

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de los Alimentos

“Efecto Antimicrobiano y Retinoprotector de Omocromos Extraídos de la Piel de *Octopus vulgaris*: Estudio de la Respuesta a la Inflamación con Toxinas Microbianas y al Estrés Oxidativo”

TESIS

POR COMPILACIÓN DE PUBLICACIONES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Lidianys María Lewis Luján

Hermosillo, Sonora

Enero 2023

APROBACIÓN

“Efecto Antimicrobiano y Retinoprotector de Omocromos Extraídos de la Piel de *Octopus vulgaris*: Estudio de la Respuesta a la Inflamación con Toxinas Microbianas y al Estrés Oxidativo”



Autora

M.C. Lidianys María Lewis Luján



Dra. Ema Carina Rosas Burgos

Directora de la tesis



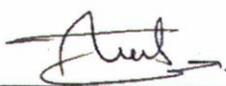
Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Co (directora) de tesis



Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer

Secretario



Dra. María Guadalupe Burboa-Zazueta

Sinodal



Dra. Giselle Pentón Roll

Sinodal

Hermosillo, Sonora

Enero, 2023

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Hermosillo, Sonora a 18 de Enero de 2023

Asunto: Cesión de derechos

UNIVERSIDAD DE SONORA

PRESENTE

Por este conducto hago constar que soy autora y titular de la obra denominada “Efecto Antimicrobiano y Retinoprotector de Omocromos Extraídos de la Piel de *Octopus vulgaris*: Estudio de la Respuesta a la Inflamación con Toxinas Microbianas y al Estrés Oxidativo”, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

ATENTAMENTE



Lidianys María Lewis Luján

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. Ema Carina Rosas Burgos, sin usted y sus virtudes de paciencia, capacidad de trabajo, profesionalismo y humanismo este trabajo hubiese sido más difícil. Muchas gracias por sus palabras de aliento y fuerzas cuando más las necesité.

A la Dra. Maribel Plascencia Jatomea, usted formó parte importante en la co-dirección del trabajo de tesis con sus aportaciones profesionales. Gracias por sus valiosas orientaciones.

Para la Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer por permitirme formar parte de su proyecto de investigación sobre los omocromos de cefalópodos y abrir las puertas a un tema que cautivó mi apasionamiento.

A todos los miembros del comité de tesis la Dra. Lupita Burboa (DICTUS), la Dra. Giselle Pentón (CIGB, Cuba), el Dr. Francisco Chávez (Universidad de Chile) por sus contribuciones, críticas, comentarios y mejoras continuas en cada una de las etapas de la investigación.

A mis compañeros de generación Martín, Sócrates, Óscar (colombiano), a mi hermana cubana, Anaiza que siempre estuvo para para oírme y dar sus sabios consejos. A los docentes de la UNISON por compartir sus conocimientos de manera profesional. Muy en especial a la Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez y la Dra. Teresa del Castillo Castro (Departamento Polímeros y Materiales) por facilitar el acceso a sus laboratorios y recursos materiales.

Al CONACYT por el ofrecimiento de Beca de Doctorado y por financiar el proyecto No. 2174 (I0000 / 230/2018).

Todo trabajo investigativo lleva consigo desafíos, retos, presiones que pueden ser superados con la ayuda de personas excepcionales, en este caso llega el momento de expresarles mis más profundos agradecimientos a la Dra. Alexa Klettner y al Dr. Philipp Dörschmann (Universidad de Kiel, Alemania), al Dr. Alexander Dontsov, a la Dra. Marina Yakovleva y al Dr. Mikhail Ostrovsky (Instituto Emanuel de Física Bioquímica, Rusia).

Y hasta el final a mis mejores guías de vida, los impulsores de esta meta conquistada, orgullosa de haberlos elegido mis padres y que estén a mi lado en este momento tan importante.

DEDICATORIA

- *A mis padres por inculcarme el amor a la ciencia, ser siempre mis guías y motores impulsores para alcanzar mis logros y sueños.*
- *A mi esposo por su inmenso apoyo y amor, compartiendo todos los retos y triunfos a mi lado.*
- *A mis hijas fuentes inagotables de energía y felicidad, por las que todo sacrificio vale el esfuerzo realizado.*
- *A Dr. Mark F. McCarty a la altura de un Premio Nobel por sus aportaciones científicas a la Bioquímica y la Nutrición muy valiosas en mi formación profesional.*

RESUMEN

La capacidad de manipular el color en respuesta a diversos estímulos externos se observa en una amplia gama de animales acuáticos y terrestres con fines de comunicación, defensa, función óptica o reproducción. Los cefalópodos, como los pulpos, pueden mostrar colores visibles en una amplia gama espectral utilizando nanoestructuras altamente ordenadas conocidas como pigmentos omocromos, lo que los convierte en algunos de los sistemas fotónicos más sofisticados de la naturaleza. El presente proyecto de investigación se centra en investigar la capacidad antioxidante, antimicrobiana y retinoprotectora asociado al desarrollo de patologías oculares en humanos que poseen los omocromos extraídos de la piel del pulpo (*Octopus vulgaris*). Los resultados obtenidos revelaron sensibilidad moderada frente algunas bacterias mientras especies de *Pseudomonas* y hongos filamentosos fueron tolerantes a los pigmentos. Estudios *in vitro* mostraron efecto antioxidante y antiglicativo por inhibición de la reacción de fructosilación por los omocromos. Además, estos compuestos tuvieron efectos protectores a la retina al disminuir la muerte celular de ARPE-19 sometida a ferroptosis. Es la primera vez que se reporta actividad antiinflamatoria y antiangiogénica al disminuir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 inducidas por Poly I:C y el VEGF en EPR primario. Esta sustancia es de interés para futuras investigaciones sobre la degeneración macular relacionada con la edad.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS.....	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	11
DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	12
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	27
REFERENCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Cambio de color de <i>Octopus vulgaris</i> debido a la presencia en la piel de omocromosomas con pigmentos (omocromos).....	03
2. Estructuras de omocromos: omatinas y sus sustituyentes (fenoxazona) y omia A (fenotiazina).....	04
3. Localización anatómica de la retina, el epitelio pigmentario de retina (EPR) y pérdida de la visión central por DMAE.....	07
4. El estrés oxidativo (ROS), la inflamación (IL-6, IL-1 β) como inductores de estímulo para la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) involucrados en la patología de la DMAE.....	09
5. Etapas y actividades realizadas para evaluar la actividad biológica de omocromos extraídos de <i>Octopus vulgaris</i>	14

INTRODUCCIÓN

El medio marino comprende ecosistemas complejos y se sabe que muchos organismos poseen compuestos bioactivos como medio común de autodefensa o protección. Hoy en día, además de ser de interés económico, los cefalópodos son importantes modelos biológicos enfocados a la conservación de los alimentos y a la salud (Jereb et al., 2014; Ezquerro-Brauer et al., 2016; Ezquerro-Brauer y Aubourg, 2019). El grupo de los pulpos constituye aproximadamente un tercio de la población de cefalópodos, con alrededor de 300 especies que se encuentran en aguas de todo el mundo. El grupo de cefalópodos más estudiado y económicamente significativo es el "grupo de pulpos". La especie más representativa es el pulpo común, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). El grupo *O. vulgaris* representa el 50% de la captura total de pesquerías de octópodos del mundo, supera las 380,000 toneladas y tiene un valor de exportación internacional de US \$ 1 mil millones (SAGARPA-CONAPESCA, 2017; Lima et al., 2017; Domínguez-Contreras et al., 2018).

El pulpo tiene la capacidad de alterar dinámicamente su apariencia o patrón corporal mostrando rápidamente una amplia gama de camuflajes y formas para adaptarse a su entorno y pasar desapercibido. Esta capacidad de supervivencia o adaptabilidad es llevada a cabo por los cromatóforos presentes en la piel, que son órganos neuromusculares (omocromosomas), innervados directamente desde el cerebro que contienen a los gránulos nanoestructurados de pigmentos omocromos (Figura 1). El nombre omocromo proviene del griego "omma" ojo y "chroma" color, son las sustancias que dan el color pardo y rojizo a los ojos de los insectos y son las efectoras del cambio de color en los cefalópodos. Los cromatóforos logran sus efectos visuales junto con otros "elementos" en la piel: iridóforos, leucóforos y músculos de la piel. Estos se organizan precisamente uno con respecto al otro como resultado de un proceso de desarrollo complejo y altamente organizado (Figon y Casas, 2018; Chatterjee et al., 2018; Williams et al., 2019).

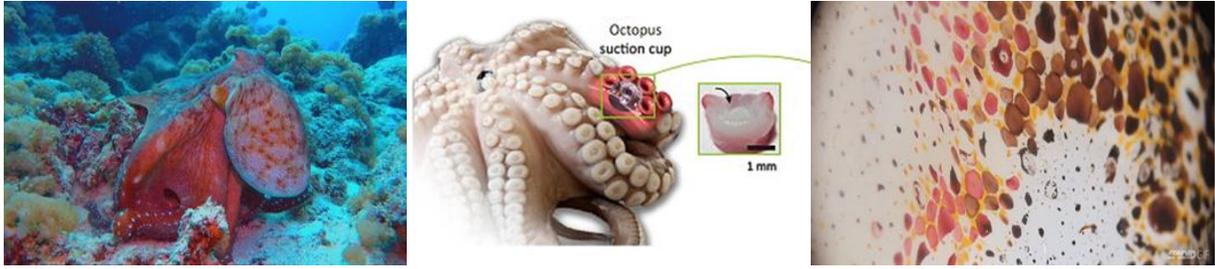


Figura 1. Cambio de color de *Octopus vulgaris* debido a la presencia en la piel de omocromosomas con pigmentos (omocromos). Fuente: <https://www.tuiris.com/pulpos-mejores-camuflarse-conoce-lo/>

Los pigmentos cromóforos son los responsables de una amplia gama de funciones fisiológicas en los animales. Las principales actividades que realizan los omocromos están relacionadas con el cambio de color de la piel, la filtración de la luz en los ojos, la protección antioxidante, el control de la sensibilidad espectral de los fotorreceptores en las células reticulares y la desintoxicación del exceso de triptófano. Actualmente se están aprovechando estos compuestos para usos biotecnológicos y en el desarrollo de nuevos materiales para dispositivos electrónicos derivado de las estructuras que los forman (Williams et al., 2016; Ezquerro-Brauer et al., 2016; Figon y Casas, 2018; Kumar et al., 2018; Ushakova et al., 2019; Chan-Higuera et al., 2019b; Dontsov et al., 2020; Bonnard et al., 2021). La biogénesis de estos compuestos se lleva a cabo a partir de la vía de oxidación metabólica del triptófano y entre los principales productos se encuentran la kinurenina, el ácido kinurénico, la 3-hidroxiikinurenina, la xantomatina y la omatina D. Estos pigmentos omocrómicos son una clase de metabolitos aromáticos policíclicos que comprenden derivados de la fenoxazona/fenotiazina sustituidos con la característica de absorbancias máximas en la región ultravioleta visible (UV-vis) a 360 y 480 nm.

La estructura exacta de los omocromos solo se ha propuesto para muy pocos compuestos, principalmente a partir de la determinación por espectrometría de masas. La diversidad estructural de los omocromos es alta, lo que puede estar relacionado con los métodos de extracción (por ejemplo, la apertura del anillo de fenoxazona tras la exposición a la luz o la hidrólisis en condiciones ácidas). La caracterización

estructural completa de los omocromos es un desafío debido a su variabilidad y complejidad estructural. Además, su baja solubilidad se suma a lo difícil de su caracterización. Las familias principales de los omocromos están compuestas por omatinas (bajo peso molecular, termolábil y color claro) y ominas/ omininas (alto peso molecular, termosensible y relacionada con coloraciones intensas). La estructura de los omocromos se basa en una fenoxazona (omatinas) o anillo de fenotiazina (ominas y omininas). Los cambios estructurales de las omatinas se dan por sustituciones de la cadena lateral del anillo (OR): dihidroxantomimatina (R= forma reducida H), rodomatina (R= β -glucosil), omatina D (R= SO_3H) y xantomamatina descarboxilada (COOH eliminado). La estructura química ofrece un sistema electrónico de deslocalización construido sobre un anillo aromático policíclico y asimétrico, el cual está compuesto por heteroátomos (N y O o S) (Figura 2) (Figon y Casas, 2018; Chatterjee et al., 2018; Williams et al., 2019; Figon et al., 2020; Dontsov et al., 2020; Bonnard et al., 2021).

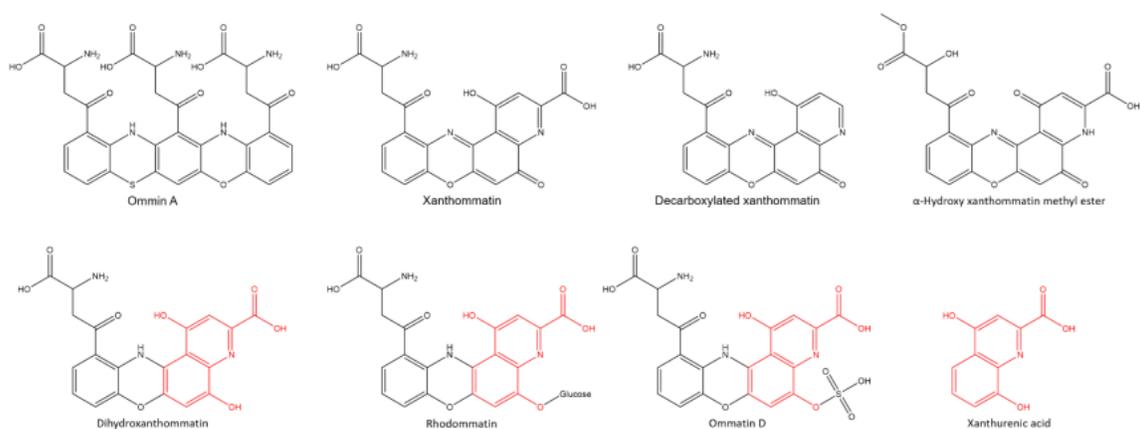


Figura 2. Estructuras de omocromos: omatinas y sus sustituyentes (fenoxazona) y omina A (fenotiazina). Fuente: Bonnard et al. (2021).

El solvente más comúnmente utilizado para extraer a los omocromos es el metanol acidificado con ácido clorhídrico al 0,5-5% (MeOH/HCl (Bolognese et al., 2002; Riou y Christidès, 2010; Williams et al., 2016; Ostrovsky et al., 2018). Trabajos más recientes han utilizado una combinación de etanol y ácido acético (CH_3COOH) para aislar pigmentos omocromos de la piel de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Aubourg et al.,

2016; Chan-Higuera et al., 2019a; Chan-Higuera et al., 2019b) y de metanol/etanol/HCl en *O. vulgaris* (Esparza-Espinoza et al., 2021); sin embargo, el cambio de color asociado con el potencial redox de los disolventes utilizados ha sido poco estudiado. En este trabajo de tesis se evaluó el efecto de dos tipos de extracción con solvente metanol acidificado (HCl o ácido acético), los cuales varían en la capacidad redox de los omocromos extraídos.

El interés en encontrar antioxidantes y antimicrobianos de fuentes naturales de origen animal ha colocado a los pigmentos omocromos de cefalópodos en el centro de atención. Las propiedades químicas de los cromóforos a menudo los hacen adecuados para transportar electrones o reaccionar con oxidantes, reductores, radicales libres, así como para funcionar en el ciclo de la visión. El estado redox de los omocromos (anillos de fenoxazina/fenoxazinona) les permiten actuar como efectivas moléculas antirradicalarias evitando el exceso de radicales libres y contrarrestando el nocivo estrés oxidativo (Romero y Martínez, 2015; Farmer et al., 2017; Figon y Casas, 2018; Dontsov et al., 2020; Figon et al., 2020).

En este sentido, se han realizado estudios relacionando a los omocromos y melaninas con la inhibición de la oxidación de los lípidos de la membrana celular y el retraso de la peroxidación lipídica por varios factores prooxidantes (radical superóxido, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, hidroperóxidos lipídicos y radicales óxido de nitrógeno, etc.) (Ostrovsky et al., 1966; Dontsov et al., 1980; Ostrovsky et al., 1980; Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky y Dontsov, 2019). En ensayos *in vivo* se demostró que las fenoxazinas y las fenotiazinas son los inhibidores más potentes de la autooxidación y la ferroptosis (estrés oxidativo dependiente del hierro) al atrapar los radicales lipídicos, rompiendo así el mecanismo de propagación (Shah et al., 2017).

Por otra parte, el uso de las fenoxazinonas naturales y sintéticas han mostrado tener actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, inmunosupresora, anticáncer o citotóxica por ser compuestos intercalantes de ácidos nucleicos (Gao et al., 2002; Shimizu et al., 2004; Hendrich et al., 2006; Hayashi et al., 2008; Le Roes-Hill et al., 2009). Actualmente, se ha prestado atención a la investigación de fuentes naturales

de sustancias biológicamente activas como los pigmentos de omocromos obtenidos de la piel de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Aubourg et al., 2016; Chan-Higuera et al., 2019a; Chan-Higuera et al., 2019b; Ezquerra-Brauer et al., 2019) y omocromos de ojos de mosca *Hermetia illucens* (Ushakova et al., 2019; Dontsov et al., 2020). El extracto crudo de omocromo de piel de calamar extraído con etanol/ácido acético mostró una reducción en el recuento microbiano (aerobios, psicrófilos, enterobacterias y conteos proteolíticos y lipolíticos) durante el almacenamiento refrigerado de caballa atlántica (*Scomber scombrus*) (Ezquerra-Brauer et al., 2016). Además, el mismo extracto inhibió la actividad microbiana y la hidrólisis de lípidos y extendió la vida de anaquel durante el almacenamiento refrigerado de merluza europea (*Merluccius merluccius*) (Ezquerra-Brauer et al., 2016). De igual manera se reportó que la adición de 0.05% de extracto metanólico de omocromo de *O. vulgaris* y *D. gigas* inhibió el crecimiento microbiano (conteo total de bacterias aeróbicas, bacterias ácido-lácticas, enterobacterias y hongos filamentosos/levaduras) en hamburguesas de pollo, extendiéndose la durabilidad a 12 días de almacenamiento refrigerado (Esparza-Espinoza et al., 2022).

Otro aspecto importante para tener en cuenta es la función óptica de los omocromos donde se ha reportado que los órganos de la visión en los cefalópodos (pulpos, calamares) presentan ojos tipo cámara, al igual que en los organismos vertebrados, pero las células fotorreceptoras (rabdoms) son las mismas de los invertebrados. Estas células contienen pigmentos visuales retinales fotosensibles y no sensibles a la luz cuyas funciones son la filtración y absorción de ciertas regiones de la luz UV-visible para evitar el efecto dañino de la misma. Los pigmentos de cribado en los ojos de vertebrados y humanos son los gránulos de melanina contenidos en los melanosomas, mientras que en los ojos de invertebrados son los pigmentos de omocromos. Las melaninas y los omocromos son los principales pigmentos del ojo que protegen por filtración óptica a las células fotorreceptoras de factores prooxidantes y por neutralización química de los radicales libres (Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky y Dontsov, 2019).

Durante el proceso de envejecimiento en las células humanas del epitelio pigmentario (EPR) ocurre una significativa disminución en el número de melanosomas con una pérdida sensible de la concentración de melanina. Además, los melanosomas son fusionados a la lipofuscina formando los gránulos de melanolipofuscina. El aumento en la cantidad del pigmento de envejecimiento (melanolipofuscina) causa la destrucción de la melanina debido a la generación de radicales superóxidos por los fluoróforos de lipofuscina bajo la influencia de la luz (Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky y Dontsov, 2019). El estrés fotooxidativo en células del EPR está directamente asociado al desarrollo de complicadas patologías oculares como la degeneración macular asociada a la edad y la retinitis pigmentaria.

Dentro de las enfermedades oculares, las alteraciones en la retina y la coroides son las causas principales de ceguera en el mundo. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la principal causa del deterioro visual en los países industrializados, con una incidencia al aumento debido a los cambios demográficos y a los nuevos estilos de vida (Knobbe y Stojanoska, 2017; Bourne et al., 2018). A nivel celular, la patología de la DMAE tiene lugar entre los fotorreceptores sensibles a la luz, el epitelio pigmentario de retina (EPR) subyacente que mantiene los fotorreceptores y la coroides que suministra oxígeno y nutrientes a estas células (Figura 3) (Bhutto y Lutty, 2012).

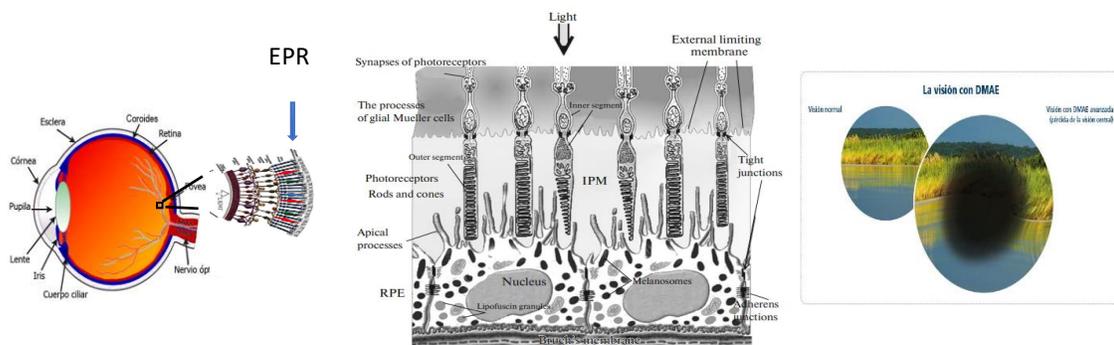


Figura 3. Localización anatómica de la retina, el epitelio pigmentario de retina (EPR) y pérdida de la visión central por DMAE. Fuente: Ostrovsky et al. (2018) y <https://arbraysslaser.com/degeneracion-macular/>.

La DMAE es una enfermedad multifactorial donde la vejez, la disposición genética y los factores ambientales son considerados como los factores de riesgo más importantes (Heesterbeek et al., 2020). Las vías patológicas incluyen el estrés oxidativo, la inflamación y, en el caso de la forma exudativa de DMAE, la señalización proangiogénica (Miller et al., 2013; Kauppinen et al., 2016; Datta et al., 2017). El estrés oxidativo es una condición constante en la retina debido a la constante exposición a la luz visible, una alta tensión de oxígeno y una considerable producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las mitocondrias de los fotorreceptores y en las células del EPR (King et al., 2004; Lange et al., 2012; Kaarniranta et al., 2019). La inflamación crónica que persiste debido a los constantes estímulos degenerativos y proinflamatorios se considera un factor importante en el desarrollo de la DMAE (Lin et al., 2013; Kauppinen et al., 2016). El EPR expresa receptores tipo toll (TLR) para detectar patrones moleculares asociados al peligro y puede reaccionar a estas señales secretando citoquinas proinflamatorias, que también se supone que contribuyen al desarrollo de la DMAE (Klettner et al., 2020; Klettner y Roider, 2021).

Si bien el estrés oxidativo y la inflamación se consideran factores de estrés para todas las formas de DMAE, la angiogénesis es el principal mecanismo patogénico adicional en la DMAE exudativa (Figura 4). En la DMAE exudativa, los vasos patológicos crecen desde debajo de la coroides y hacia la retina (Cohen et al., 2007). Estos vasos son generalmente inmaduros y con fugas, causando edema, hemorragias (Klettner et al., 2020) y, en la enfermedad en etapa tardía, una cicatriz fibrótica (Green et al., 1999; Cohen et al., 2007). Estos cambios conducen a un rápido deterioro del tejido, lo que hace que este subtipo de DMAE sea responsable de la mayoría de la pérdida grave de la visión en la DMAE. La angiogénesis es un proceso complejo que involucra una gran cantidad de factores donde el factor más importante para la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Ferrara y Bunting, 1996; Marneros et al., 2005). El VEGF se secreta constitutivamente para proteger las células y mantener la fenestración del endotelio en la coroides, aunque su expresión se puede aumentar por una variedad de factores, tales como la hipoxia, el estrés oxidativo o los

estímulos proinflamatorios (Kannan et al., 2006; Klettner y Roider, 2009; Watkins et al., 2013; Klettner et al., 2013).

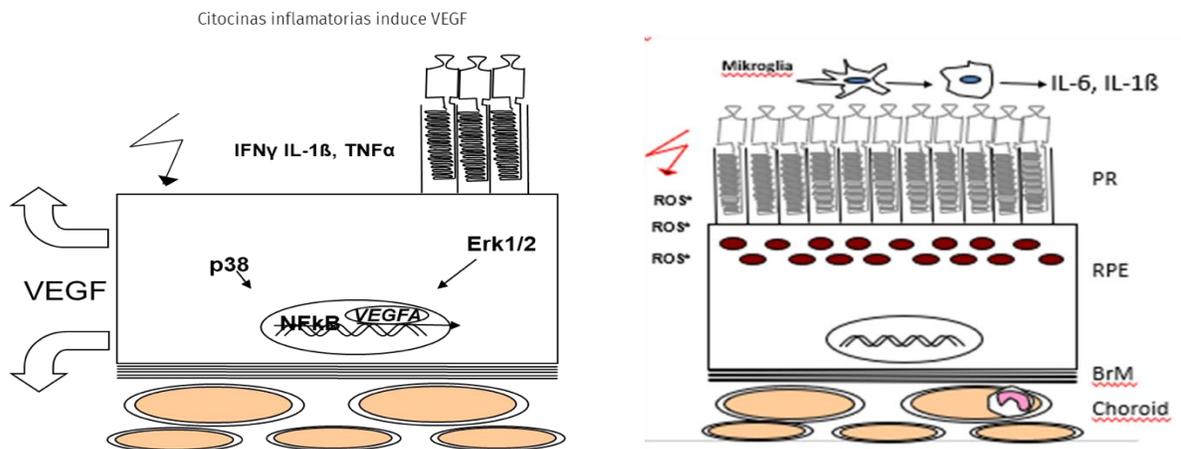


Figura 4. El estrés oxidativo (ROS), la inflamación (IL-6, IL-1 β) como inductores de estímulo para la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) involucrados en la patología de la DMAE: Fuentes: Klettner et al. (2020); Klettner y Roider (2021).

La capacidad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, así como el retardo del deterioro microbiano de alimentos frescos altamente perecederos resultan ser importantes estrategias naturales aprovechadas de los omocromos para conservar la calidad nutricional y microbiológica de los alimentos. La presente investigación se justificó ya que se ha considerado que los antibióticos de fenoxazinona son compuestos intercalantes de ácidos nucleicos, razón por la cual son agentes antimicrobianos y anticancerígenos efectivos, sin embargo, es necesario dilucidar el mecanismo por el cual los omocromos ejercen su actividad antimicrobiana. Escasos estudios han documentado en torno a las propiedades químicas y biológicas de los omocromos extraídos de *O. vulgaris*. Por las características anatómo-fisiológicas de los pigmentos omocromos localizados en los ojos de invertebrados con función óptica y antioxidante,

resulta un tema novedoso, inexplorado y de impacto social investigar la función retinoprotectora asociada al desarrollo de patologías oculares en humanos.

HIPÓTESIS

Los pigmentos omocrómicos presentes en la piel de pulpo (*Octopus vulgaris*) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, a través de un mecanismo de internalización y apoptosis relacionado a la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, son capaces de reducir la respuesta inflamatoria y oxidante en células retinianas y de macrófagos expuestos a toxinas microbianas y al estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar un extracto omocrómico de la piel de *Octopus vulgaris* y evaluar su efecto antimicrobiano y protector de la retina frente a la oxidación e inflamación en un modelo celular del Epitelio Pigmentario de Retina (ARPE-19) y macrófago (RAW 264.7).

Objetivos Específicos

- Obtener e identificar el compuesto o compuestos químicos omocrómicos responsables de la actividad biológica proveniente de la piel de pulpo, mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.
- Diferenciar la capacidad inhibitoria del extracto omocrómico de la piel de pulpo sobre las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* así como sobre la levadura: *Candida albicans* y los hongos filamentosos *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria spp* y *Fusarium verticillioides*, así como establecer un posible mecanismo de acción antimicrobiana del extracto omocrómico mediante su potencial acción de internalización de la membrana y la producción de especies reactivas el oxígeno (EROs).
- Medir el potencial antioxidante de los extractos de omocromos mediante técnicas de secuestro del radical DPPH, el poder reductor del hierro férrico (FRAP), el apagado de la quimioluminiscencia del luminol y la inhibición de la reacción de glicación (reacción de Maillard).
- Evaluar el efecto tóxico y antioxidante de los pigmentos omocrómicos mediante los estímulos con H₂O₂ y frente a erastina (inductor ferroptosis) como protección al estrés oxidativo en el modelo de línea celular ARPE-19, cultivo primario de retina porcina (EPR) y cultivo celular uveal melanoma (OMM-1).
- Cuantificar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-8) en un cultivo de células primarias de porcino (EPR) estimuladas con 3 agentes: lipopolisacárido (LPS), ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en presencia o no de omocromos.
- Cuantificar la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en cultivo primario de retina de porcino (EPR) y en línea celular de epitelio pigmentario humano (ARPE-19) estimuladas con extracto de omocromos.

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La presente tesis doctoral, de acuerdo con los Lineamientos Internos de Operación del Posgrado del DIPA y de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, se presenta como un compendio de tres trabajos publicados en revistas JRC. Las referencias de los artículos que constituyen el cuerpo de la tesis se presentan a continuación:

Artículo 1. Lewis, L. L. M., Rosas-Burgos, E. C., Ezquerra-Brauer, J. M., Burboa-Zazueta, G., Iloki, A. S. B., Castillo, C. T., Pentón, G., Plascencia-Jatomea, M. (2022). Inhibition of pathogenic bacteria and fungi by natural phenoxazinone from octopus's ommochrome pigments. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8): 989-1002. <https://doi.org/10.4014/jmb.2206.06043>

Artículo 2. Lewis, L. L. M., Dörschmann, P., Seeba, C., Thalenhorst, T., Roider, J., Iloki, S., Galvez J., Castillo, T., Burgos, E., Plascencia, M., Ezquerra, J., Klettner, A. (2022). Properties of cephalopod skin ommochromes to inhibit free radical, the Maillard reaction and retino-protective mechanisms in cellular models concerning oxidative stress, angiogenesis and inflammation. *Antioxidants*, 11,1574. <https://doi.org/10.3390/antiox11081574>

Artículo 3. Lewis, L. L. M., McCarty, M. F., Di Nicolantonio, J. J., Gálvez, R. J. C., Rosas-Burgos E. C., Plascencia-Jatomea, M., and Iloki, A. S. B. (2022). Nutraceuticals/Drugs Promoting Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis May Combat the Mitochondrial Dysfunction Driving Progression of Dry Age-Related Macular Degeneration. *Nutrients*, 14,1985. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14091985>

El trabajo investigativo se dividió en diferentes fases (Figura 5) con vistas a dar respuesta a la hipótesis y cumplir con los objetivos específicos para desarrollar los

artículos científicos para sus publicaciones. Las actividades de retinoprotección de los omocromos sobre distintos cultivos celulares fueron realizadas en el Departamento de Oftalmología de la Universidad de Kiel, Alemania bajo la asesoría de la Dra. Alexa Klettner donde se realizó una estancia académica.

En la primera fase experimental se trabajó en la obtención del o los compuestos de omocromos de la piel del pulpo (*O. vulgaris*) capturado en la costa de Bahía de Kino (Sonora, México; 28°49'00"N 111°56'00"W, 15-18°C) en noviembre 2018 y enero 2019. Para el aislamiento de los gránulos cromatóforos y extracción de los pigmentos de omocromos se siguió la metodología reportada por Williams et al., 2016 y Chan et al., 2019 quien ajustó las condiciones de extracción que se describirán más detalladamente. Por lo que se realizaron dos procesos de extracción utilizando (metanol/HCl y metanol/ácido acético para aislar omocromos de la piel de pulpos (*O. vulgaris*) hasta ese momento aún no estudiado en el departamento y con muy pocos reportes en la literatura consultada.

Una vez obtenido los extractos donde efectivamente la fuerza iónica del solvente (o el pH producto del tipo de ácido empleado) se pudo contactar el cambio redox que experimentan estos compuestos bajo el efecto del pH y por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o reductores como ácido ascórbico (Ostrovsky et al., 1980; Bolognese y Liberatore, 1988; Messenger, 2001; Futahashia et al., 2012; Figon y Casas, 2018; Kumar et al., 2018). Es conocido que muy pocos compuestos de omocromos se han podido caracterizar con exactitud debido a la diversidad y complejidad estructural de los mismo. Los métodos de identificación y cuantificación para estos compuestos se llevan a cabo por espectrometría de masas, ya que los métodos cromatográficos son muy limitados por la poca comercialización de estándares de omocromos (Daniels y Reed, 2012; Bonnard et al., 2021).

Se realizó una caracterización estructural para conocer cuál o cuáles son los posibles compuestos en los extractos. Para ello se procedió a realizar una caracterización química estructural mediante un barrido espectral UV-visible, una espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y una espectroscopia de resonancia

magnética nuclear (^1H -RMN). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos.

El diseño de la estructura de las actividades realizadas en cada etapa de la investigación se muestra en el siguiente diagrama de bloques (Figura 5).

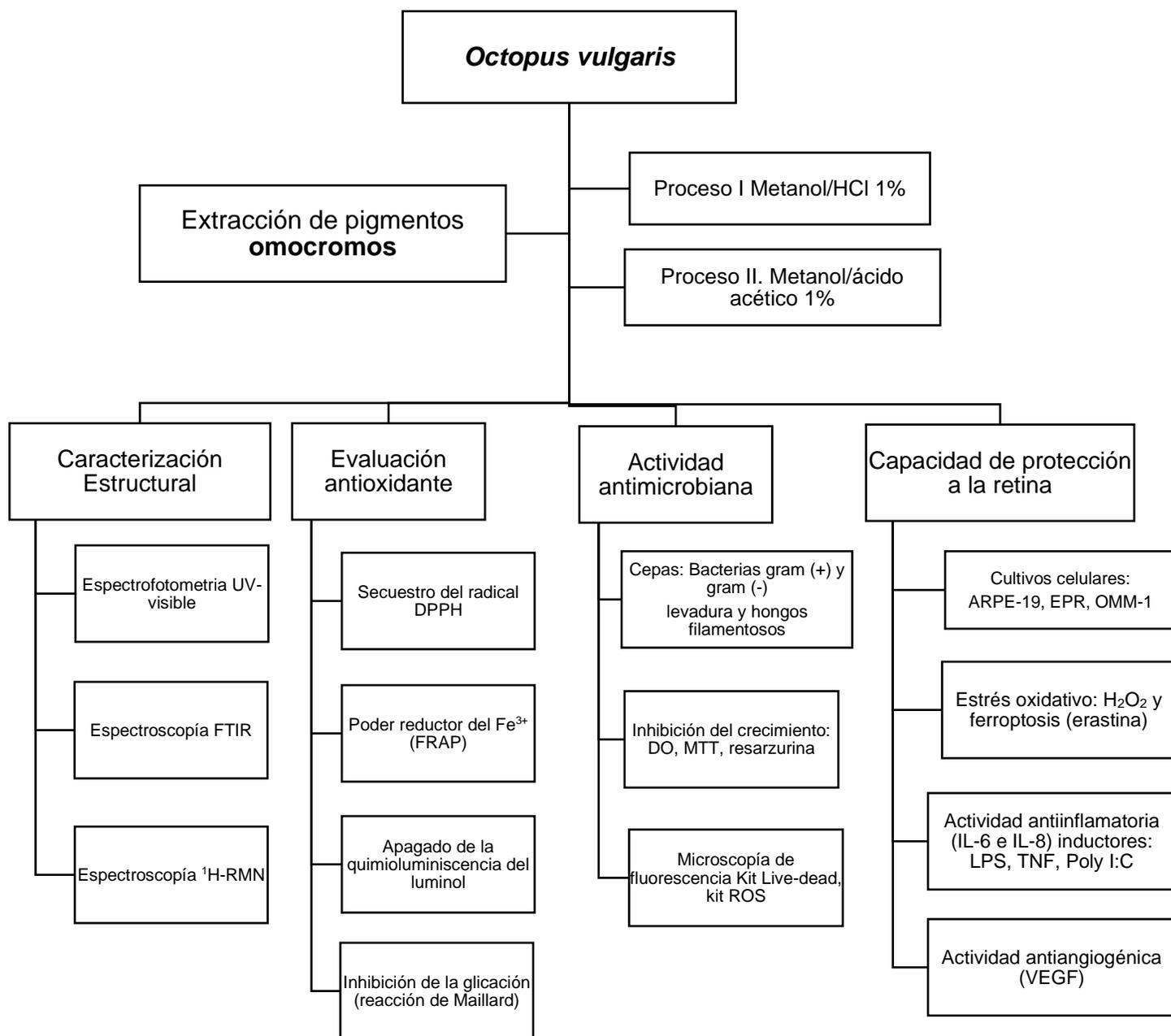


Figura 5. Actividades realizadas en las diversas etapas para evaluar la actividad biológica de omocromos extraídos de *Octopus vulgaris*

CAPÍTULO 1.

“Inhibition of pathogenic bacteria and fungi by natural phenoxazinone from octopus’s ommochrome pigments”. PUBLICADO

<https://doi.org/10.4014/jmb.2206.06043>

<i>Título</i>	Journal of Microbiology and Biotechnology
<i>Abreviatura</i>	J. Microbiol. Biotechnol.
<i>Fecha</i>	2022
<i>Área y categoría</i>	Microbiología aplicada y Biotecnología (Q2), Biotecnología (Q2), Medicina (Q2)
<i>Factor de impacto</i>	3.45
<i>SCI journal rank</i>	0.569
<i>Editora</i>	Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Inhibition of Pathogenic Bacteria and Fungi by Natural Phenoxazinone from Octopus Ommochrome Pigments

Lidianys Maria Lewis Luján¹, Ema Carina Rosas-Burgos¹, Josafat Marina Ezquerra Brauer¹, María Guadalupe Burboa-Zazueta², Simon Bernard Iloki Assanga³, Teresa del Castillo Castro⁴, Giselle Penton⁵, and Maribel Plascencia-Jatomea^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

²Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

³Department of Biological Chemical Sciences, Sonora University, Blvd. Luis Encinas y Rosales, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

⁴Department of Research on Polymers and Materials, Sonora University, Blvd. Luis Encinas y Rosales, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

⁵Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Habana, Cuba, CP 6162

Cephalopods, in particular octopus (*Octopus vulgaris*), have the ability to alter their appearance or body pattern by showing a wide range of camouflage by virtue of their chromatophores, which contain nanostructured granules of ommochrome pigments. Recently, the antioxidant and antimicrobial activities of ommochromes have become of great interest; therefore, in this study, the pH-dependent redox effect of the extraction solvent on the antioxidant potential and the structural characterization of the pigments were evaluated. Cell viability was determined by the microdilution method in broth by turbidity, MTT, resazurin, as well as fluorescence microscopy kit assays. A Live/Dead Double Staining Kit and an ROS Kit were used to elucidate the possible inhibitory mechanisms of ommochromes against bacterial and fungal strains. The results obtained revealed that the redox state alters the color changes of the ommochromes and is dependent on the pH in the extraction solvent. Natural phenoxazinone (ommochromes) is moderately toxic to the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* Typhimurium and *Candida albicans*, while the species *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, and the filamentous fungi *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria* spp. and *Fusarium verticillioides*, were tolerant to these pigments. UV/visible spectral scanning and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) suggest the presence of reduced ommatin in methanol/HCl extract with high intrinsic fluorescence.

Keywords: Ommochromes, xanthommatin, *Octopus vulgaris*, antioxidant, antimicrobial activity, fluorescence

Received: June 23, 2022
Accepted: July 18, 2022

First published online:
July 21, 2022

*Corresponding author: 
Phone: +
Fax: +
E-mail: maribel.plascencia@unison.mx

p-ISSN 1017-7825
e-ISSN 1738-8872

Copyright © 2022 by the authors.
Licensee KMB. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

Introduction

The marine environment comprises complex ecosystems, and many organisms are known to possess bioactive compounds that function to provide self-defense or protection. Today, in addition to being of economic interest, cephalopods are important biological models with pertinence to food preservation and health [1, 2]. The octopus group makes up about a third of the global cephalopod population, with around 300 species found in waters around the world [3, 4].

The octopus has the ability to dynamically alter its appearance or body pattern by quickly displaying a wide range of camouflage and coloration to blend into its environment and escape detection by predators. It does so mainly by virtue of its chromatophores, which are neuromuscular organs, innervated directly from the brain, that contain nanostructured granules of ommochrome pigments. Chromophore pigments are a class of polycyclic aromatic tryptophan metabolites comprising phenoxazine derivatives substituted with the maximum characteristic of visible ultraviolet light (UV-vis) at 360 and 480 nm. They are the main products of tryptophan's metabolic oxidation pathway and among them are kinurenine, kinurenic acid, 3-hydroxykinurenine, xanthommatin, and ommatin D. Three main families are composed of ommatin (low-molecular-weight, thermolabile and light-colored), ommidin, and ommin (high-molecular-weight, thermosensible, and related to intense colorations). The

RESUMEN:

El anillo de fenoxazinona forma la estructura central de ciertos antibióticos producidos a partir de *Streptomyces antibioticus* y del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*, además este anillo está presente en los pigmentos omocromos de los ojos de insectos y en la piel de los cefalópodos. El antibiótico cromopéptido actinomicina D se usa comúnmente en el tratamiento de una amplia gama de cánceres. Aunque se considera que la fenoxazinona contribuye a la actividad antibiótica permitiendo que estos compuestos se intercalen en los ácidos nucleicos, se han encontrado muy pocos reportes de la actividad antimicrobiana de los omocromos. Con base a lo anterior en este trabajo se evaluó la capacidad de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos frente a pigmentos omocromos aislados de la piel del pulpo (*Octopus vulgaris*).

Los cefalópodos, en particular el pulpo (*O. vulgaris*), tienen la capacidad de alterar su apariencia o patrón corporal al mostrar una amplia gama de camuflaje en virtud de sus cromatóforos, que contienen gránulos nanoestructurados de pigmentos omocromos. Recientemente, las actividades antioxidantes y antimicrobianas de los omocromos han alcanzado un gran interés; por lo tanto, en este estudio, se evaluó el efecto antimicrobiano de estos compuestos sobre patógenos de interés clínico y alimentario. La viabilidad celular se determinó mediante el método de microdilución en caldo por turbidimetría, MTT, resazurina, así como ensayos de viabilidad utilizando microscopía de fluorescencia. Se utilizó el kit de la doble tinción de células vivas/muertas y el kit para evaluar el estrés oxidativo general (ROS reactivos oxygen species), con el propósito de dilucidar los posibles mecanismos inhibitorios de los omocromos frente a cepas bacterianas y fúngicas. Los resultados obtenidos revelaron que el estado redox altera los cambios de color de los omocromos y depende del pH en el disolvente de extracción. La fenoxazinona natural (omocromos) es moderadamente tóxica para los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y

Candida albicans, mientras que las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, y los hongos filamentosos *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria spp.* y *Fusarium verticillioides*, fueron tolerantes a estos pigmentos. El escaneo espectral UV/visible y la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) sugieren la presencia de omatina reducida en el extracto de metanol/HCl con alta fluorescencia intrínseca.

CAPÍTULO 2.

“Properties of cephalopod skin ommochromes to inhibit free radical, the Maillard reaction and retino-protective mechanisms in cellular models concerning oxidative stress, angiogenesis and inflammation”. PUBLICADO

<i>Título</i>	Antioxidants
<i>Abreviatura</i>	Antioxidants
<i>Fecha</i>	2022
<i>Área y categoría</i>	Biochemistry and Molecular Biology (Q1), Food Science (Q1)
<i>Factor de impacto</i>	7.67
<i>SCI journal rank</i>	1.008
<i>Editora</i>	Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Switzerland



Article

Properties of Cephalopod Skin Ommochromes to Inhibit Free Radicals, and the Maillard Reaction and Retino-Protective Mechanisms in Cellular Models Concerning Oxidative Stress, Angiogenesis, and Inflammation

Lidianys María Lewis Luján ^{1,†}, Philipp Dörschmann ^{2,†}, Charlotte Seeba ², Tabea Thalenhorst ², Johann Roider ², Simon Bernard Iloki Assanga ³, Juan Carlos Gálvez Ruiz ³, Teresa Del Castillo Castro ⁴, Ema Carina Rosas-Burgos ¹, Maribel Plascencia-Jatomea ¹, Josafat Marina Ezquerro Brauer ¹ and Alexa Klettner ^{2,*}

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico

² Department of Ophthalmology, University of Kiel, University Medical Center, Arnold-Heller-Str. 3, Haus 25, 24105 Kiel, Germany

³ Department of Biological Chemical Sciences, Sonora University, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico

⁴ Department of Research on Polymers and Materials, Sonora University, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico

* Correspondence: alexakarina.klettner@uksh.de; Tel.: +49-431-500-24283

† These authors contributed equally to the work.



Citation: Lewis, L.L.M.; Dörschmann, P.; Seeba, C.; Thalenhorst, T.; Roider, J.; Iloki Assanga, S.B.; Ruiz, J.C.G.; Del Castillo Castro, T.; Rosas-Burgos, E.C.; Plascencia-Jatomea, M.; et al. Properties of Cephalopod Skin Ommochromes to Inhibit Free Radicals, and the Maillard Reaction and Retino-Protective Mechanisms in Cellular Models Concerning Oxidative Stress, Angiogenesis, and Inflammation. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1574. <https://doi.org/10.3390/antiox11081574>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 16 July 2022

Accepted: 4 August 2022

Published: 15 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ommochromes are pigments of invertebrates that exhibit oxidative stress protection. The aim of this study was to investigate ommochromes extracted from cephalopod's skin for their ability to inhibit age-related-macular degeneration (AMD)-related factors such as H₂O₂-induced and iron-dependent oxidative stress (ferroptosis and erastin), accumulation of advanced glycation end-products (AGEs), as well as vascular endothelial growth factor (VEGF), and inflammatory cytokines (interleukin 6 and interleukin 8) secretion. As cell systems, we used primary porcine retinal pigment epithelium (RPE), human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19 and uveal melanoma cell line OMM-1. In vitro, ommochromes produced an antiglycation effect by the inhibition of fructosylation reaction. The ommochromes showed protective effects against erastin-induced cell death in ARPE-19. In addition, in long-term stimulation (7 days) ommochromes decreased constitutively secreted VEGF, as well as interleukin 6 and interleukin 8 induced by Poly I:C in primary RPE. No relevant effects were detected in OMM-1 cells. The effects are dependent on the cell system, time of exposition, and concentration. This substance is of interest for further research concerning age-related macular degeneration.

Keywords: ommochromes; cephalopods; ferroptosis; glycative stress; retinal pigment epithelium; uveal melanoma; vascular endothelial growth factor; interleukin

1. Introduction

Ommochrome pigments are mainly present in the eyes of invertebrates (ommatidia and rhabdoms), insects and crustaceans, the cuticle of arthropods, and the skin of cephalopods, among others. Cephalopods, in particular the octopus (*Octopus vulgaris*) and squid (*Beryteuthis magister*), are considered one of the most sophisticated systems in nature, they can alter their appearance or body pattern showing a wide range of camouflage due to their chromatophores that contain nanostructured granules of ommochrome pigments. Chromophores pigments are the main products of tryptophan's metabolic oxidation pathway and among them are kynurenine, kynurenic acid, 3-hydroxykynurenine, xanthommatin, and ommatin D [1,2].

RESUMEN:

Los pigmentos omocromos están localizados en los ojos de invertebrados con función óptica y antioxidante mientras en la piel de cefalópodos son los responsables del cambio de color (camuflaje) para la protección y supervivencia en su hábitat natural. Dado a su actividad antioxidante en la protección a la visión en organismos invertebrados, resulta un tema novedoso e inexplorado la evaluación de estos compuestos en la retina humana. Dentro de las enfermedades oculares las alteraciones en la retina y la coroideas son las causas principales de ceguera en el mundo. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad multifactorial donde las principales vías patológicas incluyen al estrés oxidativo, la inflamación y, en el caso de la forma exudativa de DMAE, a la señalización proangiogénica, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los omocromos son pigmentos de invertebrados que exhiben protección contra el estrés oxidativo. El objetivo de este estudio fue investigar los omocromos extraídos de la piel de cefalópodos por su capacidad para inhibir los factores relacionados con la degeneración macular relacionada con la edad, como el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 y el dependiente del hierro (ferroptosis, erastin), la acumulación de productos finales de la glicación avanzada (AGE), así como el VEGF y la secreción de citoquinas inflamatorias (interleucina 6 e interleucina 8). Se utilizó epitelio pigmentario retiniano porcino primario (EPR), línea celular de epitelio pigmentario retiniano humano ARPE-19 y línea celular de melanoma uveal OMM-1. El estado redox altera los cambios de color y la actividad antioxidante de los omocromos y depende del pH en el disolvente de extracción. *In vitro*, los omocromos produjeron un efecto de antiglicación por inhibición de la reacción de fructosilación. Los omocromos mostraron efectos protectores contra la muerte celular inducida por erastina en ARPE-19. Además, en la estimulación a largo plazo (7 días) los omocromos disminuyeron el VEGF secretado constitutivamente, así como la interleucina 6 y la interleucina 8 inducidas por Poly I:C

en EPR primario. No se detectaron efectos relevantes en OMM-1. Los efectos dependen del sistema celular, el tiempo y la concentración. Esta sustancia es de interés para futuras investigaciones sobre la degeneración macular relacionada con la edad.

CAPÍTULO 3.

“Nutraceuticals/Drugs Promoting Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis May Combat the Mitochondrial Dysfunction Driving Progression of Dry Age-Related Macular Degeneration”. PUBLICADO

<https://doi.org/10.3390/nu14091985>

<i>Título</i>	Nutrients
<i>Abreviatura</i>	Nutrients
<i>Fecha</i>	2022
<i>Área y categoría</i>	Nutrition & Dietetics (Q1), Food Science (Q1)
<i>Factor de impacto</i>	6.70
<i>SCI journal rank</i>	1.28
<i>Editora</i>	Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Switzerland

Review

Nutraceuticals/Drugs Promoting Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis May Combat the Mitochondrial Dysfunction Driving Progression of Dry Age-Related Macular Degeneration

Lidianys María Lewis Luján ¹, Mark F. McCarty ², James J. Di Nicolantonio ³, Juan Carlos Gálvez Ruiz ⁴,
Ema Carina Rosas-Burgos ¹, Maribel Plascencia-Jatomea ¹ and Simon Bernard Ilki Assanga ^{4,*}

¹ Department of Research and Postgraduate in Food, University of Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo 83000, Mexico; lidianys1@yahoo.es (L.M.L.L.); carina.rosas@unison.mx (E.C.R.-B.); maribel.plascencia@unison.mx (M.P.-J.)

² Catalytic Longevity Foundation, San Diego, CA 92109, USA; markfmcarty@gmail.com

³ St. Luke's Mid America Heart Institute, Kansas City, MO 64111, USA; jjdinicol@gmail.com

⁴ Department of Biological Chemical Sciences, Sonora University, Blvd. Luis Encinas y Rosales, Col. Centro, Hermosillo 83000, Mexico; juan.galvez@unison.mx

* Correspondence: ilokiassanga@gmail.com; Tel.: +52-(662)-1890-895



Citation: Lewis Luján, L.M.; McCarty, M.F.; Di Nicolantonio, J.J.; Gálvez Ruiz, J.C.; Rosas-Burgos, E.C.; Plascencia-Jatomea, M.; Ilki Assanga, S.B. Nutraceuticals/Drugs Promoting Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis May Combat the Mitochondrial Dysfunction Driving Progression of Dry Age-Related Macular Degeneration. *Nutrients* **2022**, *14*, 1985. <https://doi.org/10.3390/nu14091985>

Academic Editor: Sareem Cropper

Received: 27 March 2022

Accepted: 4 May 2022

Published: 9 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In patients with age-related macular degeneration (AMD), the crucial retinal pigment epithelial (RPE) cells are characterized by mitochondria that are structurally and functionally defective. Moreover, deficient expression of the mRNA-editing enzyme Dicer is noted specifically in these cells. This Dicer deficit up-regulates expression of Alu RNA, which in turn damages mitochondria—inducing the loss of membrane potential, boosting oxidant generation, and causing mitochondrial DNA to translocate to the cytoplasmic region. The cytoplasmic mtDNA, in conjunction with induced oxidative stress, triggers a non-canonical pathway of NLRP3 inflammasome activation, leading to the production of interleukin-18 that acts in an autocrine manner to induce apoptotic death of RPE cells, thereby driving progression of dry AMD. It is proposed that measures which jointly up-regulate mitophagy and mitochondrial biogenesis (MB), by replacing damaged mitochondria with “healthy” new ones, may lessen the adverse impact of Alu RNA on RPE cells, enabling the prevention or control of dry AMD. An analysis of the molecular biology underlying mitophagy/MB and inflammasome activation suggests that nutraceuticals or drugs that can activate Sirt1, AMPK, Nrf2, and PPARα may be useful in this regard. These include ferulic acid, melatonin urolithin A and glucosamine (Sirt1), metformin and berberine (AMPK), lipoic acid and broccoli sprout extract (Nrf2), and fibrate drugs and astaxanthin (PPARα). Hence, nutraceutical regimens providing physiologically meaningful doses of several or all of the: ferulic acid, melatonin, glucosamine, berberine, lipoic acid, and astaxanthin, may have potential for control of dry AMD.

Keywords: nutraceuticals; age-related macular degeneration; mitochondrial biogenesis; Sirt1; AMPK; Nrf2; ferulic acid; melatonin; berberine; astaxanthin

1. The Complex Molecular Biology Underlying the Pathogenesis of Dry AMD

Retinal pigment epithelium, which separates the neural retina from the underlying blood vessel-rich choroid, performs a number of tasks required for healthful ocular functions: phagocytizing and degrading the distal ends of photoreceptors while regenerating 11-cis retinal; regulating the flux of molecules from the choroid to the retina; and producing trophic factors which sustain the survival of retinal neurons while preventing over-proliferation of choroid blood vessels. The progressive loss of RPE cells over time in aging humans is responsible for the most common cause of irreversible visual impairment, so-called dry age-related macular degeneration (AMD)—also known as geographic atrophy.

Recent evidence points to the formation of NLRP3-dependent inflammasomes in retinal pigment epithelium (RPE) as a key factor driving RPE cell death in dry AMD. In

RESUMEN:

En pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), las células epiteliales pigmentarias cruciales de la retina (EPR) se caracterizan por mitocondrias que son estructural y funcionalmente defectuosas. Además, la expresión deficiente de la enzima editora de ARNm Dicer se observa específicamente en estas células. Este déficit de Dicer regula al alza la expresión de ARN de Alu, lo que a su vez daña las mitocondrias, induciendo la pérdida de potencial de membrana, aumentando la generación de oxidantes y haciendo que el ADN mitocondrial se transloque a la región citoplasmática. El ADNmt citoplasmático, junto con el estrés oxidativo inducido, desencadena una vía no canónica de activación del inflamasoma NLRP3, lo que lleva a la producción de interleucina-18 que actúa de manera autocrina para inducir la muerte apoptótica de las células EPR, impulsando así la progresión de la DMAE seca. Se propone que a medida que regulan conjuntamente la mitofagia y la biogénesis mitocondrial (MB), reemplazando las mitocondrias dañadas por otras nuevas "sanas", puede disminuirse el impacto adverso del ARN Alu en las células EPR, lo que permite la prevención o el control de la DMAE seca. Un análisis de la biología molecular subyacente a la mitofagia/MB y la activación del inflamasoma sugiere que los nutraceuticos o medicamentos que pueden activar Sirt1, AMPK, Nrf2 y PPAR α pueden ser útiles en este sentido. Estos incluyen ácido ferúlico, melatonina urolitina A y glucosamina (Sirt1), metformina y berberina (AMPK), ácido lipoico y extracto de brote de brócoli (Nrf2), así como medicamentos de fibrato y astaxantina (PPAR α). Por lo tanto, los regímenes nutraceuticos que proporcionan dosis fisiológicamente significativas de varios o todos los siguientes: ácido ferúlico, melatonina, glucosamina, berberina, ácido lipoico y astaxantina, pueden tener potencial para el control de la DMAE seca.

CONCLUSIONES

- La extracción metanol acidificado permitió la obtención de pigmentos rojos en estado reducido (oxo-pirido[3,2-a]hidroxifenoxazina) usando MeOH/HCl en contraste con omocromos amarillos oxidado (oxo-pirido[3,2-a]fenoxazinona) en MeOH/ácido acético. Evidenciando que el estado redox altera los cambios de color de los omocromos y depende del pH en el disolvente de extracción.
- Los modos vibratorios de los espectros FTIR y ¹H-NMR sugieren la presencia de compuestos similares a la xantomatina unido a otros compuestos omocromáticos lo que demanda de técnicas de caracterización por espectrometría de masas para dilucidar las estructuras exactas en la mezcla de pigmentos.
- El máximo potencial antioxidante (DPPH y FRAP) se obtuvo en omocromos reducidos aislados con metanol/HCl. Además, se encontró que los omocromos tienen actividad antioxidante mediante el secuestro de la quimioluminiscencia del luminol comparable con el Trolox (1 g/L de omocromo exhibió igual efecto inhibitorio que 0.26 mM de Trolox).
- Los pigmentos de omocromos provocaron un efecto tóxico moderado al inhibir el crecimiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and *Candida albicans*, sin embargo, las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, así como los hongos filamentosos: *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria spp.* Y *Fusarium verticillioides*, mostraron resistencia frente a estos compuestos. Los mecanismos de muerte celular mediante los ensayos de doble tinción vivas/muertas y la generación de ROS por microscopía de fluorescencia pueden tener interferencia dado a la fluorescencia intrínseca de los omocromos.
- En los modelos celulares de retina humano y porcino asociado a la DMAE los omocromos presentaron efecto protector antioxidante contra la muerte celular inducida por ferroptosis en el cultivo de ARPE-19, pero no se detectó protección

al efecto citotóxico por H₂O₂. Sin embargo, *in vitro*, estos compuestos inhibieron la reacción de fructosilación con efecto antiglicativo relacionado a su capacidad antioxidante. En contraste, en células de melanoma de úvea (OMM-1) aumentó la muerte celular después del estrés oxidativo en presencia del pigmento.

- Es la primera vez que se reporta actividad antiinflamatoria y anti-angiogénica por los omocromos de *Octopus vulgaris*. En este sentido estos pigmentos disminuyeron la secreción de citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8 inducidas con el agente Poly I:C en un cultivo primario de EPR. Además, para este mismo cultivo celular los omocromos disminuyeron la secreción del factor angiogénico VEGF bajo un estímulo a largo plazo (7d). Por lo que resulta interesante dilucidar sus posibles mecanismos de acción para lograr estos efectos inhibitorios.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Dado a los interesantes hallazgos de las actividades retinoprotectoras de los pigmentos de omocromos es de alta prioridad identificar por técnicas estructurales robustas (HPLC/MS o espectrometría de masas MS) cuál(es) son los principales metabolitos presentes en la mezcla de pigmentos. Para ello hay la posibilidad de una colaboración con la Universidad de Boston, USA.
- Profundizar en los posibles mecanismos moleculares relacionados con los diferentes tipos de receptores toll (TLR 3 y TLR 4) para esclarecer la ruta de inhibición de los compuestos omocromos frente a distintas señales de activación por diferentes agentes inflamatorios (LPS, TNF y poly I:C).
- Es necesario realizar más investigaciones para descifrar la interacción de los omocromos con las células de EPR en relación con su efecto antiangiogénico

dado que, por el tiempo de respuesta de estos compuestos, la inhibición no es estérica como los antagonistas tradicionales de VEGF.

- Dado que el estrés oxidativo, la inflamación y la angiogénesis son factores patogénicos muy importantes en la DMAE, estos hallazgos sugieren a los omocromos con un potencial interesante para futuras investigaciones y posibles desarrollos de nuevas terapias. Se necesita más investigación para comprender la naturaleza química de los omocromos, así como de la interacción entre los omocromos y las células EPR.

REFERENCIAS

1. Aubourg S. P., Torres-Arreola W., Trigo M., Ezquerra-Brauer J. M. (2016). Partial characterization of jumbo squid skin pigment extract and its antioxidant potential in a marine oil system. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 118.
2. Bhutto, I., Luty, G. (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med*, 33, (4), 295-317.
3. Bolognese, A., Correale, G., Manfra, M., Lavecchia, A., Mazzone, O., Novellino, E., Barone, V., Pani, A., Tramontano, E., La Colla, P., Chiara Murgioni, Ilaria Serra, Giovanna Setzu, Roberta Loddò. (2002). Antitumor Agents. 1. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of 5H-Pyrido[3,2-a] phenoxazin-5-one, a Compound with Potent Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.*, 45, 5205-5216.
4. Bonnard, M., Boury, B., Parrot, I. (2021). Xanthurenic Acid in the Shell Purple Patterns of *Crassostrea gigas*: First Evidence of an Ommochrome Metabolite in a Mollusk Shell. *Molecules*, 26, 7263. <https://doi.org/10.3390/molecules26237263>.
5. Bourne, R. R. A., Jonas, J. B., Bron, A. M., Cicinelli, M. V., Das, A., Flaxman, S. R., Friedman, D. S., Keeffe, J. E., Kempner, J. H., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Peto, T., Saadine, J., Silvestri, A. J., Tahhan, N., Taylor, H. R., Varma, R., Wong, T. Y., Resnikoff, S. (2018). Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: magnitude, temporal trends and projections. *Br J Ophthalmol*, 102, (5), 575-585.
6. Chan-Higuera, J.E., Santacruz-Ortega, H. C., Carbonell-Barrachina, Á. A., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R. M., Cruz-Ramírez, S. G., Ezquerra-Brauer, J. M (2019b). Xanthommatin is Behind the Antioxidant Activity of the Skin of *Dosidicus gigas*. *Molecules* 24:3420.
7. Chan-Higuera, J. E; Carbonell-Barrachina, A. C; Cárdenas-López J. L.; Kačániová, M., Burgos-Hernández, A.; Ezquerra-Brauer, J. M. (2019a). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin pigments: chemical analysis and evaluation of antimicrobial and antimutagenic potential. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 9 (2) 349-353. doi: 10.15414/jmbfs.2019.9.2.349-353.
8. Chatterjee, A., Norton-Baker, B., Bagge, L. E.; Patel, P., Gorodetsky, A. A. (2018). An introduction to color-changing systems from the cephalopod protein reflectin. *Bioinspir. Biomim.* 13, 045001.
9. Cohen, S. Y., Creuzot-Garcher, C., Darmon, J., Desmettre, T., Korobelnik, J. F., Levrat, F., Quentel, G.; Paliès, S., Sanchez, A., de Gendre, A. S., Schlupe, H., Weber, M., Delcourt, C. (2007). Types of

- choroidal neovascularisation in newly diagnosed exudative age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 91, (9), 1173-6.
10. Daniels, E. V., Reed, R. D. (2012). Xanthurenic acid is a pigment in *Junonia coenia* butterfly wings. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 161-163.
 11. Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., Handa, J. T. (2017) The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*, 60, 201-218.
 12. Domínguez-Contreras, J. F., Munguia-Vega, A., Ceballos-Vázquez, B. P., Arellano-Martínez, M., García-Rodríguez, F. J., Culver, M., Reyes-Bonilla, H. (2018). Life histories predict genetic diversity and population structure within three species of octopus targeted by small-scale fisheries in Northwest Mexico, *PeerJ* 6:e4295; DOI 10.7717/peerj.4295.
 13. Dontsov, A. E., Ushakova, N. A., Sadykovac, V. S., Bastrakov, A. I. (2020). Ommochromes from *Hermetia illucens*: Isolation and Study of Antioxidant Characteristics and Antimicrobial Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 56, No. 1, pp. 91–95 doi: 10.1134/S0003683820010044.
 14. Dontsov, A., Koromysova, A., Ostrovsky, M., Sakina, N. (2016). Lipofuscins prepared by modification of photoreceptor cells via glycation or lipid peroxidation show the similar phototoxicity. *World J Exp Med*, 6, (4), 63-71.
 15. Dontsov, A. E., Sakina, N. L., and Ostrovsky, M. A. (1980). A comparative study of lipid peroxidation in the pigment epithelium of the eye of pigmented and albino animals, *Biokhimiya*, vol. 45, no. 5, pp. 923–928.
 16. Esparza-Espinoza, D. M., Plascencia-Jatomea, M., López-Saiz, C. M., Parra-Vergara, N. V., Cárdenas-López, J. L., Carbonell-Barrachina, Á. A., Ezquerra-Brauer, J. M (2022). Improving the shelf life of chicken burgers using *Octopus vulgaris* and *Dosidicus gigas* skin pigment extracts. *Food Sci Technol* (Campinas) 42:e18221.
 17. Esparza-Espinoza, D. M., Santacruz-Ortega, H. C., Chan-Higuera, J. E., Cárdenas-López, J. L., Burgos-Hernández, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., Ezquerra-Brauer, J. M. (2021). Chemical structure and antioxidant activity of cephalopod skin ommochrome pigment extracts. *Food Sci Technol* (Campinas) 42:e56520.
 18. Ezquerra-Brauer, J. M., Miranda, J. M., Cepeda, A., Barros-Velazquez, J., Aubourg, S. P. (2016). Effect of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract on the microbial activity in chilled mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT - Food Science and Technology* 72, 2016 134e140.
 19. EZQUERRA-BRAUER, J. M., MIRANDA, J.M., CHAN-HIGUERA, J.E., BARROS-VELÁZQUEZ, J., AUBOURG, S.P. (2016). New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(10), 30412-3419. <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8192>

20. Ezquerra-Brauer, J. M, Aubourg, S. P. (2019). Recent trends for the employment of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by-products as a source of bioactive compounds with nutritional, functional and preservative applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, doi:10.1111/ijfs.14067.
21. Farmer, L. A., Haidasz, E. A., Griesser, M. & Pratt, D. A. (2017). Phenoxazine: a privileged scaffold for radical-trapping antioxidants. *The Journal of Organic Chemistry* 82, 10523–10536.
22. Ferrara, N., Bunting, S. (1996). Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5, (1), 35-44.
23. Figon, F. y Casas, J. (2018). Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. *Biol. Rev.* pp. 000–000. doi: 10.1111/brv.12441.
24. Figon, F., Munsch, T., Croix, C., Viaud-Massuard, M. C., Lanoue, A., & Casas, J. (2020). *Uncyclized xanthommatin is a key ommochrome intermediate in invertebrate coloration. Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103403. doi:10.1016/j.ibmb.2020.103403.
25. Futahashia, R., Kurita, R., Manoc, H., and Fukatsua, T. (2012). Redox alters yellow dragonflies into red. *PNAS*, 109 (31) 12626-12631; <https://doi.org/10.1073/pnas.1207114109>.
26. Gao, S. et al. (2002). A novel phenoxazine derivative suppresses IgM expression in DT40 B cell line. *Br. J. Pharmacol.* 137, 749–755.
27. Green, W. R. (1999). Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 5, 27.
28. Hayashi, K. et al. (2008). Phenoxazine derivatives inactivate human cytomegalovirus, herpes simplex virus-1, and herpes simplex virus-2 in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 369–375.
29. Heesterbeek, T. J., Lorés-Motta, L., Hoyng, C. B., Lechanteur, Y. T. E., den Hollander, A. I. (2020). Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt*, 40, (2), 140-170.
30. Hendrich, A. B. et al. (2006). A study on the perturbation of model lipid membranes by phenoxazines. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5948–5954
31. Jereb, P., Roper, C. F.E., Norman, M. D., Julian, K Finn. (2014). *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 3. Rome, FAO. 370 p.*
32. Kaarniranta, K., Pawlowska, E., Szczepanska, J., Jablkowska, A., Blasiak, J. (2020). Role of Mitochondrial DNA Damage in ROS-Mediated Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Int J Mol Sci*, 20, (10).
33. Kannan, R., Zhang, N, Sreekumar, P. G., Spee, C. K., Rodriguez, A., Barron, E., Hinton, D. R. (2006). Stimulation of apical and basolateral

- VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*, 12, 1649-59.
34. Kauppinen, A., Paterno, J. J., Blasiak, J., Salminen, A., Kaarniranta, K. (2016). Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci*, 73, (9), 1765-86.
 35. King, A., Gottlieb, E., Brooks, D. G., Murphy, M. P., Dunaief, J. L. (2004). Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*, 79, (5), 470-5.
 36. Klettner, A., Koinzer, S., Meyer, T., Roider, J. (2013). Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmol*, 91, (3), e211-8.
 37. Klettner, A., Roider, J. (2009). Constitutive and oxidative-stress-induced expression of VEGF in the RPE are differently regulated by different Mitogen-activated protein kinases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247, (11), 1487-92.
 38. Klettner, A., Roider, J. (2021). Retinal Pigment Epithelium Expressed Toll-like Receptors and Their Potential Role in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci*, 22, (16).
 39. Klettner, A., Brinkmann, A., Winkelmann, K., Käckenmeister, T., Hildebrandt, J., Roider, J. (2021). Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells. *Exp Eye Res*, 200, 108214.
 40. Knobbe, C. A., Stojanoska, M. (2017). The 'Displacing Foods of Modern Commerce' Are the Primary and Proximate Cause of Age-Related Macular Degeneration: A Unifying Singular Hypothesis. *Med Hypotheses*, 109, 184-198.
 41. Kumar, A., Williams, T. L., Martin, C. A., Figueroa-Navedo, A. M., Deravi L. F. (2018). Xanthommatin-Based Electrochromic Displays Inspired by Nature. *ACS Applied Materials & Interface*, DOI: 10.1021/acsami.8b14123.
 42. Lange, C. A., Bainbridge, J. W. (2012). Oxygen sensing in retinal health and disease. *Ophthalmologica*, 227, (3), 115-31.
 43. Le Roes-Hill M., Goodwin, C. and Burton, S. (2009). Phenoxazinone synthase: what's in a name? *Trends in Biotechnology*, 27, 4. 248- 258. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.01.001.
 44. Lima, F. D., Berbel-Filho, W. M., Leite, T. S., Rosas, C., Lima, S.M.Q. (2017). Occurrence of *Octopus insularis* Leite and Haimovici, 2008 in the Tropical Northwestern Atlantic and implications of species misidentification to octopus fisheries management. *Mar Biodiv* DOI 10.1007/s12526-017-0638-y.
 45. Lin, T., Walker, G. B., Kurji, K., Fang, E., Law, G., Prasad, S. S., Kojic, L., Cao, S., White, V., Cui, J. Z., Matsubara, J. A. (2013). Parainflammation associated with advanced glycation endproduct

- stimulation of RPE in vitro: implications for age-related degenerative diseases of the eye. *Cytokine*, 62, (3), 369-81.
46. Marneros, A. G., Fan, J., Yokoyama, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N., Crouch, R. K., Olsen, B. R. (2005). Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol*, 167, (5), 1451-9.
 47. Miller, J. W., Le Couter, J., Strauss, E. C., Ferrara, N. (2013). Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology*, 120, (1), 106-14.
 48. Ostrovsky, M. A. y Dontsov, A. E. (2019). Vertebrate Eye Melanosomes and Invertebrate Eye Ommochromes as Antioxidant Cell Organelles: Part 2. *Biology Bulletin*, Vol. 46, No. 1, pp. 105–116. DOI: 10.1134/S1062359019010084.
 49. Ostrovsky, M. A., Zak, P. P., Dontsov A. E. (2018). Vertebrate Eye Melanosomes and Invertebrate Eye Ommochromes as Screening Cell Organelles. *Biology Bulletin*, Vol. 45, No. 6, pp. 570–579. DOI: 10.1134/S1062359018060109
 50. Ostrovsky, M. A., Zak, P. P., Dontsov A. E. (2018). Vertebrate Eye Melanosomes and Invertebrate Eye Ommochromes as Screening Cell Organelles. *Biology Bulletin*, Vol. 45, No. 6, pp. 570–579. DOI: 10.1134/S1062359018060109
 51. Ostrovsky, M. A. (1966). Reversible changes in EPR signals of eye pigment epithelium under exposure to visible light, in *Svobodnoradikal'nye protsessy v biologicheskikh sistemakh* (Free-Radical Processes in Biological Systems), Tr. Mosk. O-va Ispyt. Prir., Moscow: Nauka.
 52. Ostrovsky, M. A., Sakina, N. L., Dontsov, A. E. (1980). The antioxidant function of screening pigments of the eye, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, vol. 255, no. 3, pp. 749–751.
 53. Riou, M. y Christidès, J. P. (2010). Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 412–423.
 54. Romero, Y. y Martínez, A. (2015). Antiradical capacity of ommochromes. *J Mol Model* 21:220 DOI 10.1007/s00894-015-2773-3.
 55. SAGARPA. CONAPESCA. (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.
 56. Shah, R., Margison, K. & Pratt, D. A. (2017). The potency of diarylamine radical-trapping antioxidants as inhibitors of ferroptosis underscores the role of autoxidation in the mechanism of cell death. *ACS Chemical Biology* 12, 2538–2545.
 57. Shimizu, S., Suzuki, M., Tomoda, A., Arai, S., Taguchi, H., Hanawa, T., Kamiya, S. (2004). Phenoxazine compounds produced by the reactions

- with bovine hemoglobin show antimicrobial activity against non-tuberculosis mycobacteria. *Tohoku J. Exp. Med.*, 203, 47-52
58. Ursini, F., Maiorino, M. (2020). Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*, 152, 175-185.
59. Ushakova, N., Dontsov, A., Natalia Sakina, N., Alexander Bastrakov, A., Ostrovsky M. (2019). Antioxidative Properties of Melanins and Ommochromes from Black Soldier Fly *Hermetia illucens*. *Biomolecules*, 9, 408; doi:10.3390/biom9090408.
60. Watkins, W. M., McCollum, G. W., Savage, S. R., Capozzi, M. E., Penn, J. S., Morrison, D. G. (2013). Hypoxia-induced expression of VEGF splice variants and protein in four retinal cell types. *Exp Eye Res*, 116, 240-6.
61. Williams, T. L., Stephen, L., Senft; Jingjie Yeo, Francisco J, Martín-Martínez Alan M. Kuzirian, Camille A. Martin Christopher, W. DiBona, Chun-The, C.; Sean R. D., Hieu T. Nguyen; Conor M. Gomes; Joshua J.C. Rosenthal; Matthew D. MacManes; Feixia Chu; Markus J. Buehler; Roger T. Hanlon & Leila F. Deravi. (2019). Dynamic pigmentary and structural coloration within cephalopod chromatophore organs. *Nature Communications*, 10:1004 doi.org/10.1038/s41467-019-08891-x
62. Williams, T. L., DiBona, C. W., Dinneen, S. R., Jones Labadie, S. F., Chu, F. & Deravi, L. F. (2016). Contributions of phenoxazone-based pigments to the structure and function of nanostructured granules in squid chromatophores. *Langmuir*, 32, 3754–3759.
63. Zhao, T., Guo, X., Sun, Y. (2021). Iron Accumulation and Lipid Peroxidation in the Aging Retina: Implication of Ferroptosis in Age-Related Macular Degeneration. *Aging Dis*, 12, (2), 529-551.