

Valutazione *in vitro* dell'attività antiossidante di un prodotto cosmetico (Test Anti-Age)

In vitro evaluation of antioxidant activity of a cosmetic product (Anti-Age Test)

Materia Medica Processing S.r.l.

Estratto canapa sativa 50% cbd

Protocollo n° / *Report no.* **1903A31V**

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI, Alice BUZZELLA	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Eliana REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test <i>in vitro</i> Bio Basic Europe e Responsabile della Relazione <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 5
Sperimentatore Bio Basic Lab <i>Bio Basic Lab Experimenter</i> Dr.ssa Alice BUZZELLA Laurea in Biologia Sperimentale ed Applicata (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 6
	Risultati <i>Results</i> pag. 9
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 13
	Bibliografia <i>References</i> pag. 14

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.



RIASSUNTO

L'attività antiossidante del prodotto testato è stata valutata misurando la sua capacità di prevenire la formazione di radicali liberi (ROS) in colture cellulari di cheratinociti umani. A tale scopo i cheratinociti sono stati trattati overnight (18-22 ore) con concentrazioni scalari del prodotto (diluizioni 1:2 a partire da 1.0 mg/ml) e quindi esposti a raggi UVA a temperatura ambiente per stimolare la produzione di ROS. Cellule non trattate rappresentano il controllo negativo. Come controllo positivo è stata utilizzata una sostanza con nota attività antiossidante (C+). Parallelamente è stato condotto un saggio NRU prima e dopo irraggiamento allo scopo di verificare che nelle condizioni sperimentali la vitalità cellulare non diminuisca significativamente.

I risultati del test NRU prima dell'esposizione agli UV hanno dimostrato la presenza di inibizione della vitalità cellulare alle concentrazioni testate comprese tra 1.0 e 0.25 mg/ml. Quindi per il dosaggio dei ROS sono state prese in considerazione le concentrazioni comprese tra 0.125 e 0.0156 mg/ml.

I risultati ottenuti dal dosaggio dei ROS hanno dimostrato l'azione antiossidante (riduzione % dei ROS) del prodotto a tutte le concentrazioni testate per tutti i tempi di esposizione agli UV.

ABSTRACT

The antioxidant activity of the tested product has been assessed by measuring its ability to prevent the formation of free radicals (ROS) in cell cultures of human keratinocytes. The keratinocytes were treated overnight (18-22 hours) with scalar concentrations of tested product (dilutions 1:2 from 1.0 mg/ml), and then exposed to UVA at room temperature in order to stimulate the production of ROS. Untreated cells represent the negative control. As positive control we used a substance with well known antioxidant activity (C+). We also performed an NRU assay before and after UV irradiation in order to verify that in the experimental conditions cell viability does not decrease significantly.

Results of the NRU assay before UV irradiation have shown the presence of inhibition of cell viability at tested concentrations between 1.0 and 0.25 mg/ml. So the ROS dosage was performed on concentrations between 0.125 and 0.0126 mg/ml.

Results obtained from the dosage of ROS have shown the antioxidant action (reduction % of ROS) of the product at all tested concentrations for all times of UV exposure.



INTRODUZIONE

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono specie chimiche altamente reattive contenenti ossigeno. I mitocondri sono i maggiori produttori di ROS a livello cellulare. I ROS comprendono principalmente l'anione superossido ($\bullet\text{O}_2$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale idrossilico ($\bullet\text{OH}$). In un contesto biologico, i ROS si formano come sottoprodotto del normale metabolismo dell'ossigeno e svolgono un importante ruolo nella comunicazione e nell'omeostasi cellulare. Tuttavia stress ambientali (come l'esposizione ai raggi UV o al calore) possono determinare un drastico aumento dei livelli di ROS e ciò può causare un significativo danno cellulare. Questa situazione è nota come stress ossidativo. L'anione superossido è la prima specie radicalica che si forma nei mitocondri, ma la sua determinazione nelle cellule vive può essere pesantemente influenzata dai livelli di espressione della superossido dismutasi, un enzima con attività di scavenger antiossidante altamente espressa nei mitocondri. I ricercatori che studiano i ROS prodotti dai mitocondri generalmente preferiscono misurare i livelli di perossido di idrogeno. Una buona ragione di questa preferenza è che esistono numerosi metodi che ne permettono la determinazione. Inoltre il perossido di idrogeno viene costantemente prodotto ed è altamente stabile, quindi la sua determinazione nelle cellule metabolicamente attive risulta relativamente semplice. Il metodo più largamente utilizzato per misurare la produzione cellulare di perossido di idrogeno utilizza la diclorofluoresceina diacetato (DCFDA), una sonda fluorescente in grado di fornire determinazioni sicure ed affidabili della produzione di H_2O_2 nelle cellule. La DCFDA è un composto apolare, quindi quando viene a contatto con le cellule attraversa la membrana e, una volta all'interno delle cellule, viene idrolizzata dalle esterasi a dicloro-diidro-fluoresceina diacetato (DCFH) non fluorescente. In presenza di ROS, la DCFH viene ossidata a diclorofluoresceina (DCF) altamente fluorescente.

La produzione di ROS è strettamente correlata con i processi di invecchiamento cutaneo: l'accumulo di ROS prodotti dal normale metabolismo – ed il danno cellulare che ne deriva – è responsabile dell'invecchiamento intrinseco. Al contrario l'invecchiamento estrinseco è dovuto ai radicali liberi che si formano a causa degli stimoli ambientali, tra cui l'esposizione al sole. Questi radicali provocano un danno alla pelle causando una reazione infiammatoria. Inoltre i ROS possono stimolare l'attività di numerosi enzimi, dalla tirosinasi (principale responsabile della sintesi di melanina) all'elastasi (un enzima proteolitico coinvolto nella degradazione dell'elastina). Il risultato è la comparsa di macchie scure (principalmente sul viso e sulle mani poiché sono le aree maggiormente esposte alla luce) e la perdita di elasticità cutanea. In particolare tra tutti i fattori ambientali l'esposizione al sole (radiazioni ultraviolette) è una delle principali cause di invecchiamento, in particolar modo di invecchiamento precoce, a cui contribuisce fino all'80%. Per tutti questi motivi se un prodotto testato è in grado di ridurre la produzione di ROS *in vitro*, esso è anche un buon candidato "anti-age" potenzialmente in grado di contrastare e ritardare il processo di invecchiamento cutaneo.



INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are chemically reactive species containing oxygen. Mitochondria are major generators of ROS in cells and tissues. ROS include, predominantly, the superoxide anion ($\bullet\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$). In a biological context, ROS are formed as a natural by-product of the normal metabolism of oxygen and have important roles in cell signaling and homeostasis. However, due to environmental stress (e.g., UV or heat exposure), ROS levels can increase dramatically. This may result in significant damage to cell structures. Cumulatively, this is known as oxidative stress. Superoxide is the first radical species produced by mitochondria, but its detection in live cells can be heavily affected by the expression level of superoxide dismutase, which is a highly regulated antioxidant scavenger present in mitochondria. Researchers generally prefer measurements of hydrogen peroxide when studying mitochondrial ROS in live cells. One good reason for this preference is that there is an increasing variety of probes that can detect cellular hydrogen peroxide. Moreover, hydrogen peroxide is constantly produced and, owing to its high stability, maintained at detectable steady-state levels within metabolically active cells. The most widely used probe for measuring cellular production of hydrogen peroxide is the fluorogenic probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), which can provide robust and reliable measurements of mitochondrial production of hydrogen peroxide in cells. When applied to intact cells, the nonionic, nonpolar DCFDA crosses cell membranes and is hydrolyzed enzymatically by intracellular esterases to nonfluorescent dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH). In the presence of ROS, DCFH is oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF).

ROS production is strictly correlated with the process of skin aging: the accumulation of ROS produced by normal metabolism - and the consequent cellular damage - is responsible for the intrinsic aging. On the other hand, extrinsic aging is caused by harmful free radicals created by environmental factors, including sun exposure. These radicals induce damage to the skin by causing an inflammatory reaction. Moreover, ROS also exacerbate enzyme activity from tyrosinase (main responsible for the melanin synthesis) and elastase (a proteolytic enzyme involved in the degradation of elastin). The result is the appearance of dark spot (mainly on the face and hands that are mostly exposed to sunlight) and the loss of skin elasticity. In particular sun exposure (ultraviolet) is known as a major cause of aging: among all the environmental factors, UV radiation contributes up to 80%. It is the most important factor in skin aging, especially in premature aging.

*Owing to these reasons, if a tested product is able to reduce ROS production *in vitro*, it is also a good anti-age candidate, potentially able to counteract and delay the process of skin aging.*



SCOPO

Lo scopo del test è quello di valutare se il prodotto testato, a differenti concentrazioni, possiede attività antiossidante *in vitro*. Per questo motivo è stata testata la sua efficacia nel prevenire la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), principali responsabili dell'invecchiamento della pelle. Si ritiene che tale capacità renda il prodotto un potenziale candidato anti-age *in vivo*, in grado di contrastare e ritardare il processo di invecchiamento cutaneo.

AIM

The aim of the test is to assess whether the tested product, at different concentrations, has antioxidant activity in vitro. For this reason we tested its efficacy in preventing the formation of reactive oxygen species (ROS), main responsible of skin aging. It is believed that this ability makes the product a potential antiaging candidate in vivo, able to counteract and delay the process of skin aging.



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su cheratinociti umani (Huker) coltivati in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di antibiotici (penicillina e streptomina) ed incubati in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was performed on human keratinocytes (Huker) cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Condizioni di irraggiamento

Allo scopo di simulare una condizione di stress ambientale capace di indurre la formazione di ROS, le cellule sono state sottoposte ad irraggiamento con raggi UVA. La lampada utilizzata negli esperimenti è un simulatore di luce solare che riproduce lo spettro solare con un range di emissione costante negli UVA compreso tra 315 e 400 nm e con una irradianza di 1.7 mW/cm². L'emissione di UVB viene schermata in maniera appropriata per evitare danni citotossici diretti alle colture cellulari. Sono stati valutati gli effetti sulla produzione dei ROS a diversi tempi di irraggiamento: 4, 8, 12, 16 e 20 minuti.

Irradiation conditions

In order to simulate an environmental stress condition able to induce the production of ROS, cells were irradiated with UVA rays. The lamp used in the experiments is a solar light simulator. A constant emission in the UVA range (315-400 nm) with an irradiance of 1.7 mW/cm² is assured. The UVB emission is screened in order to avoid direct cell mortality. We evaluated the effect on ROS production after 4, 8, 12, 16 and 20 minutes of irradiation.



Campione testato / *Tested sample*

Estratto canapa sativa 50% cbd

Preparazione del campione e della DCFDA

Il campione in esame è stato sciolto e quindi diluito in terreno di crescita fino alle concentrazioni finali desiderate comprese tra 0.0156 e 1.0 mg/ml (diluizioni 1:2). Il controllo negativo è rappresentato da cellule non trattate, mentre come controllo positivo (C+) è stata utilizzata una sostanza dalle note azioni antiossidanti.

La 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) è stata sciolta in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione di 50 mM e quindi diluita nell'apposito tampone fino alla concentrazione di utilizzo di 250 µM.

Sample and DCFDA preparation

The tested sample was dissolved and then diluted in culture medium to the desired final concentrations between 0.0156 and 1.0 mg/ml (1:2 dilutions). The negative control is represented by untreated cells, while as positive control (C+) we used a well known antioxidant.

The 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the concentration of 50 mM and then diluted in the appropriate buffer at the final concentration of 250 µM.



Dosaggio dei ROS

Un adeguato numero di cellule è stato seminato in piastre da 96 pozzetti. Una volta raggiunto un monostrato semiconfluente le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni del campione testato e con il controllo positivo ed incubate per 24 ore a condizioni standard. Il giorno successivo le cellule sono state lavate con tampone fosfato (PBS) e quindi incubate con la soluzione di DCFDA per 20 minuti in condizioni di coltura standard. La DCFDA è stata quindi rimossa, le cellule sono state lavate 2 volte in PBS e quindi irraggiate con UVA per 4, 8, 12, 16 e 20 minuti. Al termine di ogni periodo di irraggiamento è stata eseguita una lettura al fluorimetro alla lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm.

Valutazione della vitalità cellulare

Allo scopo di valutare che la vitalità cellulare non vari significativamente in presenza del prodotto testato e nelle condizioni sperimentali applicate, è stato eseguito il saggio di captazione del rosso neutro (NRU) prima e dopo irraggiamento delle cellule. Il rosso neutro (NR) è una sonda debolmente cationica che passa attraverso la membrana cellulare per diffusione passiva non ionica e si concentra nei lisosomi, dove si lega mediante interazioni elettrostatiche ai siti anionici della matrice. La captazione di NR dipende dalla capacità delle cellule di creare gradienti di pH, determinato a sua volta dalla produzione di ATP. NR si accumula quindi solo nelle cellule vive, da cui viene estratto con una soluzione acida di etanolo: l'assorbanza della soluzione, misurata allo spettrofotometro, è proporzionale alla vitalità cellulare.

Dopo aver delicatamente rimosso il mezzo, le cellule sono state trattate con neutral red medium (50 µg/ml) e incubate per 3 ore a condizioni standard. Le cellule sono state successivamente lavate con PBS per eliminare i residui di colorante e il NR è stato estratto. Le piastre sono state agitate delicatamente per almeno 10 minuti (per favorire la dissoluzione di NR) ed è stata quindi determinata l'assorbanza (densità ottica, OD) mediante lettura spettrofotometrica a 540 nm.



ROS assay

An appropriate number of cells was seeded in 96-well plates. Once reached a semi-confluent monolayer, the cells were treated with different concentrations of the tested sample and the positive control, and incubated for 24 hours at standard culture conditions. The following day the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and then incubated with the DCFDA solution for 20 minutes under standard culture conditions. The DCFDA was then removed, the cells were washed twice in PBS and then irradiated with UVA for 4, 8, 12, 16 and 20 minutes. At the end of each period of irradiation the fluorescence was read with a fluorimeter at a wavelength of 485 nm excitation and 530 nm emission.

Evaluation of cell viability

In order to verify that cell viability does not vary significantly in the presence of the tested product and under the experimental conditions, we performed a neutral red uptake assay (NRU) before and after irradiation of the cells. Neutral red (NR) is a weakly cationic dye that penetrates cell membrane by non-ionic passive diffusion and concentrates in the lysosomes, where it binds by electrostatic hydrophobic bonds to anionic sites of the lysosomal matrix. The uptake of NR depends on the cell's capacity to maintain pH gradients, through the production of ATP. Therefore NR accumulates only in alive cells, from which is extracted using an acidified ethanol solution: the absorbance of the solubilized dye is quantified using a spectrophotometer and is directly proportional to cell viability.

After having carefully removed the culture medium from each well, the cells were treated with neutral red medium (50 µg/ml) and incubated for 3 hours at standard culture conditions. Thereafter the plates were washed with PBS to eliminate dye wastes, and NR was extracted from live cells with an acidified ethanol solution. The plates were placed on a shaker for at least 10 minutes in order to dissolve the dye and the absorbance (optical density, OD) was determined spectrophotometrically at 540 nm wavelength.

RISULTATI

RESULTS

Valutazione della vitalità cellulare

Cell viability evaluation

UV-	C+	Campione / Sample (mg/ml)						
		1,0	0,50	0,250	0,1250	0,0625	0,0313	0,0156
	92,2	13,5	45,3	56,0	92,1	99,0	96,9	92,1

UV+	C+	Campione / Sample (mg/ml)						
		1,0	0,50	0,250	0,1250	0,0625	0,0313	0,0156
	146,0	26,9	69,1	115,4	112,3	115,7	111,0	117,2

L'assorbanza misurata a 540 nm è proporzionale alla vitalità cellulare. Le percentuali sono state calcolate in base ai valori di assorbanza a 540 nm e considerando come 100% l'assorbanza del controllo negativo (cellule non trattate)

The absorbance measured at 540 nm is proportional to cell viability. Percentages were calculated based on the absorbance values at 540 nm and taking as 100% the absorbance of the negative control (untreated cells)

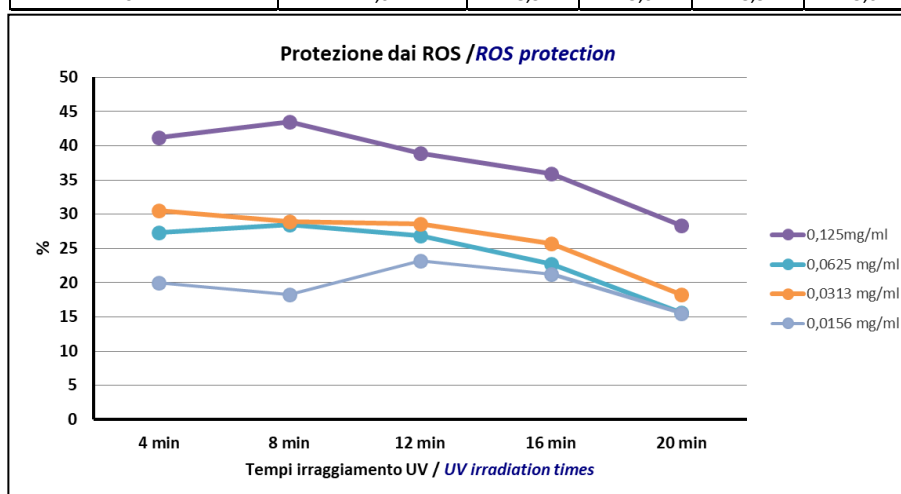
In assenza di irraggiamento (UV-) la vitalità cellulare dei cheratinociti trattati con il prodotto risulta paragonabile a quella dei cheratinociti non trattati per le concentrazioni testate comprese tra 0.125 e 0.0156 mg/ml, di conseguenza solo tali concentrazioni sono state prese in considerazione nel dosaggio dei ROS.

In the absence of irradiation (UV-) cell viability of keratinocytes treated with the product is comparable to that of untreated keratinocytes for tested concentrations between 0.125 and 0.0156 mg/ml. Therefore only these concentrations were taken into account in the dosage of ROS.

Valutazione dell'attività antiossidante

Antioxidant activity evaluation

Riduzione % ROS / ROS % Reduction					
Tempi irraggiamento UV <i>UV irradiation times</i>	C+ Controllo interno <i>Internal control</i>	Campione / Sample (mg/ml)			
		0,125	0,0625	0,0313	0,0156
4 min	43,9	41,1	27,4	30,6	20,0
8 min	51,5	43,5	28,5	28,9	18,3
12 min	48,2	38,9	26,8	28,6	23,2
16 min	32,8	36,0	22,8	25,7	21,3
20 min	12,0	28,3	15,6	18,3	15,6



La fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di ROS prodotti dalle cellule. Le percentuali sono state calcolate in base ai valori di fluorescenza misurati e rappresentano la riduzione percentuale dei ROS rispetto al controllo negativo (cellule non trattate)

The fluorescence is directly proportional to the quantity of ROS produced by the cells. Percentages were calculated based on the measured fluorescence values and represent the percentage of reduction of ROS compared to the negative control (untreated cells)

Il campione mostra attività anti-ossidante (riduzione % di ROS) a tutte le concentrazioni testate e per tutti i tempi di esposizione agli UV.

The sample shows antioxidant activity (% reduction of ROS) at all tested concentrations and for all times of minutes UV exposure.



CONCLUSIONI

Il campione denominato
Estratto canapa sativa 50% cbd

possiede attività antiossidante *in vitro*

Il prodotto testato riduce la percentuale di ROS in colture di cheratinociti umani sottoposti a stress ossidativo. Il campione mostra attività antiossidante alle concentrazioni testate comprese tra 0.125 e 0.0156 mg/ml per tutti i tempi di esposizione agli UV.

CONCLUSIONS

The sample called
Estratto canapa sativa 50% cbd

has antioxidant activity in vitro

The tested product reduces the ROS percentage in cell cultures of human keratinocytes exposed to oxidative stress. The sample shows antioxidant activity at tested concentrations between 0.125 and 0.0156 mg/ml for all times of UV exposure



BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

Barry M, Heibein JA, Pinkowski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3781–3794

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1982; 130(4): 1910–1917

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 1984; 105: 429–435

Budd S, Castilho RF, Nicholls DG. Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 1997; 415: 21–24

Castilho RF, Ward MW, Nicholls DG. Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1999; 72: 1394–1401

Degli Esposti M, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J Biol Chem* 1999; 274: 29831–29837

Degli Esposti M, McLennan H. Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 1998; 430: 338–342

Degli Esposti M. Assessing functional integrity of mitochondria in vitro and in vivo. *Methods Cell Biol* 2001; 65: 75–96

Devasagayam T, Tilak JC, Bloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S, Lele RD. "Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects". *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)* 2004; 52: 796

Garcia –Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997; 272: 11369–11377

Hayyan M, Hashim MA, Al Nashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev.* 2016; 116 (5), pp 3029–3085. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407

LeBel CP, Ishiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 227–23

Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 502–508

Schulze-Osheroff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *J Biol Chem* 1992; 267: 5317–5323

Sosa Torres ME, Saucedo-Vázquez JP, Kroneck PM. "Chapter 1, Section 3 The dark side of dioxygen". In Kroneck PM, Torres ME. *Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases. Metal Ions in Life Sciences* 2015; 15: 1–12. doi:10.1007/978-3-319-12415-5_1

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; 17: 3–8

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182: 367–377