 286(3), R431-R444. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00361.2003>
- Tartaglia, L. A., Gimeno, C. J., Storz, G., & Ames, B. N. (1992). Multidegenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 2038-2045.
- Tartaglia, L. A., Storz, G., & Ames, B. N. (1989). Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *Journal of Molecular Biology*, 210(4), 709-719. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90104-6)
- Tatum, F. M., Dettleux, P. G., Sacks, J. M., & Halling, S. M. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infection and Immunity*, 60(7), 2863-2869.
- Taverne, Y. J., Merkus, D., Bogers, A. J., Halliwell, B., Duncker, D. J., & Lyons, T. W. (2018). Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life. *BioEssays*, 40(3), 1700158. <https://doi.org/10.1002/bies.201700158>
- Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2013). OxyR acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *The FEBS Journal*, 280(14), 3298-3312. <https://doi.org/10.1111/febs.12312>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Theurey, P., & Pizzo, P. (2018). The Aging Mitochondria. *Genes*, 9(1), 22. <https://doi.org/10.3390/genes9010022>
- Thomas, J. P., Maiorino, M., Ursini, F., & Girotti, A. W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 265(1), 454-461. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40252-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40252-4)
- Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D., & Storz, G. (1994).

- Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: A mechanism for differential promoter selection. *Cell*, 78(5), 897-909. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90702-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90702-1)
- Touati, D. (2000). Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*—How many ways are there to trigger soxRS response? *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 5(5), 287-293. <https://doi.org/10.1179/135100000101535825>
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., & Despied, S. (1995). Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: Protective role of superoxide dismutase. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2305-2314.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>
- Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2004). Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by α -Ketoglutarate Dehydrogenase. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7771-7778. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004>
- Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A., & Loewen, P. C. (1988). Nucleotide sequence of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 4415-4419.
- Tsaneva, I. R., & Weiss, B. (1990). SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4197-4205. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4197-4205.1990>
- Tucker, N. P., D'Autréaux, B., Studholme, D. J., Spiro, S., & Dixon, R. (2004). DNA Binding Activity of the *Escherichia coli* Nitric Oxide Sensor NorR Suggests a Conserved Target Sequence in Diverse Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6656-6660. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6656-6660.2004>
- Ueda, M., Kinoshita, H., Yoshida, T., Kamasawa, N., Osumi, M., & Tanaka, A. (2003). Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast

Bibliografía

- peroxisomal catalase in vivo. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01201-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01201-6)
- Ueki, Y., Nakamura, H., Matsumoto, K., Tominaga, T., Miyake, S., Kita, Y., Katayama, Y., Fukuyama, S., Hirasawa, Y., Yoshida, K., & Eguchi, K. (2002). NOR-1: A nitric oxide releasing agent for calibrating low levels of nitric oxide by the chemiluminescence method. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 13(2), 75-80.
- Uhl, A., Bitzer, M., Wolf, H., Hermann, D., Gutewort, S., Völkl, M., & Nagl, I. (2018). Peroxy Compounds, Organic. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 1-45). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a19_199.pub2
- Uden, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1320(3), 217-234. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00034-0)
- Uden, G., & Schirawski, J. (1997). The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: The search for signals and reactions. *Molecular Microbiology*, 25(2), 205-210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4731841.x>
- Urios, A., López-Gresa, M. P., González, M. C., Primo, J., Martínez, A., Herrera, G., Escudero, J. C., O'Connor, J.-E., & Blanco, M. (2003). Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: The influence of antioxidant defenses. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(11), 1373-1381. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.007>
- Ursini, F., Maiorino, M., & Forman, H. J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biology*, 8, 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27(2), 120-139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>

- Valet, G. (2005). Cytomics, the human cytochrome project and systems biology: Top-down resolution of the molecular biocomplexity of organisms by single cell analysis. *Cell Proliferation*, 38(4), 171-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2005.00342.x>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1), 37-56. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- van den Berg, J. J. M., Op den Kamp, J. A. F., Lubin, B. H., Roelofsen, B., & Kuypers, F. A. (1992). Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(6), 487-498. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90102-M](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90102-M)
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S. R., Alderson, N. L., Baynes, J. W., Epstein, C. J., Huang, T.-T., Nelson, J., Strong, R., & Richardson, A. (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological Genomics*, 16(1), 29-37. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00122.2003>
- Van Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1999). Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 466, 261-272. https://doi.org/10.1007/0-306-46818-2_31

Bibliografía

- Varghese, S., Tang, Y., & Imlay, J. A. (2003). Contrasting Sensitivities of *Escherichia coli* Aconitases A and B to Oxidation and Iron Depletion. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 221-230. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.221-230.2003>
- Varghese, S., Wu, A., Park, S., Imlay, K. R. C., & Imlay, J. A. (2007). Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 64(3), 822-830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05701.x>
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., & Kennedy, M. C. (2000). Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical: AN ELECTRON SPIN RESONANCE INVESTIGATION *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14064-14069. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14064>
- Vasudevan, S. G., Armarego, W. L., Shaw, D. C., Lilley, P. E., Dixon, N. E., & Poole, R. K. (1991). Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Molecular & General Genetics: MGG*, 226(1-2), 49-58. <https://doi.org/10.1007/BF00273586>
- Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450S in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current opinion in toxicology*, 7, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
- Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., & Fieschi, F. (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*, 10(6), 890. <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
- Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., & Gomez-Cabrera, M. C. (2013). The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 779-787. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5111>
- Visick, J. E., & Clarke, S. (1997). RpoS- and OxyR-independent induction of HPI catalase at stationary phase in *Escherichia coli* and identification of rpoS mutations in common laboratory strains. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4158-4163. <https://doi.org/10.1128/jb.179.13.4158-4163.1997>
- Walkup, L. K., & Kogoma, T. (1989). *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative

- stress mediated by the superoxide radical. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1476-1484. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1476-1484.1989>
- Wallberg, F., Tenev, T., & Meier, P. (2016). Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087387. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087387>
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., & Vasson, M.-P. (2003). Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: A comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta*, 331(1), 103-110. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00086-X](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00086-X)
- Wan, F., Yin, J., Sun, W., & Gao, H. (2019). Oxidized OxyR Up-Regulates ahpCF Expression to Suppress Plating Defects of oxyR- and Catalase-Deficient Strains. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00439>
- Wang, F., Yuan, Q., Chen, F., Pang, J., Pan, C., Xu, F., & Chen, Y. (2021). Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 742483. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.742483>
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader¹¹Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5), 612-616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R., & Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 359-366. <https://doi.org/10.1038/nchembio.560>
- Wang, X., Mukhopadhyay, P., Wood, M. J., Outten, F. W., Opdyke, J. A., & Storz, G. (2006). Mutational Analysis To Define an Activating Region on the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8335-8342. <https://doi.org/10.1128/JB.01318-06>

Bibliografía

- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Y., Zang, Q. S., Liu, Z., Wu, Q., Maass, D., Dulan, G., Shaul, P. W., Melito, L., Frantz, D. E., Kilgore, J. A., Williams, N. S., Terada, L. S., & Nwariaku, F. E. (2011). Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(3), C695-C704. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00322.2010>
- Wardman, P. (2008). Chapter Fourteen—Methods to Measure the Reactivity of Peroxynitrite-Derived Oxidants Toward Reduced Fluoresceins and Rhodamines. En E. Cadenas & L. Packer (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 441, pp. 261-282). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01214-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01214-7)
- Wardman, P., Burkitt, M. J., Patel, K. B., Lawrence, A., Jones, C. M., Everett, S. A., & Vojnovic, B. (2002). Pitfalls in the Use of Common Luminescent Probes for Oxidative and Nitrosative Stress. *Journal of Fluorescence*, 12(1), 65-68. <https://doi.org/10.1023/A:1015363220266>
- Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K., & Miki, K. (2008). Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4121-4126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709188105>
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: Σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1591-1603. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005>
- Wei, Q., Minh, P. N. L., Dötsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., Schulz, S., Plaisance, S., Charlier, D., Hassett, D., Häussler, S., & Cornelis, P. (2012). Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic acids research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks017>
- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and

- Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472-484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>
- Weiss, S. J., & LoBuglio, A. F. (1982). Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(1), 5-18.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295. <https://doi.org/10.1080/10408690490468489>
- Wink, D. A., & Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(4-5), 434-456. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00092-6)
- Winterbourn, C. C. (2020). Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0101-8>
- Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2000). Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), 403-409. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00204-5)
- Wofford, J. D., Bolaji, N., Dziuba, N., Outten, F. W., & Lindahl, P. A. (2019). Evidence that a respiratory shield in *Escherichia coli* protects a low-molecular-mass FeII pool from O₂-dependent oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(1), 50-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005233>
- Wood, Z. A., Schröder, E., Robin Harris, J., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32-40. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00003-8)
- Woods, S. A., Schwartzbach, S. D., & Guest, J. R. (1988). Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 954, 14-26. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90050-7)
- Woolley, J. F., Stanicka, J., & Cotter, T. G. (2013). Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(11), 556-565. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.009>

Bibliografía

- Wrona, M., Patel, K., & Wardman, P. (2005). Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.022>
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489-492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Wu, J., Dunham, W. R., & Weiss, B. (1995). Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 10323-10327. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.17.10323>
- Wu, J., & Weiss, B. (1991). Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(9), 2864-2871. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.2864-2871.1991>
- Wu, L., Sedgwick, A. C., Sun, X., Bull, S. D., He, X.-P., & James, T. D. (2019). Reaction-Based Fluorescent Probes for the Detection and Imaging of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species. *Accounts of Chemical Research*, 52(9), 2582-2597. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00302>
- Xian, J.-A., Guo, H., Li, B., Miao, Y.-T., Ye, J.-M., Zhang, S.-P., Pan, X.-B., Ye, C.-X., Wang, A.-L., & Hao, X.-M. (2013). Measurement of intracellular nitric oxide (NO) production in shrimp haemocytes by flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 2032-2039. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.014>
- Xu, J., Zhang, Y., Yu, H., Gao, X., & Shao, S. (2016). Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 88(2), 1455-1461. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04424>
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: A Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiological Reviews*, 98(3), 1169-1203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X.

- (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* : CR, 37, 266. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>
- Yarana, C., & St. Clair, D. K. (2017). Chemotherapy-Induced Tissue Injury: An Insight into the Role of Extracellular Vesicles-Mediated Oxidative Stress Responses. *Antioxidants*, 6(4), 75. <https://doi.org/10.3390/antiox6040075>
- Yoon, S. J., Park, J. E., Yang, J.-H., & Park, J.-W. (2002). OxyR regulon controls lipid peroxidation-mediated oxidative stress in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(3), 297-301. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.3.297>
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1527-1548. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., & Storz, G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *The EMBO Journal*, 17(20), 6061-6068. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6061>
- Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
- Zhao, W. (2009). Lighting up H₂O₂: The Molecule that Is a “Necessary Evil” in the Cell. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(17), 3022-3024. <https://doi.org/10.1002/anie.200805651>
- Zheng, M., Åslund, F., & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science*, 279(5357), 1718-1722. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1718>
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., & Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS Regulation of *fur*. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4639-4643.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., & Storz, G. (2001). DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4562-

Bibliografía

4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562-4570.2001>

Zielonka, J., & Kalyanaraman, B. (2010). Hydroethidine- and Mito-SOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free radical biology & medicine*, 48(8), 983-1001. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028>

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533-616.

Recursos web

BioLegend. (2022). *Helix NP Green*. Recuperado 2 de abril de 2022, de <https://www.biolegend.com/en-us/products/helix-np-green-13854>

Enzolifesciences. *ENZ-51010. ROS id total ROS superoxide detection kit*. Recuperado 2 de abril de 2022, de <https://www.enzolifesciences.com/ENZ-51010/ros-id-total-ros-superoxide-detection-kit/>

PubChem. (2022a). Compound Summary for CID 784. Hydrogen peroxide. Recuperado 15 de abril de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-peroxide>

PubChem. (2022b). Compound Summary for CID 6410. Tert-butyl hydroperoxide. Recuperado 15 de abril de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tert-butyl-hydroperoxide>

PubChem. (2022c). Compound Summary for CID 6629, Cumene hydroperoxide. Recuperado 15 de abril de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cumene-hydroperoxide>

PubChem. (2022d). Compound Summary for CID 4055, Menadione. Recuperado 15 de abril de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menadione>

PubChem. (2022e). Compound Summary for CID 15939, Paraquat. Recuperado 15 de abril de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Paraquat>

- PubMed. (2022a). Jurkat cytometry. Recuperado 12 de abril de 2022, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=jurkat+cytometry>
- PubMed. (2022b). Jurkat cytometry oxidative. Recuperado 12 de abril de 2022, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=jurkat+cytometry+oxidative>
- PubMed. (2022c). Jurkat cytometry oxidative stress. Recuperado 12 de abril de 2022, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=jurkat+oxidative+stress>
- Thermofisher (2022a). *Molecular probes the handbook. Probes for reactive oxygen species including nitric oxide*. Recuperado 10 de febrero de 2022, de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide.html>
- Thermofisher (2022b). *CellROX™ Reagent Variety Pack, for oxidative stress detection*. Recuperado 10 de febrero de 2022, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10448?SID=srch-srp-C10448>

