

UCH - FC
Biotecnología
C. 186
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

EVALUACIÓN DEL NUEVO QUELANTE DE HIERRO 5-AMINOETIL-8-HIDROXIQUINOLINA EN MODELOS CELULAR Y ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular



Joaquín Damián Campos Muñoz

Director del Seminario: Dr. Marco Tulio Núñez González

Enero, 2017

Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

Joaquín Damián Joacaz Campos Muñoz.

EVALUACIÓN DEL NUEVO QUELANTE DE HIERRO 5-AMINOETIL-8-HIDROXIQUINOLINA EN MODELOS CELULAR Y ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Marco Tulio Núñez González
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Marco Tulio Núñez González, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Alejandro Roth Metcalfe
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Alejandro Roth Metcalfe, sobre una línea horizontal.

Bruce Cassels Niven
Evaluator

Firma manuscrita en azul de Bruce Cassels Niven, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

No puedo dejar de mencionar en estas líneas a aquellas personas con las que compartí durante mi pregrado y en la realización de este seminario. Primero a aquellos compañeros *biotecs* con los que vivimos muchos más momentos de distensión que de tensión y estoicamente seguimos adelante en este camino dulce y agraz. *Conyru, Sebita, Ramita, Natisi, Nopi, Dany y Engelina*, entre los que faltan por parir, mis mejores deseos y apoyo inmaterial para ustedes. Luego, como no agradecer al *Laboratorio del Hierro y el envejecimiento celular* que valerosamente me aceptó en sus mesones. Al *Profesor Marco Tulio* por su confianza, comprensión y voluntad de enseñar. A *Vicky* por su buena onda y disposición, a *Yorka* por sus consejos. Sobre todo, a *Pabla* por su paciencia infinita y delicadeza pedagoga para enseñar y resistirse brahmánicamente a mis momentos más volátiles. Por supuesto como no destacar el ánimo y disposición infaltable de *Carlitos*. También a Charles, a quién agradezco su solidaridad, buena onda y apoyo, además de incluirme en el gran *EPA,j* con quienes vivimos momentos gloriosos. Finalmente, y quizás los más importantes, mi familia. A mis *padres* por su influencia intelectual y apoyo incondicional. A mis hermanos por darme infinidad de momentos felices, a mis abuelos simplemente por su amor. Tampoco puedo dejar de agradecer a mi *amor romántico* por su paciencia y comprensión. Para terminar, agradezco a algunos *personajes* por darme inspiración: a los kazajos *triple G* y a la señorita *Elbakyan*. A *Tonegawa* y a *Togashi*, a *Weiland* y a *Whitman*, a *Borges* y a *Alexis*, a *Lynch* y a muchos otros que no caben acá.

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE MATERIAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes bibliográficos.....	1
1.1.1 La enfermedad de Parkinson.....	1
1.1.2 Química biológica del hierro.....	6
1.1.3 Terapia por quelación de Fe.....	9
1.2 Hipótesis.....	12
1.3 Objetivo General.....	12
1.4 Objetivos Específicos.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 Materiales.....	14
2.1.1 Reactivos generales.....	14
2.1.2 Cultivo Celular.....	14
2.1.3 Animales.....	15
2.1.4 Sondas Fluorescentes.....	15
2.1.5 Anticuerpos.....	15
2.1.6 5-aminoetil-8-hidroxiquinolina.....	16
2.1.7 Equipos.....	16
2.2 Métodos.....	17
2.2.1 Cultivo Celular.....	17
2.2.2 Determinación de la capacidad quelante.....	17

2.2.3 Viabilidad celular.....	19
2.2.4 Determinación de la capacidad quelante citosólica o mitocondrial.....	19
2.2.5 Protocolo de protección contra daño oxidativo	20
2.2.6 Cultivo primario de mesencéfalo de rata	20
2.2.7 Protocolo de daño y regeneración del árbol neurítico	21
2.2.8 Protocolo de protección y regeneración contra la intoxicación con MPTP.....	21
2.2.9 Inmunocitoquímica	23
2.2.10 Obtención y análisis de datos de inmunocitoquímica.....	23
2.2.11 Inmunohistoquímica	24
2.2.12 Obtención y análisis de datos de histoquímica	25
2.2.13 Análisis estadísticos.....	25
3. RESULTADOS.....	26
3.1 Determinación de la capacidad quelante de Fe ²⁺	26
3.1.1 Competencia con calceína	26
3.1.2 Inhibición de la producción del radical hidroxilo.....	27
3.2 Determinación de la capacidad quelante citoplasmática o mitocondrial.....	29
3.2.1 Permeabilidad celular y capacidad quelante de hierro citoplasmático.	29
3.2.2 Permeabilidad y capacidad quelante mitocondrial.	31
3.3 Citotoxicidad y cito-protección contra el daño oxidativo	33
3.3.1 Citotoxicidad de Q11	33
3.3.2 Citoprotección del daño inducido por rotenona.....	33
3.3.3 Regeneración del árbol neurítico en cultivo primario de mesencéfalo.....	36
3.4 Toxicidad y neuroprotección in vivo.....	38
3.4.1 Toxicidad y protección de neuronas TH-positivas en la SNc.....	38
3.4.2 Protección de las fibras TH-positivas en el estriado.....	39
3.4.3 Protección contra la formación de aductos de 4-HNE.....	41
4. DISCUSIÓN	43
4.1 Resultados	43
4.1.1 Capacidad quelante, permeabilidad y localización subcelular de la actividad quelante.....	43

4.1.2 Toxicidad, neuroprotección y neuroregeneración in vitro	45
4.1.3 Toxicidad, neuroprotección y neuroregeneración in vivo	48
4.2 Relevancia	50
RESUMEN Y CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neuropatología de la EP.....	3
Figura 2. Protocolo de daño y recuperación del árbol neurítico de neuronas TH-positivas en cultivo primario de mesencéfalo de rata.....	21
Figura 3. Protocolo de protección contra la intoxicación aguda con MPTP.....	22
Figura 4. Q11 compite con calceína por Fe ⁺²	27
Figura 5. Q11 inhibe la producción del radical hidroxilo.....	29
Figura 6. Q11 posee capacidad quelante del hierro citoplasmático.....	30
Figura 7. Q11 no posee capacidad quelante mitocondrial.....	32
Figura 8. Q11 no rescata la viabilidad de células tratadas con rotenona.....	34
Figura 9. Q11 protege contra la formación de 8-OHdG.....	35
Figura 10. Q11 recupera el árbol neurítico de células TH positivas tratadas con MPP+.....	37
Figura 11. Q11 protege la SNc de ratones tratados con MPTP.....	39
Figura 12. Q11 protege las fibras TH-positivas en el estriado.....	40
Figura 13. Q11 previene la formación de aductos de 4-HNE en la SNc tras la intoxicación con MPTP.....	42

ABREVIATURAS

BDNF.....	factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	albúmina de suero bovino
CAT	catalasa
CPM	cultivo primario de mesencéfalo
DA	dopamina
DAB.....	diaminobencidina
DFO	desferoxamina
DFP	deferiprona
DIV	día in vitro
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMT1	transportador de metales divalentes 1
EP	enfermedad de Parkinson
FBS	suero fetal bovino
GDNF	factor neurotrófico derivado de glías
GPX	glutación peroxidasa
GSH	glutación
HIF	factor inducible por hipoxia
4-HNE	4-hidroxinonanal
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
HBSS	solución salina balanceada de Hanks

iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
ICQ	inmunocitoquímica
IHQ	inmunohistoquímica
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
LIP	pool de hierro lábil/redox activo
MAO-B	mono-amino-oxidasa B
MEM	medio mínimo esencial
MPP+	1-metil-4-fenil piridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MRI	imagen por resonancia magnética
MTT	bromuro de dimetiltiazol-difenil-tetrazolio
NMR	resonancia magnética nuclear
OH-1	hemo-oxigenasa 1
6-OHDA	6-hidroxidopamina
PBS	solución tampón salino de fosfato
RPA	rodamina fenantrolina aminocarbonil bencil éster
ROS	especies reactivas del oxígeno
SH-SY5Y	línea celular de neuroblastoma humano
SNc	substantia nigra pars compacta
SOD	superóxido dismutasa
TH	tirosina hidroxilasa

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en la población mundial. Actualmente los tratamientos disponibles son de carácter sintomático y tienen una efectividad limitada en el tiempo. Diversas características de la enfermedad han sido identificadas durante años de investigación, tanto a nivel genético, celular e histológico. De particular interés para este seminario fue el descubrimiento hace algunos años de acumulación excesiva de hierro (Fe) en la substantia nigra pars compacta, área en el mesencéfalo que degenera en la EP. Importantemente este incremento de Fe también se ha observado en modelos animales de la enfermedad. Dado que el exceso de Fe celular es un factor pro-neurodegenerativo, su control utilizando quelantes de Fe permeables a la barrera hematoencefálica pueden disminuir su disponibilidad para reaccionar de manera perjudicial, protegiendo las células del daño oxidativo. En este seminario evaluamos el nuevo quelante de hierro 5-aminoetil-8-hidroxiquinolina (Q11) en términos de su actividad neuroprotectora. Caracterizamos su capacidad para quelar Fe in vitro, y su capacidad para atravesar la membrana celular y quelar Fe en el espacio citoplasmático. Además, establecimos su capacidad para proteger y recuperar del daño oxidativo inducido por la inhibición del complejo I mitocondrial en dos modelos celulares. Por último, mostramos que la administración del compuesto es capaz de otorgar protección a las neuronas dopaminérgicas en la SNc y a las fibras dopaminérgicas en el estriado en el modelo de EP de ratón intoxicado con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Los

resultados obtenidos sugieren que Q11 es un posible candidato como agente terapéutico para la EP, y validan el rol del hierro como intermediario en el proceso de muerte celular en los modelos experimentales de EP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder in the world. Nowadays, available treatments are only symptomatic and have a time-limited effectiveness. Different genetic, cellular and histological disease features have been identified through years of research. Of particular concern for this work was the finding of excessive iron accumulation in the substantia nigra pars compacta, an area in the midbrain that degenerates in PD. This increase in iron was also observed in animal models of the disease. Since high cellular iron is a pro-neurodegenerative factor, its decrease by the use of iron chelators permeant to the blood-brain barrier could decrease its availability to react harmfully, thus protecting cells from oxidative damage. In this Seminar, we evaluated the neuroprotective activity of a new iron chelator 5-(2-aminoethyl)-quinolin-8-ol (Q11) in cell and animal models of PD. We characterized its iron chelation capacity in vitro, its cellular permeability and its cytoplasmic iron chelation activity. Also, we evaluated in two cellular models of PD its capacity to protect and recover tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells from complex I inhibition-induced oxidative damage. Finally, we showed that in the MPTP-intoxicated mouse model Q11 treatment resulted in the maintenance of TH-positive neurons in the substantia nigra pars compacta and of dopaminergic neuron innervations to the striatum. These results point to Q11 as a possible therapeutic agent for the treatment of PD, and corroborate the role of iron as an intermediary in the cellular death process in experimental models of PD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes bibliográficos

1.1.1 La enfermedad de Parkinson

Por primera vez descrita en 1817 por James Parkinson con el agudo examen de tan solo 6 pacientes (Kempster y col., 2007), la enfermedad de Parkinson (EP) representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población mundial después de la enfermedad de Alzheimer. Es una enfermedad progresiva y se estima que afecta entre 1-2% de la población mundial menor a 65 años, aumentando a un 4-5% a los 85 años (Nussbaum y Ellis; Farrer, 2006). Su elevada incidencia y características sintomáticas generan un considerable costo en términos de salud pública estimado en los 25 mil millones de dólares sólo en los Estados Unidos. Más aún dada la tendencia al envejecimiento de la población en los países desarrollados, se proyecta que en ellos la frecuencia de la enfermedad se duplique en las próximas dos décadas (Calabrese, 2007).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son en primer término motoras, de ahí que James Parkinson se refiriera a ella como la “parálisis temblante”, y se resumen en temblor en reposo, rigidez corporal, inestabilidad postural, bradiquinesia (lentitud en la realización de movimientos), hipoquinesia (reducción en la amplitud de los movimientos) y aquinesia (ausencia de movimientos espontáneos normales) principalmente. Además, pueden presentarse anormalidades emocionales y cognitivas siendo comunes la depresión y la demencia sobre todo en pacientes de edad avanzada

(Dauer y Przedborsky 2003). En cuanto a los síntomas motores, puede responsabilizarse de ellos la generación de un déficit de dopamina (DA) en el cuerpo estriado. De hecho, cualquier enfermedad o lesión que afecte esta zona los reproduce, llamándose a estas afecciones síndromes parkinsonianos (Mena y Yébenes, 2006).

Sin embargo, la característica esencial de la EP, y que conduce al déficit de DA en el estriado, es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Parent y Parent, 2010) (Figura 1A). Además, como característica histopatológica se presentan inclusiones proteicas citoplasmáticas llamadas Cuerpos de Lewy (Figura 1C). Los somas de las neuronas nigroestriatales se ubican en la substantia nigra pars compacta (SNc), en el mesencéfalo posterior e inervan principalmente el putamen y el núcleo caudado en el cuerpo estriado (François y col., 1999) (Figuras 1A y 1B).

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan cuando el contenido de DA ha disminuido en un 80% en esta zona y cerca de un 60% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se han perdido (German y col., 1989; Ma y cols., 2002; Greffard y col., 2006). Importantemente, se plantea que la enfermedad afecta primero los terminales de las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado antes que la pérdida del soma neuronal en la SNc se manifieste completamente. Pruebas derivadas tanto del análisis de tejido humano post-mortem como del trabajo con modelos animales, plantean esta visión del fenómeno neurodegenerativo con características de “degeneración retrógrada” (del inglés “dying back” o “retrograde axonal degeneration”) (Bernheimer y col., 1973; Wu y col., 2003; Burke y O’Malley, 2013).

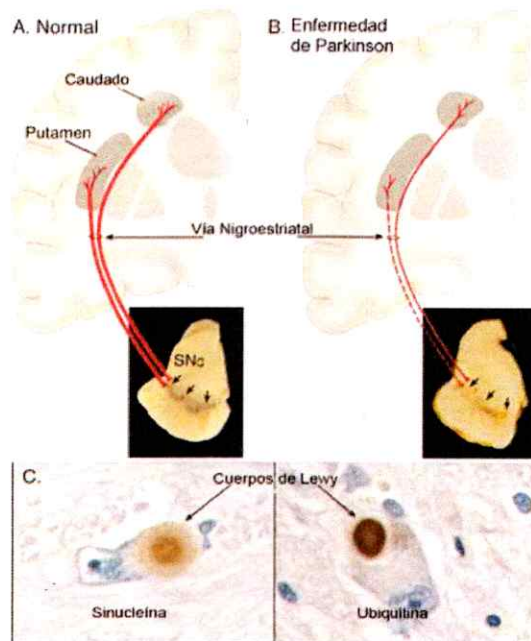


Figura 1. Neuropatología de la EP. A) Esquema representativo de la vía nigroestriatal de un sujeto normal. Las neuronas dopaminérgicas de la SNc inervan el cuerpo estriado, compuesto por los núcleos putamen y caudado, a través de la vía nigroestriatal. B) Esquema representativo de la vía nigroestriatal de un paciente de EP. La degeneración de las neuronas de la SNc lleva a la pérdida de la vía y conduce a un déficit de dopamina en el estriado que da origen a los síntomas motores de la enfermedad. C) Inclusiones proteicas formadas principalmente por las proteínas sinucleína y ubiquitina (Tomado de Dauer y Przedborsky, 2003).

En cuanto a la etiología de la enfermedad se distinguen dos formas de esta. La primera es denominada EP familiar o hereditaria, en la que el paciente posee un historial médico familiar asociado a la enfermedad y en consecuencia se atribuye el origen del proceso neurodegenerativo a mutaciones puntuales en diversas proteínas que posiblemente ejercerán un efecto neurotóxico, ya sea por la generación de proteínas mutantes con tendencia a agregarse (Bussell y Eliezer, 2001), pérdidas o ganancias de función en proteínas de las vías degradativas, o pérdidas y ganancias de función en proteínas relacionadas con la función mitocondrial (Muñoz y col. 2016). En particular 6 genes se

han identificado como directos causantes de EP familiar: SNCA (α -sinucleína), LRRK2, PARK2 (parkina), PINK1, DJ-1, y ATP13A. A estos se suma una serie de al menos 10 genes posibles candidatos cuya directa relación causal con la EP no está confirmada, además de otros 12 genes de los cuales ciertas mutaciones constituyen factores de riesgo (Klen y Wastenberger, 2012). El descubrimiento de estos genes ha llevado a la generación de algunos modelos animales genéticos para estudiar la enfermedad, utilizando mutantes en organismos tales como moscas, ratones y, recientemente, monos (Hernández-Vargas y col., 2011; Gispert y col., 2015; Niu y col., 2015).

Por otro lado, se distingue la enfermedad en su forma denominada esporádica, en la que el paciente no presenta antecedentes familiares y no es posible atribuir el proceso neurodegenerativo a una mutación en particular. En términos generales esta última forma de la enfermedad es la más frecuente y da cuenta de un 90-95% de los casos de EP, y contrasta con la anterior en manifestarse por lo general de forma más tardía (Papapetropoulos y col., 2007).

Durante el siglo XX fue dominante la hipótesis de la “toxina ambiental”, que entiende la neurodegeneración de la EP esporádica como consecuencia de la exposición a una toxina dopaminérgica, la cual, dada una exposición crónica durante la vida o una exposición limitada inicial, gatilla una cascada de eventos deletéreos auto-perpetuantes que finalmente llevarán a la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Dauer y Przedborsky, 2003). Esto fue respaldado por los casos de parkinsonismo post-encefálico, y notablemente por el descubrimiento de la toxina MPTP que produjo un síndrome parkinsoniano casi idéntico a la enfermedad en un grupo de jóvenes que la

consumió como contaminante en un lote de preparación casera de MPPP, un análogo del opiáceo meperidina en los años 1976 y 1982 (Langston, 1983). Desde entonces la intoxicación de ratones y monos con MPTP se convirtió en uno de los modelos más utilizados y contribuyentes al estudio de la EP.

También otras toxinas han sido utilizadas para generar modelos de EP, rotenona, por ejemplo, en directa relación con la “hipótesis de la toxina ambiental” puesto que se utilizó como plaguicida en variados tipos de cultivos (Trojanowsky, 2003). Otros ejemplos son la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) y el aminocromo como “endotoxinas”, ya que corresponden a metabolitos de la propia DA (Grauman y col., 2002; Hökfelt y col., 1973).

A pesar de distinguir dos tipos de la enfermedad y las diferentes hipótesis y correlaciones que se han propuesto como agentes causantes (enfermedad priónica, autoinmune, viral, entre otras), el extenso estudio de muestras humanas y el trabajo con modelos animales han identificado fenómenos celulares característicos del proceso neurodegenerativo que se presentan en ambas formas de la enfermedad y que se debaten como posibles mecanismos claves en su patogénesis, relacionados además con otras enfermedades neurodegenerativas. Estos fenómenos característicos se resumen en: la disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma y la agregación de proteínas (McNaught y Olanow, 2006; Um y col., 2010), la disfunción mitocondrial (Bose y Beal, 2016), la inflamación (Chen y col., 2008; Ransohoff, 2016), el estrés oxidativo (Gille y col., 2004; Xie y Chen, 2016) y la dishomeostasis intracelular de Fe (Dexter y col., 1988; Hare y col., 2007). Posiblemente varios de estos fenómenos están relacionados en una dinámica

de causa-efecto. Por ejemplo, la disfunción mitocondrial puede generar estrés y daño oxidativo, el que puede inducir o facilitar la agregación de proteínas y la saturación del sistema ubiquitina-proteasoma. Dentro de este contexto asociativo se inserta la hipótesis de la “neurodegeneración inducida por metales” (metal-based neurodegeneration hypothesis) (Crichton y col., 2011). De acuerdo con esta hipótesis, los metales redox-activos como el Fe y el cobre generan ROS que provocan la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana, lo que lleva a su vez a la formación de aldehídos reactivos, que reaccionan con las proteínas y facilitan la producción de agregados de proteínas mal plegadas que superan el sistema de degradación ubiquitina-proteasoma y se acumulan como cuerpos de inclusión.

1.1.2 Química biológica del hierro.

El Fe es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, un metal de transición de número atómico 26. Posee un estado máximo de oxidación +6, pero solo los estados +2 y +3 son frecuentes en los ambientes biológicos. Es prácticamente esencial en la mayoría de los organismos producto de su capacidad y papel evolutivo de intercambiar electrones en una amplia gama de reacciones biológicas (Kell, 2009). Para este propósito los átomos de Fe establecen complejos de coordinación con gran diversidad de ligandos en los ambientes celulares dando origen a una multiplicidad de complejos con diferentes potenciales de reducción que permiten un fino control del proceso a catalizar (Núñez y col., 2012). En general se pueden distinguir tres grupos de proteínas que utilizan Fe para sus funciones. Las proteínas que contienen grupos hemo (Fe unido a un anillo de porfirina mediante cuatro átomos de nitrógeno), dentro de los cuales se distinguen por su

función las transportadoras de oxígeno (hemoglobina, mioglobina), las activadoras de oxígeno molecular (catalasas, peroxidases y citocromos p450) que oxidan compuestos utilizando H_2O o hidroxilan compuestos utilizando O_2 , y componentes de la cadena transportadora de electrones los (citocromos a, b y c) que aceptan electrones de moléculas donadoras y los transfieren a sus correspondientes aceptores. También existen proteínas que integran Fe en forma de “racimos” Fe-S” (del inglés iron-sulfur clusters) de los cuales se distinguen las composiciones 2Fe-2S y 4Fe-4S, que en general participan en reacciones de transferencia de un electrón (ej. ferridoxinas) pero que también están presentes en dehidratasas y enzimas dependientes de S-adenosilmetionina, además de algunos sensores de Fe como las mismas “Iron Regulatory Proteins” (IRPs). A estas se suman proteínas que poseen Fe pero en ninguna de las conformaciones antes mencionadas y que se dividen en aquellas que poseen Fe mononuclear y las que poseen Fe dinuclear. Ambas en general catalizan la hidroxilación de variados sustratos utilizando oxígeno molecular (ej. enzimas dependientes de α -oxoglutarato, hidroxilasas del factor inducido por hipoxia (HIF) (Hider y Kong, 2013).

Sin embargo, a pesar de lo esencial que resulta el Fe por su ubicua participación en la maquinaria celular, dada su propiedad de intercambiar electrones, puede convertirse en un agente perjudicial para la célula. Esto debido a su capacidad intrínseca de formar ROS (Graf y col., 1984). En el ambiente celular el Fe^{+2} puede reaccionar con O_2 para generar el radical superóxido, el cual catalizado por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), es convertido en H_2O_2 . Fe^{+2} también puede reaccionar con H_2O_2 para generar el altamente reactivo radical hidroxilo (OH^*) en la llamada reacción de Fenton:

$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\cdot + \text{OH}^\cdot$, la que puede perpetuarse dado su ΔG negativo y a la regeneración del Fe^{+2} por el poder reductor celular en forma de ascorbato y glutatión (GSH) (Núñez y col., 2012). El radical hidroxilo generado ejerce multiplicidad de daños celulares debido a su alta reactividad, atacando lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, incluso pudiendo, dado el daño generado, gatillar la muerte celular (Uhl y col., 2015; Davies, 2005).

Notablemente, y en concordancia con lo anterior, se encontró un incremento en los niveles de Fe específicamente en la SNc de tejidos post mortem de pacientes con EP respecto de sujetos control de la misma edad (Dexter y cols., 1989; Hirsch y col., 1991). Posteriormente se mostró por NMR de pacientes vivos de EP la existencia de acumulación de Fe en la SNc (Gorell y col., 1995:), así como también en modelos animales de la enfermedad (Berg y col., 1999; He y col., 2002). Complementariamente estudios de MRI han establecido una relación entre el grado de acumulación de Fe con el grado de severidad de la enfermedad (Shuff y col., 2009) También se ha encontrado un aumento en la expresión del transportador de entrada de Fe celular DMT1 (del inglés Divalent Metal Transporter 1) en la SNc de pacientes con EP y en el modelo de ratón intoxicado con MPTP (Salazar y col., 2008). Notablemente ratones mutantes con baja expresión de este transportador evidenciaron ser más resistentes a la neurodegeneración causada por la toxina, apuntando a un rol de la acumulación de Fe en la muerte neuronal (Salazar y col., 2008).

Además del hecho de que la acumulación de Fe posiblemente contribuya a la muerte neuronal catalizando la formación de ROS, evidencias han mostrado también la

presencia de Fe y otros metales en los agregados proteicos de diferentes enfermedades neurodegenerativas incluida la EP (Li y col., 2011; Bisaglia y col., 2009), dando lugar a especulaciones sobre un posible rol catalizador del Fe en la formación de los agregados, o por otro lado, a un rol protector del agregado en secuestrar el Fe (Ostrerova y col., 2000; Castellani y col., 2000).

Otros estudios han indicado que un exceso de Fe podría dar lugar a un fenómeno denominado “metalación errónea” (del inglés missmetallation) que consiste en la colocación de átomos de Fe en proteínas que requieren metales similares, como por ejemplo Zn. Esto conduciría a la generación de proteínas defectuosas perjudicando la homeostasis celular (Dixon y Stockwell, 2014).

Considerando esta evidencia, la idea de ejercer un control sobre la acumulación de Fe en la enfermedad surgió como posible alternativa terapéutica, siendo la más plausible la utilización de quelantes de Fe (Ward y col., 2015).

1.1.3 Terapia por quelación de Fe

Los quelantes de Fe son moléculas con la capacidad de formar complejos de coordinación con los átomos de Fe, capturándolos del medio y evitando su disponibilidad y reactividad con otras moléculas. Estos agentes quelantes pueden ser ligandos bidentados, tridentados y hexadentados, si poseen 2, 3, ó 6 átomos respectivamente disponibles para coordinar con Fe dando origen a un complejo octaédrico (Hider y col., 2011). En cuanto a su origen estos pueden ser sideróforos

aislados de bacterias litotróficas, fitoquímicos, o derivados sintéticos (Hatcher y col., 2009).

En la práctica clínica la utilización de estos compuestos se ha enfocado históricamente en las enfermedades que implican sobrecarga de Fe sistémico y que conducen al daño de diversos órganos, especialmente hígado, corazón y bazo. Estos trastornos pueden tener su origen en una absorción incrementada de Fe de origen genético como por ejemplo en la hemocromatosis, o en enfermedades que requieren frecuentes transfusiones de sangre como la β -talasemia o el síndrome mielodisplásico (Poggiali y col., 2012). Los quelantes deferoxamina (DFO) de administración sub-cutánea, deferiprona (DFP) y deferasirox de administración oral son comúnmente utilizados y su introducción en los años 70 representó un notable cambio en la expectativa de vida de los pacientes tratados con transfusiones crónicas de sangre (Borgna-Pignatti y col., 2004). Además, recientemente han atraído la atención como posible tratamiento contra el cáncer bajo la lógica de privar a las células tumorales de Fe para detener su crecimiento e incluso inducir su muerte (Buss y col., 2003). Esto sucede en el contexto de que variados tumores presentan acumulación de Fe, y existen correlaciones epidemiológicas que indican que personas con bajo Fe (donadores de sangre habituales) tienen un menor riesgo de desarrollar cáncer, y viceversa, personas con altos niveles de Fe (pacientes de hemocromatosis) tienen un riesgo mayor (Bedford y col., 2013).

En modelos de EP las primeras pruebas de protección por quelación de Fe resultaron de la administración intracraneal de DFO a ratas intoxicadas con 6-OHDA, las que mostraron una menor disminución de DA en el estriado y un mejor desempeño en

pruebas motoras (Ben-Shachar y col., 1991). Recientemente fue evaluada la administración intranasal de DFO en el modelo de EP genético de ratas mutantes para α -sinucleína. DFO mostró disminuir el contenido de Fe y las inclusiones proteicas en estos animales, sin embargo, no protegió de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc. Vinculando al Fe en la patogénesis de la EP, no solo como productor de ROS sino como agente involucrado en la agregación de proteínas (Febbraro y col., 2013).

M30 es otro quelante recientemente evaluado en modelos de EP y otras enfermedades neurodegenerativas. Demostró tener la ventaja por sobre DFO de ser oralmente activo y proteger las neuronas dopaminérgicas del daño inducido por MPTP, a pesar de tener una menor afinidad por Fe, al ser este un quelante bidentado (Gal y col., 2010). Más aún, M30 fue capaz de regenerar el árbol neurítico de neuronas dopaminérgicas tanto in vivo, como in vitro (Aguirre y col., 2015). A pesar de que los autores destacan propiedades anexas de M30 en sus efectos neuroprotectores, tales como su habilidad de inhibir la enzima mono-amino-oxidasa-B (MAO-B), capturar directamente radicales libres, e inducir vías de señalización de sobrevivencia (Kupersmidt y col., 2011), otros quelantes propiamente tales han demostrado su efectividad neuroprotectora en modelos de EP. Particularmente importante es el caso de DFP, quelante capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer neuroprotección en los modelos de MPTP y 6-OHDA (Dexter y col., 2011). Además, este quelante fue probado en un reciente ensayo clínico y resultó tener un efecto positivo en pacientes en cuanto a disminución en la cantidad de Fe cerebral medido por MRI, y una mejora motora en la “Escala de Puntaje Unificada de la Enfermedad de Parkinson” (Devos y col., 2014).

En resumen, los quelantes de Fe parecen ser prometedores como posible futura alternativa terapéutica en la EP. Aquellas propiedades óptimas en cuanto a permeabilidad, afinidad por Fe, localización y toxicidad deberán ser evaluadas y comparadas para establecer la opción que represente mayores beneficios, teniendo en cuenta además que ejercer una depleción exagerada del metal puede resultar igualmente perjudicial.

1.2 Hipótesis

El nuevo compuesto Q11, derivado de la estructura 8-hidroxiquinolina, puede ejercer neuroprotección en modelos de la EP mediante su actividad quelante de Fe y consecuente disminución del daño oxidativo.

1.3 Objetivo General

Caracterizar y evaluar el nuevo quelante de hierro Q11 en cuanto a su capacidad neuroprotectora en modelos tanto in vitro como in vivo de la EP.

1.4 Objetivos Específicos

- **Objetivo 1:** Caracterizar la capacidad quelante de Q11 in vitro.
- **Objetivo 2:** Caracterizar la capacidad y localización subcelular de la actividad quelante de Q11 en células SH-SY5Y.
- **Objetivo 3:** Evaluar la toxicidad y capacidad neuroprotectora de Q11 en células SH-SY5Y tratadas con rotenona, en cuanto a su viabilidad y daño oxidativo.
- **Objetivo 4:** Evaluar la capacidad neuritogénica de Q11 en neuronas TH-positivas tratadas con MPP+.

- **Objetivo 5:** Evaluar la capacidad neuroprotectora in vivo de Q11 en ratones intoxicados con MPTP.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos generales

De Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) se obtuvo: NaOH (106498), NaCl (106404), HCl (100317), DMSO (102952), PFA (818715), metanol (106009), sacarosa (107867), EDTA (8418), K₂HPO₄ (105104), etanol (100983), Na₂CO₃ (106392), SDS (UN2926), 1 isopentano Uvaso (UN1205). De Invitrogen Life Sciences (Carlsbad, CA) se obtuvo MTT (M694). De Sigma-Aldrich (USA) se obtuvo NaHCO₃ (S5761), manitol (M9546), MPP+ (D048), MPTP (M0896), NaN₃ (438436), progesterona (P0130), L-tirosina (T3754), insulina (I6634), Na₂SeO₃ (S5261), rotenona (R8875), NaBH₄ (452882), Eukit (03989), alcohol polivinílico Fluka (C99J177). De Calbiochem (Darmstadt, Alemania) FluorSave Reagent (345789), Triton X-100 (648466), BSA (12659), Hepes (391333). De Sakura Finetek: Tissue-Tek OCT (4583). De VWR portaobjetos SuperfrosPlus White (48311).

2.1.2 Cultivo Celular

De Gibco-BRL, Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) se obtuvo Minimal Essential Medium (MEM), F12-12 Nutrient Mixture, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Leibovitz's L-15 Medium (L-15), suero fetal bovino (FBS), mezcla de antibióticos y antimicóticos (estreptomina, penicilina y anfotericina B) y Tripsina-EDTA. De MerckMillipore (Billerica, MA, USA) se obtuvo tampón fosfato 10X (PBS) y unidades de filtración de 500 mL con poros de 0,2 µm. De Sanderson (Santiago, Chile)

se obtuvo agua bidestilada de calidad inyectable. De Corning Incorporated (Corning, NY, USA) se obtuvo placas de cultivo de 100, 60 y 35 mm de diámetro, y de 96, 48, 24 y 12 pocillos. De JSP (Santiago, Chile) se obtuvo cubre objetos para cultivo de 25 mm. De American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) se obtuvo la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266).

2.1.3 Animales

Del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) se obtuvo ratones machos C57/BL6 de 8 semanas de edad. Del bioterio de la Universidad Católica de Chile (Santiago) se obtuvo ratas Sprague-Dawley preñadas en día embrionario 15.

2.1.4 Sondas Fluorescentes

De Sigma-Aldrich (USA) se obtuvo las sondas calceína (C0875), calceína-AM (17783) y 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (D6883). La sonda RPA (rhodamine B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)-aminocarbonyl]benzyl ester) fue sintetizada por el laboratorio del Dr. Bruce Cassels del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile siguiendo metodología descrita en la literatura (Petrat y col., 2002).

2.1.5 Anticuerpos

Anticuerpo TH: anticuerpo monoclonal de conejo contra Tiroxina Hidroxilasa (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo BIII tubulina: anticuerpo monoclonal de ratón contra Tuj1 (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo 4-HNE: anticuerpo monoclonal de ratón contra

aductos de 4-hidroxi-nonenal (abcam, Cambridge, UK). Anticuerpo 8-OHdG: anticuerpo monoclonal de ratón contra 8-hidroxiguanosina (abcam, Cambridge, UK). Anticuerpo IgG Rabbit biotinilado: anticuerpo policlonal de cabra conjugado con biotina contra IgG de conejo (Vector, California, USA). Anticuerpo policlonal de cabra conjugado con Alexa-488 contra IgG de Conejo y anticuerpo policlonal de cabra conjugado con Alexa-532 contra IgG de ratón (Invitrogen Life Sciences, California, USA).

2.1.6 5-aminoetil-8-hidroxiquinolina

El compuesto evaluado en este seminario de título, la 5-aminoetil-8-hidroxiquinolina (Q11), fue sintetizado en el laboratorio del Dr. Vicente Castro, Departamento Química Orgánica y Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo una estrategia previamente descrita (Marrugo-González y col., 2012). Posterior al proceso de síntesis, el compuesto fue caracterizado mediante ^1H -RNM y ^{13}C -RNM confirmando su pureza (>96%).

2.1.7 Equipos

Incubador con inyección de CO_2 800WJ (Thermo Scientific, California, USA), campana de cultivo con flujo vertical Jouan MSC9 (Thermo Scientific, California, USA), campana de cultivo con flujo horizontal NuAire (Maryland, USA), ultracentrífuga Mikro22R (Hettich, Tuttlingen, Alemania), centrífuga Sorvall ultra Pro 80 (Thermo Scientific, California, USA), criostato Microm HM 525 (Thermo Scientific, California, USA), pHmetro SP701 Suntex (Nueva Taipei, China), lector de Fluorescencia Synergy 2 (Biotek, Vermont, USA), fluorímetro FluoroMax 2 (Jobin Yvon, Kioto, Japón), baño

termo-regulado WN7 (Mettler, Schwabach, Alemania), lupa binocular (Motic, Xiamen, China), bomba peristáltica 75188-00 (Major Science, California, USA) microscopio de campo claro TMS (Nikon, Tokio, Japón), cámara para microscopio USB 9 Mpx Amscope 9000 (California, USA), microscopio confocal Carl Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo Celular

Las células SH-SY5Y se cultivaron incubadas bajo humedad a 37°C y CO₂ 5% en medio MEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), aminoácidos no esenciales, penicilina 10 unidades/mL, estreptomina 10 mg/mL, anfotericina B 250 µg/mL y tampón HEPES 20 mM, pH 7,2. Fueron crecidas en placas de 100 y 60 mm hasta alcanzar confluencia renovando el medio de cultivo cada 48-72 h. Para la realización de experimentos las células fueron despegadas utilizando tripsina 0,5 % y sembradas sobre el mismo medio de cultivo en placas acordes al ensayo.

2.2.2 Determinación de la capacidad quelante

La fluorescencia de calceína (1 µM en buffer de HEPES 20 mM, pH: 7,2) fue apagada agregando Fe²⁺ 1 µM desde una solución 1:20 de Fe:ascorbato 1 mM. En placa de 96 pocillos se agregó el complejo calceína-Fe 1 µM y sobre éste se agregaron 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 144 equivalentes molares de los quelantes. A los 25-35 minutos de incubación se registró la intensidad de la fluorescencia de la sonda en lector de

fluorescencia utilizando filtro de excitación de 485/20 nm y emisión de 545/20 nm (Zheng y col., 2005).

Para el cálculo de la constante de unión aparente de Q11 y DFO por Fe, primero se realizó una curva de apagamiento de calceína 1 μM con distintas concentraciones de hierro y se obtuvo la constante de unión aparente de calceína ajustando los puntos a la ecuación:

$$Y = Kca * X \div \frac{[Ca] * X}{X \div 1}$$

donde Y corresponde a la concentración de Fe agregada ($[\text{Fe}]_0$), Kca es la constante de unión aparente con Fe, $[\text{Ca}]$ es la concentración de calceína, y X el cociente entre la concentración del complejo cal-Fe (sin fluorescencia) y la concentración de calceína libre (fluorescente) ($X = [\text{CaI-Fe}]/[\text{CaI}]$). Estos últimos valores fueron obtenidos directamente de la medición de la fluorescencia.

Luego se utilizaron 4 concentraciones de Fe sobre calceína 1 μM y sobre estas se agregaron 4 concentraciones diferentes de los quelantes, produciendo un corrimiento de la curva de apagamiento previamente descrita, para generar nuevas curvas y obtener las constantes aparentes de cada quelante utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = Kca * X \div \frac{[Ca] * X}{X \div 1} \div \frac{([Q] * X)}{(X \div (\frac{KQ}{Kca}))}$$

donde [Q] es la concentración de quelante utilizada y KQ es la constante de unión aparente del quelante por Fe. Esta estrategia fue modificada de la literatura (Smirnova y col., 2010).

Para la determinación de la inhibición de la producción del radical hidroxilo se utilizó la sonda fluorescente H₂DCFDA. Para que esta fuera oxidable in vitro se realizó una hidrólisis básica incubando 1 mL de NaOH con 250 µl de un stock 1 mM de la sonda durante 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción neutralizando con 5 mL de Hepes 25 mM pH 7. Luego a 1 mL de esta solución se le registró la fluorescencia basal durante 2 minutos. Luego se agregó 500 µL de H₂O₂ 40 µM y se continuó registrando la fluorescencia durante 2 minutos para luego agregar 50 µL de Fe⁺² 400 µM con o sin quelante, y continuar el registro (Brubacher y Bols, 2001).

2.2.3 Viabilidad celular

Células SH-SY5Y sembradas en placas de 96 ó 48 pocillos fueron incubadas con diferentes concentraciones de Q11 y simultáneamente tratadas con rotenona 5 µM por 24 h. Luego fueron incubadas en su medio habitual con MTT 0,5 mg/ml durante 1-2 h. Se detuvo el ensayo agregando un volumen equivalente de una solución SDS al 10% en HCl 10 mM. Se incubó durante 5 h a 37°C y se registró la absorbancia a 570 nm (Sumantran, 2011).

2.2.4 Determinación de la capacidad quelante citosólica o mitocondrial

Células SH-SY5Y sembradas uniformemente en placas de 24 pocillos fueron mantenidas en cultivo 6-7 días en medio normal para permitir confluencia e

incorporación de Fe. El día del ensayo las células fueron lavadas 1 vez con tampón HBSS y cargadas con las sondas calceína-AM o RPA a una concentración 5 μ M en tampón HBSS-glucosa por 10 min. Luego las células se lavaron 2-3 veces con HBSS y fueron incubadas 10 min a 37°C para permitir el equilibrio de la sonda. Posteriormente se registró la fluorescencia basal y luego de la adición de Q11 y otros quelantes, con filtros de 485 y 545 nm de excitación, y 535 y 600 nm de emisión para calceína y RPA respectivamente (Epsztejn y col., 1997; Petrat y col., 2002).

2.2.5 Protocolo de protección contra daño oxidativo

Células SH-SY5Y sembradas en vidrios de cultivo de 25 mm, fueron pre-incubadas con Q11 durante 1 h. Posteriormente el medio fue totalmente remplazado y se co-incubó con quelante (1-10 μ M) y rotenona 5 μ M por 24 h.

2.2.6 Cultivo primario de mesencéfalo de rata

Ratas preñadas Sprague-Dawley en el día 15 de gestación fueron anestesiadas y sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajeron los fetos y fueron recolectados en medio L-15 frío. En campana y utilizando lupa se aislaron cerebros para diseccionar y recolectar los núcleos dopaminérgicos mesencefálicos (A8, A9 y A10). El tejido fue disgregado por pipeteo repetido en medio DMEM/F12 suplementado con BSA 0,1%, insulina 5 mg/ml, L-tirosina 30 nM, progesterona 20 nM, selenito de sodio 30 nM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomycin 100 mg/mL y FBS 5%. Las células fueron sembradas en vidrios de cultivo de 25 mm, esterilizados y pre-tratados con poli-L-lisina 1 mg/mL, a una densidad de 50.000-60.000 células por cm². El medio fue remplazado

totalmente el día in vitro1 (DIV1), y los DIV3 y 5 se reemplazó la mitad del medio. El DIV7 las células fueron utilizadas.

2.2.7 Protocolo de daño y regeneración del árbol neurítico

Cultivos primarios de mesencéfalo de rata de 7 días in vitro fueron tratados con la toxina MPP+ 0,5 μ M en medio completo durante 24 h. Luego el medio de cultivo fue reemplazado retirando la toxina y se incubó con Q11 o M30 durante 72 h (Gómez y col., 2012).

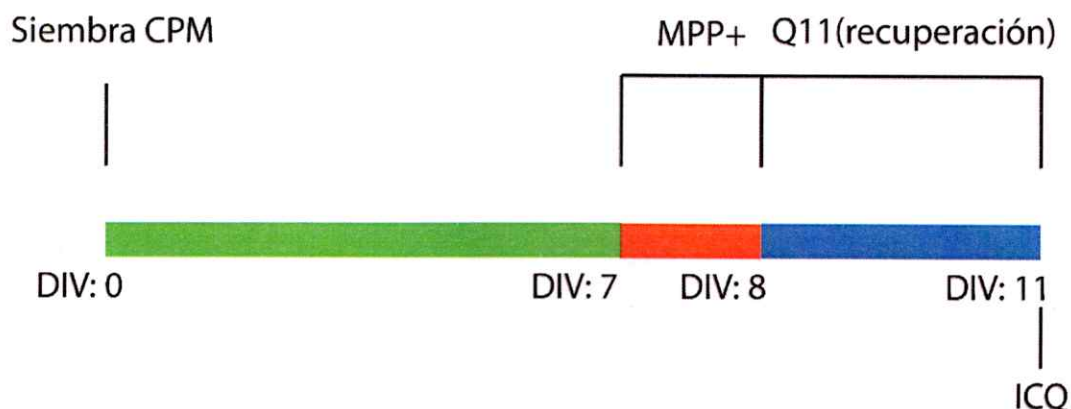


Figura 2 Protocolo de daño y regeneración del árbol neurítico de neuronas TH-positivas en cultivo primario de mesencéfalo de rata. Células mesencefálicas son sembradas en el día 0 y dejadas crecer. Al día 7 son tratadas con MPP+ 0,5 μ M por 24 h. El día 8 se retira el MPP+ y se agrega Q11 por 72 h. El día 11 se realiza inmunocitoquímica (ICQ) de fluorescencia anti-TH.

2.2.8 Protocolo de protección y regeneración contra la intoxicación con MPTP

Ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad fueron separados en 4 grupos de tratamiento: Control, MPTP, Q11 y MPTP/Q11. Estos ratones fueron pesados, etiquetados y aclimatados durante 1 semana con un ciclo de 12h luz / 12h oscuridad. El día 1 y 2 del experimento se administró por gavage Q11 5 mg/kg a los grupos Q11 y MPTP/Q11. A los grupos Control y MPTP se les administró volúmenes equivalentes de solución salina.

El día 3 se administró Q11 o salino y luego se efectuó un protocolo de intoxicación aguda con la toxina MPTP consistente en la administración por inyección i.p de 4 dosis de 20 mg/kg con intervalos de 2 h entre una y otra administración. Los grupos Control y Q11 recibieron solución salina. Los días 4, 5, 6 y 7 se administró la misma dosis de quelante. El día 8 los ratones fueron anestesiados con inyección i.p de ketamina/xilazina 150-10 mg/kg respectivamente. Luego se realizó perfusión intracardiaca de 20-30 mL de solución anticoagulante (suero/heparina (100 U/mL)) seguida de 40-50 mL de solución fijadora (PFA 4 % en suero fisiológico). Finalmente se retiró los cerebros y se conservaron durante 72 h en PFA 4 %, luego se mantuvieron 48 h en sacarosa 20% para posteriormente ser congelados por inmersión en isopentano a -20°C por 1 min.

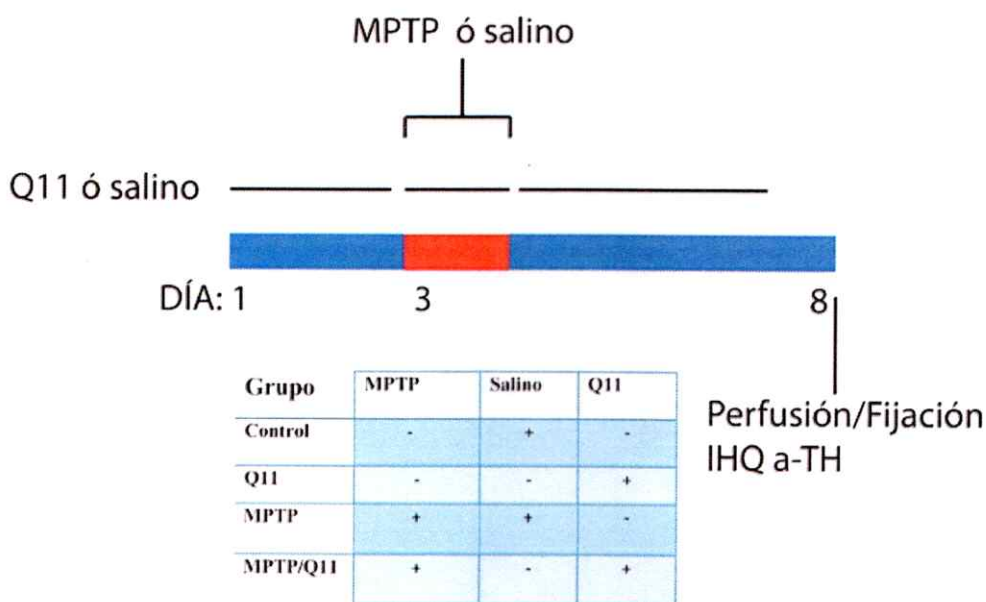


Figura 3 Protocolo de protección a intoxicación aguda con MPTP El día 1 comenzó la administración por gavage de Q11, 1 dosis diaria hasta el día 7. El día 3 se administró MPTP ó solución salina. El día 8 los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los cerebros para posterior análisis. La tabla inferior detalla los grupos experimentales y su tratamiento

2.2.9 Inmunocitoquímica

Las células fueron lavadas una vez con PBS precalentado, luego fijadas con PFA-sacarosa 4% por 30 min a 4°C. Se permeabilizaron utilizando Triton X-100 0,2% en PBS por 10 min a 4° C. El bloqueo se efectuó con BSA 4% durante 30 min a temperatura ambiente. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante 12 h. Las concentraciones de anticuerpos primarios utilizadas fueron: anti-TH 1/1000, anti- β III tubulina 1/500, anti-8HdG 1/400. El anticuerpo primario se lavó 3 veces con PBS seguido de la incubación del anticuerpo secundario correspondiente y la tinción nuclear ToPro-3 por 2 h. Los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor fueron utilizados a una concentración de 1/500. ToPro-3 fue utilizado a una concentración de 1/600. Todas las diluciones de anticuerpos fueron realizadas en BSA 1%. Luego de la incubación del anticuerpo secundario se lavó 2 veces con PBS y 1 vez con agua destilada. Los cubre-objetos fueron montados con el reactivo FluorSave.

2.2.10 Obtención y análisis de datos de inmunocitoquímica

La adquisición de imágenes desde muestras de células SH-SY5Y y de CPMs se realizó con un microscopio confocal LSM 510 en condiciones de configuración constante para cada experimento. La selección celular y medición de la intensidad de fluorescencia celular desde las imágenes fue realizada utilizando el programa ImageJ (NIH, USA). La medición de la longitud del árbol neurítico fue determinada utilizando el programa HCA-Vision (Csiro, Australia).

2.2.11 Inmunohistoquímica

Los cerebros congelados fueron embebidos en medio OCT para montar en criostato. Se realizaron cortes coronales de 40 μm de grosor y se recolectaron en PBS con azida 0,002%, en series de 5 grupos de 8 cortes cada uno, correspondientes a la región del estriado y 9 cortes por cerebro correspondientes a la región de la SNc. Los cortes fueron procesados en placas de 12 pocillos utilizando tamices de 15 mm de diámetro. Estos se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se trataron durante 5 min con metanol analítico para disminuir la actividad peroxidasa endógena en el caso de la inmunohistoquímica, o con NaBH_4 1 mg/mL para disminuir la fluorescencia intrínseca en el caso de la inmunohistoquímica de fluorescencia. Posteriormente se permeabilizaron los tejidos utilizando Triton X-100 al 2 % durante 5 min a temperatura ambiente. El bloqueo se efectuó con BSA al 4 % durante 30 min a temperatura ambiente. La incubación del anticuerpo primario se realizó con agitación a 4°C durante 72 h. En el caso del anticuerpo anti-TH se utilizó una concentración de 1/500 y en el caso del anticuerpo anti-HNE 1/250. Ambas diluciones en PBS con timerosal 0,02 %. El anticuerpo primario fue lavado 3 veces con PBS y luego se incubó el anticuerpo secundario, 30 min en el caso del anticuerpo anti-Rabbit biotinilado utilizado a una concentración de 1/250 en PBS, y 2 h en el caso de los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor utilizados a una concentración de 1/400. Después de lavar el anticuerpo secundario 3 veces con PBS se incubó con el kit ABC Vectastain durante 1 h. Luego se reveló el tejido incubando con DAB 1 mg/mL durante 1 a 3 min dependiendo del experimento y la progresión del color dada por la actividad de la peroxidasa al metabolizar el sustrato. Luego los cortes fueron lavados 3 veces con PBS y montados sobre portaobjetos

electroestáticos SuperfrosPlus. Los cortes montados fueron dejados secar durante una noche bajo campana y al día siguiente se procedió a la deshidratación del tejido incubando sucesivamente los cortes durante 1 min en agua destilada, etanol 70%, etanol 90% y etanol 100%. Posteriormente se incubó con xileno 2 veces por 3min cada vez. Finalmente se colocó un vidrio cubre objeto utilizando el medio de montaje EUKIT. En el caso de la inmunofluorescencia, el anticuerpo secundario fue lavado 2 veces con PBS y 1 vez con agua destilada, para posterior montaje con el medio FLUKA.

2.2.12 Obtención y análisis de datos de histoquímica

Las imágenes correspondientes a los cortes de cerebro procesados por inmunohistoquímica revelada con DAB, fueron obtenidos desde un microscopio de campo claro Nikon para el caso de cortes correspondientes a SNc y con una lupa Motic para el caso de los cortes de estriado. En ambos casos las imágenes fueron obtenidas con una cámara USB AmScope de 9 Mpx. En el caso de las inmunohistoquímicas de fluorescencia la obtención de imágenes se realizó con un microscopio confocal LSM 710. En ambos casos la obtención de datos desde las imágenes; área TH-positiva, número de células TH positivas, densidad óptica e intensidad de fluorescencia se realizó con el programa ImageJ.

2.2.13 Análisis estadísticos

Las diferencias entre los promedios de 3 o más grupos en cada experimento fueron analizados utilizando ANOVA de una vía con el software GraphPad Prism 6. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados como diferencias significativas. La diferencia significativa entre grupos fue evaluada con prueba a posteriori de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de la capacidad quelante de Fe²⁺

3.1.1 Competencia con calceína

Para determinar si el compuesto Q11 posee efectivamente actividad quelante y cuál es su capacidad quelante relativa, se realizó un ensayo de competencia por Fe²⁺ contra calceína. Calceína es una molécula fluorescente con excitación a los 485 nm y emisión a los 515 nm que, además de quelar Fe, tiene la propiedad de apagar su fluorescencia cuando une este metal. Por lo tanto, se midió como cambia la fluorescencia al agregar diferentes concentraciones de Q11. El quelante DFO se usó como un control positivo. Se observó que ambos quelantes son capaces de restaurar la fluorescencia en una clara dependencia de la concentración utilizada, sin embargo, DFO logra el efecto máximo a concentraciones mucho menores comparado con Q11 (Figura 4A). Para determinar la constante de afinidad aparente de estos quelantes primero se estableció la constante aparente de afinidad de calceína y hierro (K_{ca}). Para esto se realizó una curva de apagamiento con diferentes concentraciones de Fe (Figura 4B) y luego se transformó a un gráfico de dependencia entre la razón entre la concentración del complejo Fe-calceína y la calceína libre ($[Fe-Cal]/[Cal]$), y la concentración de Fe utilizada ($[Fe]_0$) (Figura 4C). En estas condiciones la constante de unión aparente de calceína por Fe obtenida fue $0,8 \cdot 10^6 M^{-1}$.

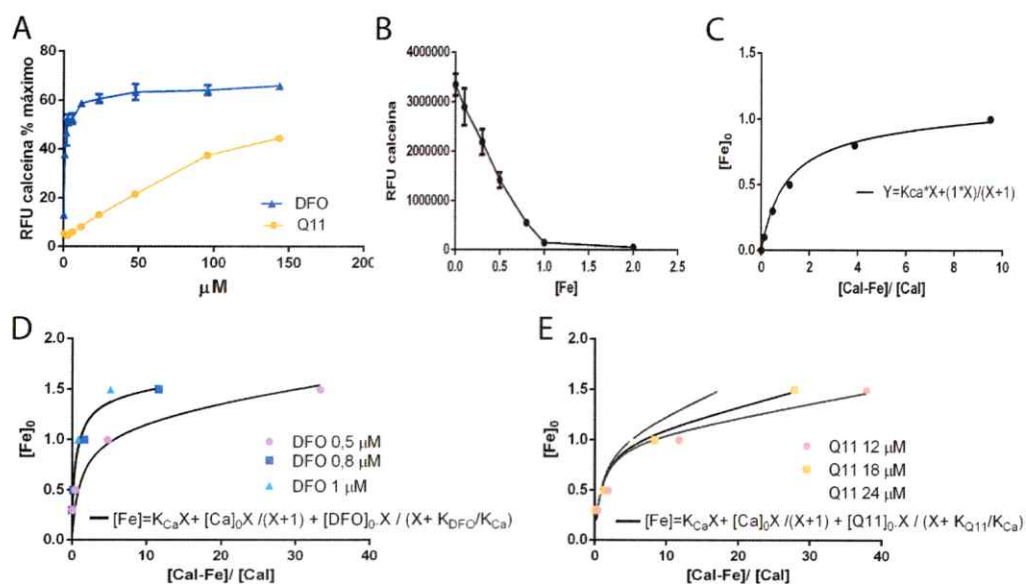


Figura 4. Q11 compite con calceína por Fe^{+2} . A) Solución de calceína-Fe $1\mu M$ en HEPES 25 mM fue desapagada agregando diferentes concentraciones de los quelantes Q11 o DFO. B) Curva de apagamiento de calceína en función de la concentración de Fe agregado. C) Curva de determinación de la constante aparente de calceína por Fe. D) Curvas de determinación de la constante aparente de DFO por Fe. E) Curvas de determinación de la constante aparente de Q11 por Fe. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de ensayos en cuadruplicado. N = 3 experimentos independientes.

Con este valor se construyeron las curvas para determinar las constantes de unión aparente de Fe^{2+} con los quelantes DFO y Q11 (Figura 4D-E) dando como resultado $0,334 \pm 0,02 * 10^9 M^{-1}$ para DFO, y $40,12 \pm 0,21 * 10^6 M^{-1}$ para Q11.

3.1.2 Inhibición de la producción del radical hidroxilo

Otra estrategia utilizada para determinar la capacidad quelante de Q11 con mayor relevancia biológica, fue medir la capacidad de este para evitar el desarrollo de la reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 utilizando la sonda H_2DCF . Esta sonda es oxidada por el radical hidroxilo y otros radicales de forma irreversible dando lugar a un

estado fluorescente con excitación a los 495 nm y emisión a los 515 nm. Teniendo en cuenta esto, se agregó a una solución 40 μM de la sonda, 20 μM de H_2O_2 , y luego Fe^{+2} 20 μM para generar radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton y la consecuente oxidación de H_2DCF (Figura 5A y 5B, Control). Siguiendo este procedimiento también se agregó Fe previamente mezclado con diferentes concentraciones de los quelantes DFO y Q11. La adición de quelante al Fe produjo una disminución en la fluorescencia máxima alcanzada por la sonda en un patrón de dosis respuesta en el que mayores concentraciones del quelante respecto del Fe, disminuyeron en mayor medida el valor máximo de la fluorescencia alcanzada. En concordancia con lo encontrado en los experimentos con calceína, la respuesta de Q11 se produce a concentraciones mayores alcanzando una disminución cerca del 90% al encontrarse en una concentración 100 veces la del Fe. La IC_{50} para la reacción de Fenton en estas condiciones corresponde a 22,45 μM de Q11 (Figura 5A). DFO evita la oxidación a menores concentraciones y a una concentración 5 veces mayor a la de Fe. La disminución es prácticamente del 100%. La IC_{50} determinada para DFO es de 0,5085 μM .

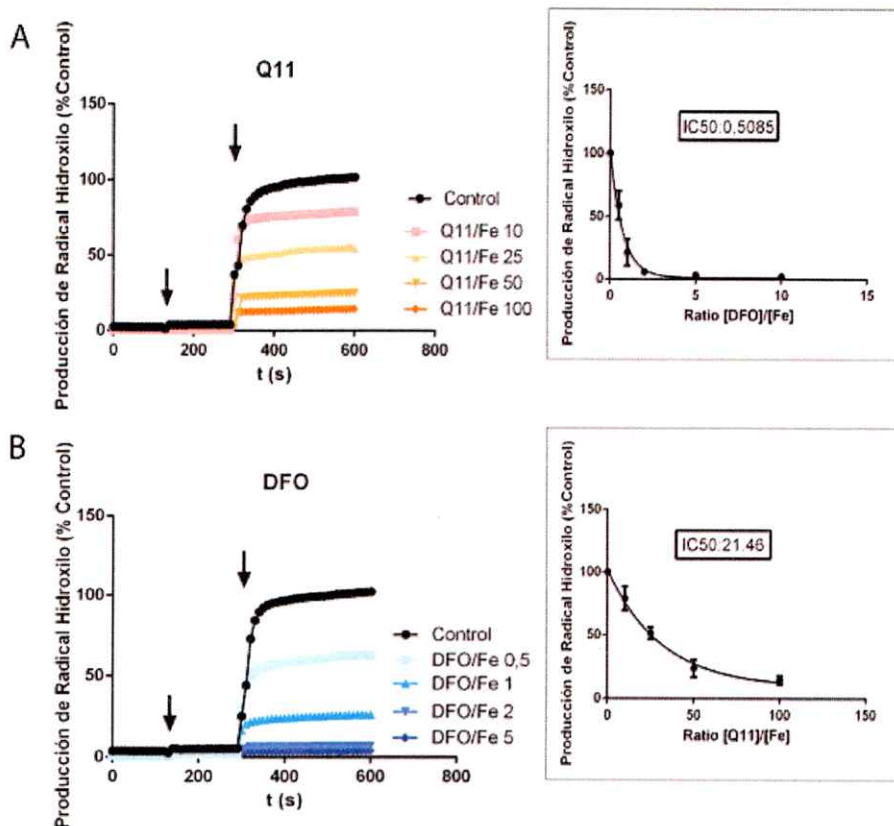


Figura 5. **Q11 inhibe la producción del radical hidroxilo.** Determinación de la fluorescencia de la sonda H2DCF. Primera flecha adición de H₂O₂. Segunda flecha adición de Fe, o Fe+ quelante. A) Cinética de la fluorescencia utilizando Q11, B) cinética de la fluorescencia utilizando DFO. En esquina superior derecha de A y B, insertos con la determinación de la IC50 de cada quelante. Valores representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3.2 Determinación de la capacidad quelante citoplasmática o mitocondrial

3.2.1 Permeabilidad celular y capacidad quelante de hierro citoplasmático.

Una vez determinada la efectiva capacidad quelante de Q11 fue relevante evaluar si el compuesto es capaz de permear la membrana celular y en segundo término ejercer su acción quelante en el espacio citoplasmático. Para esto se cargaron células SH-SY5Y con la sonda calceína-AM. Esta sonda, derivada de la calceína anteriormente mencionada, ingresa a la célula en forma no fluorescente y es desesterificada a calceína

fluorescente. Al ser desesterificada además adquiere polaridad y se concentra en el citoplasma dónde la unión de Fe lábil apaga su fluorescencia. Al agregar quelante al medio donde se encuentran las células es posible determinar en tiempo real si existe cambio en la fluorescencia al interior de las células, lo que da cuenta de una actividad quelante capaz de competir por Fe contra calceína y restaurar su fluorescencia.

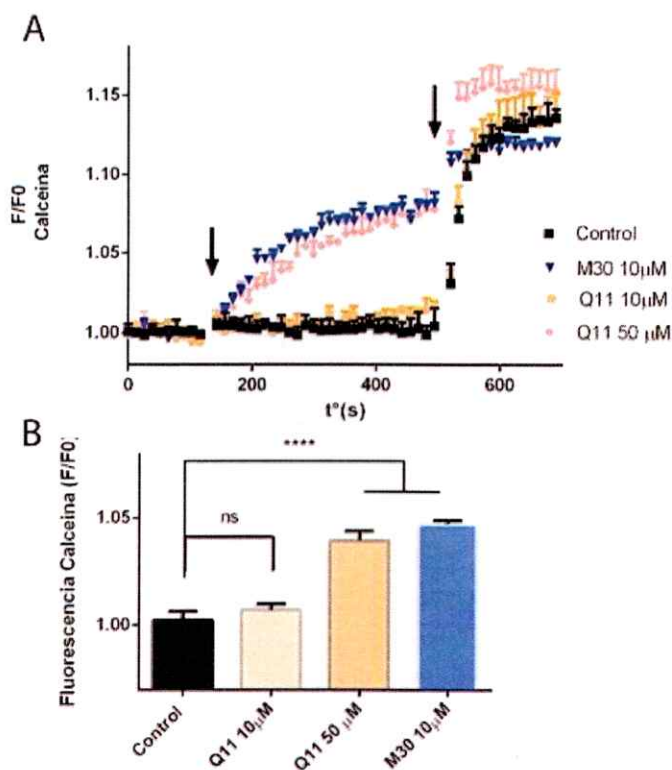


Figura 6. Q11 posee capacidad quelante del hierro citoplasmático. Células SH-SY5Y fueron cargadas con calceína-AM 5 μ M y se registró la fluorescencia de la sonda (Ex.485/Em.545). A) Cinética de fluorescencia (F/F0) de la sonda calceína. Primera flecha indica la adición de cualquiera de los quelantes evaluados ó H₂O en control. Segunda flecha indica la adición del quelante 2,2-bipiridilo a una concentración final de 2 mM. B) Fluorescencia después de la adición de los quelantes evaluados. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cuadruplicados. N=3 experimentos independientes. **** p < 0,0001.

La adición de una concentración 10 μM de Q11 no genera una respuesta significativa en la fluorescencia de calceína. Sin embargo, si se utiliza 50 μM es posible ver una respuesta similar a la observada al utilizar el quelante M30 a 10 μM . La adición del quelante 2,2-bipiridilo a una concentración elevada (2 mM) permite “desapagar” totalmente la calceína siendo el control positivo de la respuesta de la sonda en cada caso (Figura 6). Dado estos resultados, es posible que Q11 pueda permear la membrana celular y ejercer su capacidad quelante en el citoplasma. Sin embargo, esta capacidad es menor que la del quelante M30, en concordancia con el experimento de la Figura 4.

3.2.2 Permeabilidad y capacidad quelante mitocondrial.

La mitocondria, dada la actividad de la cadena de transporte de electrones, es el lugar por excelencia de generación intrínseca de ROS. Por tanto, fue de interés evaluar la capacidad de quelar Fe en este organelo. Para evaluar esta capacidad se utilizó la sonda de Fe mitocondrial RPA siguiendo la misma lógica que con la utilización de calceína-AM. Esto es, la capacidad quelante mitocondrial se evidencia como la restauración de la fluorescencia de RPA, que es concentrada en las mitocondrias y que se apaga al unir Fe en este organelo.

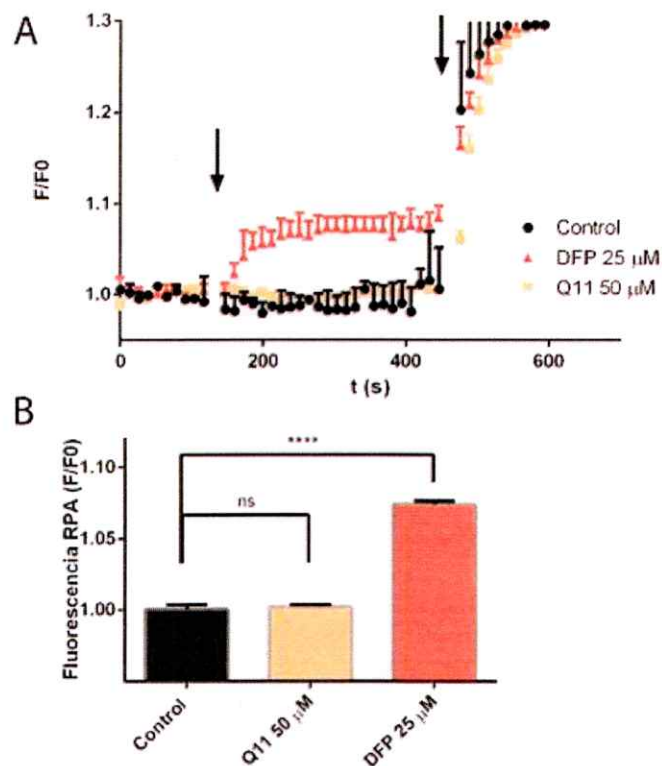


Figura 7. Q11 no posee capacidad quelante mitocondrial. Células SH-SY5Y fueron cargadas con 5 μ M de la sonda de Fe mitocondrial RPA. Se registró la fluorescencia de la sonda (545/600 nm) antes y después de agregar los quelantes. A) Cinética de la fluorescencia (F/F0) de células cargadas con RPA: la primera flecha indica la adición de quelantes, la segunda indica la adición del quelante 2,2-bipiridilo a una concentración final 2 mM. B) Promedio de la fluorescencia después de la adición de quelantes. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cuadruplicados. N=3 experimentos independientes. **** p < 0,0001.

La adición del quelante DFP 25 μ M produjo un cambio en la fluorescencia de RPA, evidenciando permeabilidad y capacidad quelante mitocondrial. Por otro lado, la adición del altamente permeable quelante 2,2-bipiridilo genera, como es de esperar, una respuesta del sistema, por sobre el nivel alcanzado por DFP. Sin embargo, la adición de Q11, tanto a una concentración de 10 (no se muestra) como de 50 μ M no produjo un cambio en la fluorescencia de la sonda RPA, indicando su incapacidad de quelar hierro en este compartimento (Figura 7).

3.3 Citotoxicidad y cito-protección contra el daño oxidativo

3.3.1 Citotoxicidad de Q11

Con la intención de utilizar el compuesto Q11 en protocolos de protección contra agentes productores de daño oxidativo, primero fue evaluada la citotoxicidad de este compuesto a diferentes dosis. Para ello, células SH-SY5Y fueron tratadas con Q11 por 24 h para posteriormente realizar un ensayo de viabilidad con el reactivo MTT. Los resultados del ensayo con MTT muestran que ninguna de las dosis evaluadas de Q11 afecta la viabilidad celular. Si bien en la mayoría de las concentraciones parece existir un pequeño aumento en la absorbancia a 570 nm respecto al control, este no es estadísticamente significativo (Figura 8A).

3.3.2 Citoprotección del daño inducido por rotenona

Se evaluó, además, la capacidad de diferentes concentraciones de Q11 de proteger la viabilidad de células SH-SY5Y sometidas a un tratamiento con rotenona 5 μ M por 24 h. Para ello se pre-incubó con Q11 por 1 h, y luego se co-incubó Q11 con rotenona 5 μ M por 24 h. El tratamiento con rotenona por 24 h disminuyó la viabilidad en un 20% aproximadamente. Ningún tratamiento con Q11 logró revertir esta situación (Figura 8B).

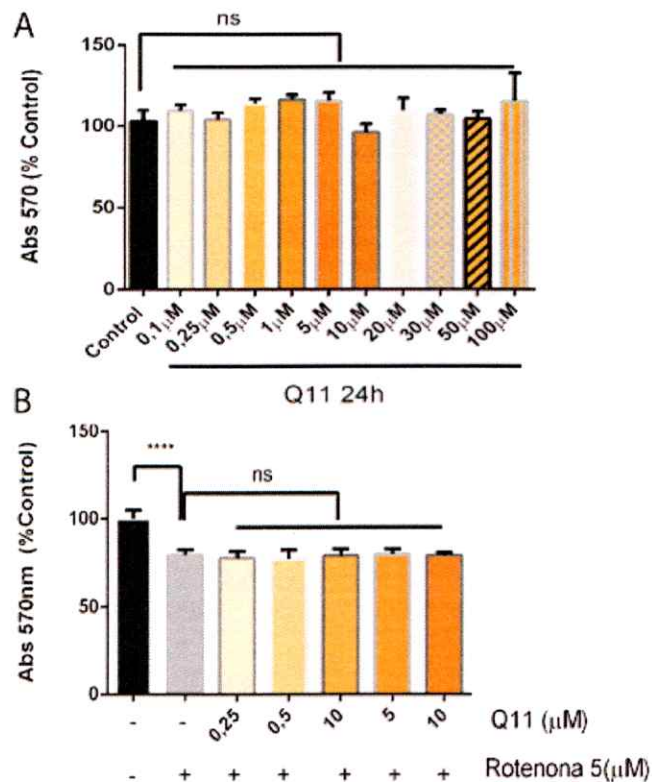


Figura 8. **Q11 no rescata la viabilidad de células tratadas con rotenona.** Células SH-SY5Y sembradas en placas de 96 pocillos fueron tratadas con (A) diferentes concentraciones de Q11 por 24 h y (B) pre-incubadas con diferentes concentraciones de Q11 por 1 h y luego co-incubadas con Q11 y rotenona. Los valores representan la media \pm desviación estándar de quintuplicados. N=3 experimentos independientes. **** $p < 0,0001$.

Además, se evaluó la capacidad de Q11 de ofrecer protección contra el daño oxidativo a ácidos nucleicos utilizando un marcador específico de este fenómeno como es la adición de radical hidroxilo a la base deoxiguanina (dG) formando 8-OHdG. Para esto, células sembradas en cubreobjetos fueron tratadas siguiendo un protocolo de pre-incubación con Q11 de 1 h, seguido de la co-incubación con rotenona 5 μ M para luego de 24 h realizar ICQ contra 8-OHdG.

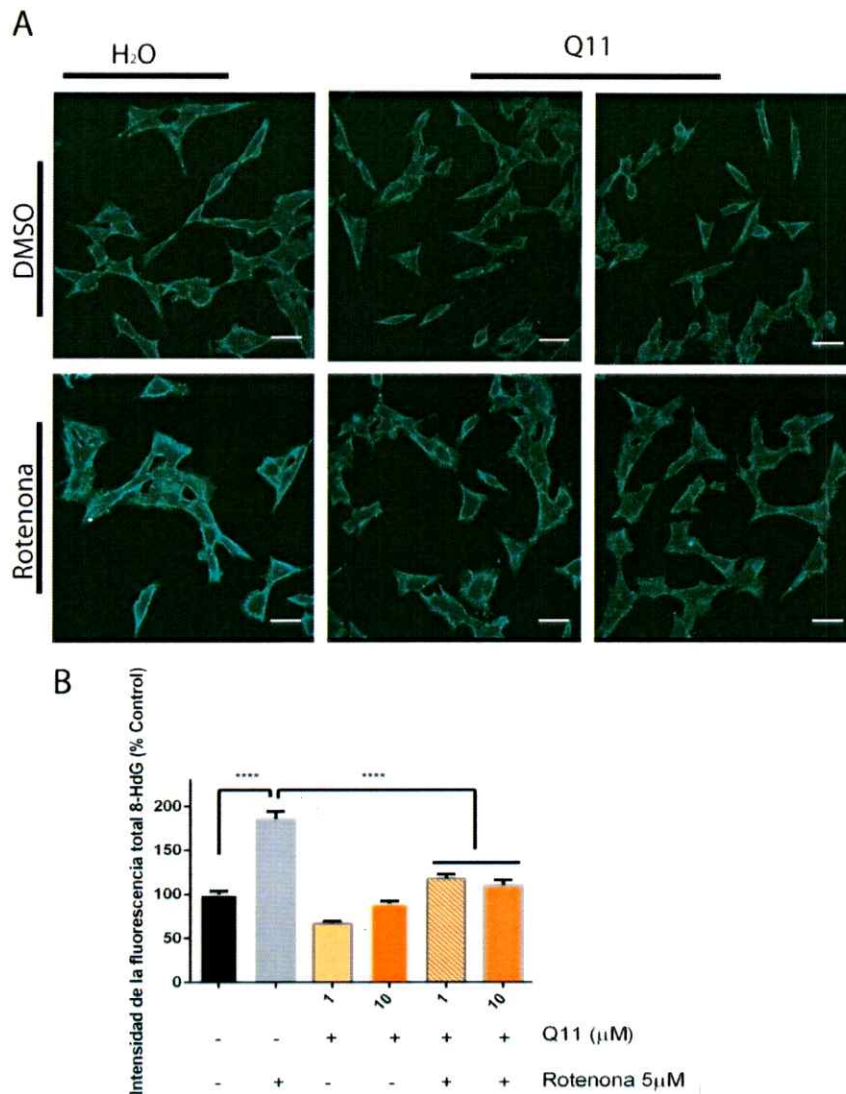


Figura 9. Q11 protege contra la formación de 8-OHdG. Células SH-SY5Y fueron pre-incubadas con Q11 y luego co-incubadas con rotenona $5\ \mu\text{M}$ por 24 h. Luego se realizó inmunocitoquímica de fluorescencia utilizando anticuerpo anti-8-OHdG. A) Imágenes representativas de diferentes tratamientos. Barra de escala = $20\ \mu\text{m}$. B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia registrada de 40-50 células por condición. Valores representan la media \pm desviación estándar de las mediciones. $N=3$ experimentos independientes. **** $p < 0,0001$.

El tratamiento con rotenona aumentó la intensidad de la fluorescencia casi al doble de la condición control, que corresponde a células no tratadas (Figura 8A y 8B). La pre y co-incubación de rotenona con Q11 evita el aumento de la formación de 8-OHdG (Figura

8G). Los tratamientos solo con Q11 parecen disminuir la fluorescencia respecto el control, sin embargo, estas diferencias no son significativas.

3.3.3 Regeneración del árbol neurítico en cultivo primario de mesencéfalo

Para explorar las propiedades neuroprotectoras de Q11 en células dopaminérgicas posterior a la generación de daño (relevante en la EP), células mesencefálicas de rata en cultivo primario fueron tratadas con la concentración sub letal 0,5 μM de la toxina MPP+ por 24 h, condición que produce una drástica disminución del árbol neurítico (Gomez y col., 2011). Posteriormente, las células se incubaron con Q11 por 72 h para luego realizar ICQ contra el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH).

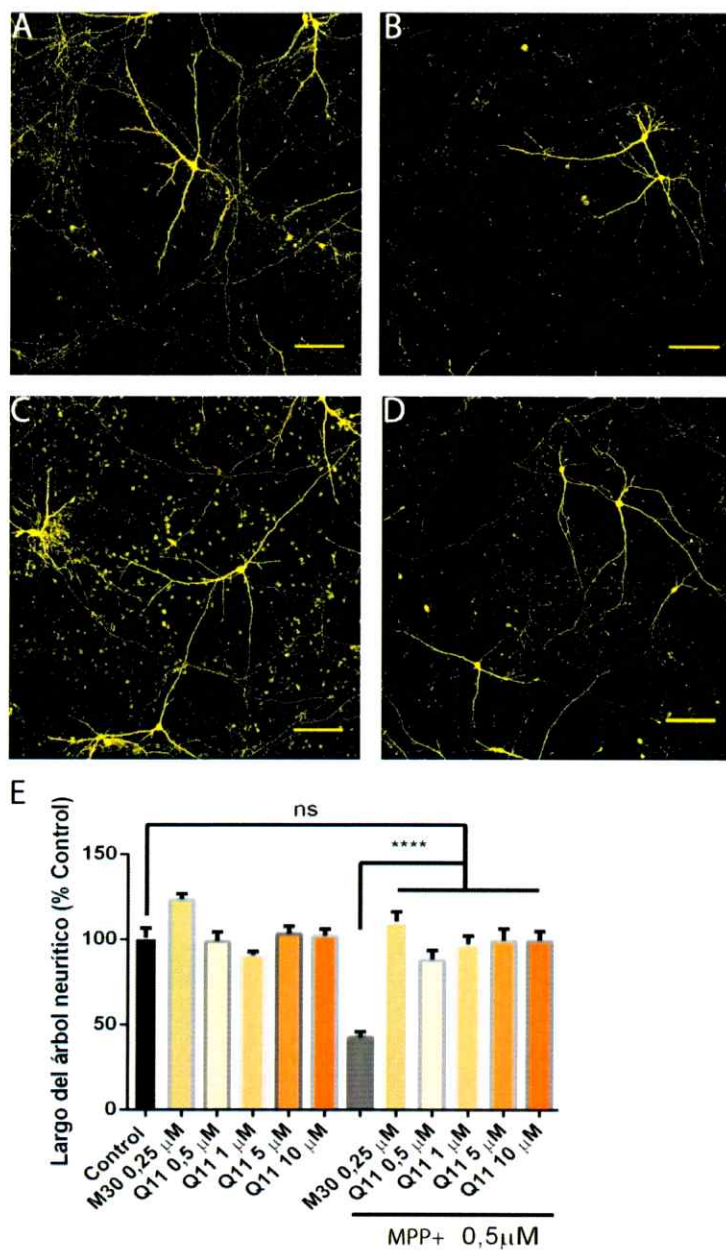


Figura 10. Q11 recupera el árbol neurítico de células TH positivas tratadas con MPP+. Cultivos primarios de mesencéfalo tratados con MPP+ por 24 h y luego incubados con Q11 o M30 por 72 h. Luego se realizó inmunocitoquímica anti TH. A) Imagen representativa de la condición Control, B) tratamiento con MPP+, C) MPP+ y regeneración con M30, D) MPP+ y regeneración con Q11; 5 μ M. E) cuantificación del largo del árbol neurítico, 20-30 células por condición. Barra de escala =100 μ m. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de las mediciones. N=3 experimentos independientes. **** p< 0,0001.

La marca de TH permite distinguir tanto aquellas células dopaminérgicas de los demás tipos celulares componentes del cultivo como contornear los procesos que emergen de los somas TH-positivos (Figura 10A-F). Como era esperado, el tratamiento con MPP+ generó una disminución de la longitud de los procesos de aproximadamente un 50%. Esta disminución fue revertida por el tratamiento posterior de M30 ó cualquiera de las concentraciones de Q11 evaluadas indistintamente (Figura 9G).

3.4 Toxicidad y neuroprotección in vivo

Para evaluar la toxicidad y capacidad neuroprotectora de Q11 in vivo, ratones machos C57/BL6 fueron tratados con la toxina MPTP en un protocolo de intoxicación aguda, con o sin la administración oral de Q11 como agente protector, para luego evaluar en los cerebros de estos animales mediante IHQ la cantidad de somas TH-positivos en la SNc, la densidad de las fibras TH-positivas en el estriado, y la presencia de reactividad de 8-hidroxinonenal como medida del daño oxidativo en la SNc.

3.4.1 Toxicidad y protección de neuronas TH-positivas en la SNc

Utilizando la herramienta "Analyze.Particles" de ImageJ se cuantificó la proporción de tejido TH-positivo en la multiplicidad de cortes correspondientes al área de la SNc de los cerebros de los diferentes grupos de tratamiento.

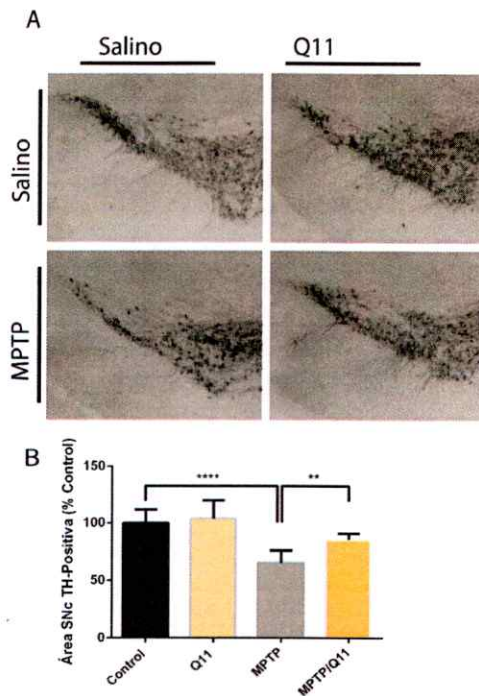


Figura 11. Q11 protege la SNc de ratones tratados con MPTP. A) Imágenes representativas de cortes de SNc de ratones tratados. Las neuronas fueron detectadas mediante inmunohistoquímica contra TH. B) gráfico de cuantificación del área TH-positiva (somatas). Valores representan la media \pm desviación estándar de las mediciones. Control, Q11 y MPTP: 7 ratones por condición. Q11/MPTP: 8 ratones. **** $p < 0,0001$. ** $p < 0,01$.

Se observó una clara disminución en la cantidad de somas TH-positivos en aquellos cerebros correspondientes al tratamiento con MPTP respecto del tratamiento control (Figura 11A y 11C). El tratamiento sólo con Q11 no varió el número de somas TH-positivos. En ratones tratados con MPTP, el tratamiento con Q11 indujo una significativa protección contra la pérdida de células TH-positivas que provoca la intoxicación aguda con sólo MPTP (G).

3.4.2 Protección de las fibras TH-positivas en el estriado

Dado que la sintomatología de la EP tiene directa relación con la depleción de dopamina en el cuerpo estriado, la integridad de las fibras de las neuronas dopaminérgicas cuyos somas residen en la SNc, es un factor clave a considerar más aun teniendo en cuenta que se presume que la muerte de las neuronas de la SNc ocurre por un proceso de muerte retrógrada, iniciándose en la parte más distal de estas mismas, sus terminales axonales en el estriado.

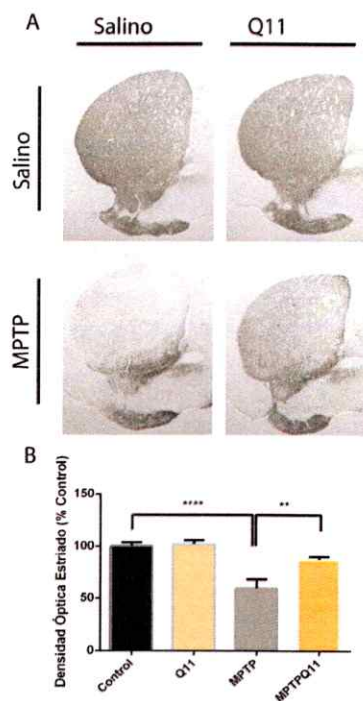


Figura 12. Q11 protege las fibras TH-positivas en el estriado. A) Imágenes representativas de cortes de estriados de ratones tratados. B) Cuantificación de la densidad óptica de múltiples cortes (6-8) por cerebro de cada condición. Valores representan la media \pm la desviación estándar de las mediciones. Control, Q11 y MPTP: 7 ratones por condición. Q11/MPTP: 8 ratones. **** $p < 0,0001$. ** $p < 0,01$.

Al igual que los somas TH-positivos de la SNc, las fibras TH-positivas en el estriado tampoco se vieron afectadas con el tratamiento solo con Q11 (Figura 12A) descartando un efecto de toxicidad por el quelante. La intoxicación con MPTP produjo una

disminución de la intensidad de marca de TH en el estriado de alrededor de un 50% (Figura 12B) y el tratamiento con Q11 en ratones intoxicados aumentó la intensidad de marca de TH a niveles cercanos al 90% respecto el control, siendo significativamente diferente a la intoxicación sólo con MPTP (Figura 12B). Sin embargo, la intensidad de la marca no se recuperó totalmente.

3.4.3 Protección contra la formación de aductos de 4-HNE

Para evaluar cómo los efectos protectores ejercidos por Q11, ya sea en las células TH-positivas de la SNc o en las fibras TH-positivas en el estriado, podrían estar mediados por la disminución del estrés oxidativo producido en la SNc, se evaluó la presencia de aductos de 4-HNE en cortes de SNc de los ratones tratados con o sin Q11 e intoxicados o no con MPTP. 4-HNE es un producto altamente reactivo derivado de la peroxidación lipídica. Con proteínas, 4-HNE forma aductos con el grupo ϵ -amino de las lisinas, con el sulfhidrilo de las cisteínas, y con el imidazol de las histidinas (Shaur y col., 2015). Por tanto, la formación de aductos de 4-HNE es reflejo de la peroxidación lipídica y modificación oxidativa a proteínas.

Si bien la marca de 4-HNE es ubicua comparada con la marca de TH, es posible notar un claro patrón de intensificación de la marca en la zona correspondiente a la SNc en los cortes de ratones intoxicados con MPTP (Figura 12C). Este patrón no se encuentra presente en los cortes correspondientes a la condición control y en aquellos animales sólo tratados con Q11. Además, el patrón de la marca tampoco es evidente en los ratones intoxicados con MPTP y tratados con Q11. La cuantificación de la intensidad de la

fluorescencia de la marca de 4-HNE en la SNc, que incluye la sustracción del fondo correspondiente al tejido presente fuera de la SNc delimitada por la marca de TH, indica un aumento de la marca 4-HNE en los ratones tratados con MPTP de aproximadamente un 200% respecto a la condición control. El tratamiento con Q11 revierte el efecto del MPTP y la intensidad de la marca es similar a la situación control (Figura 13B).

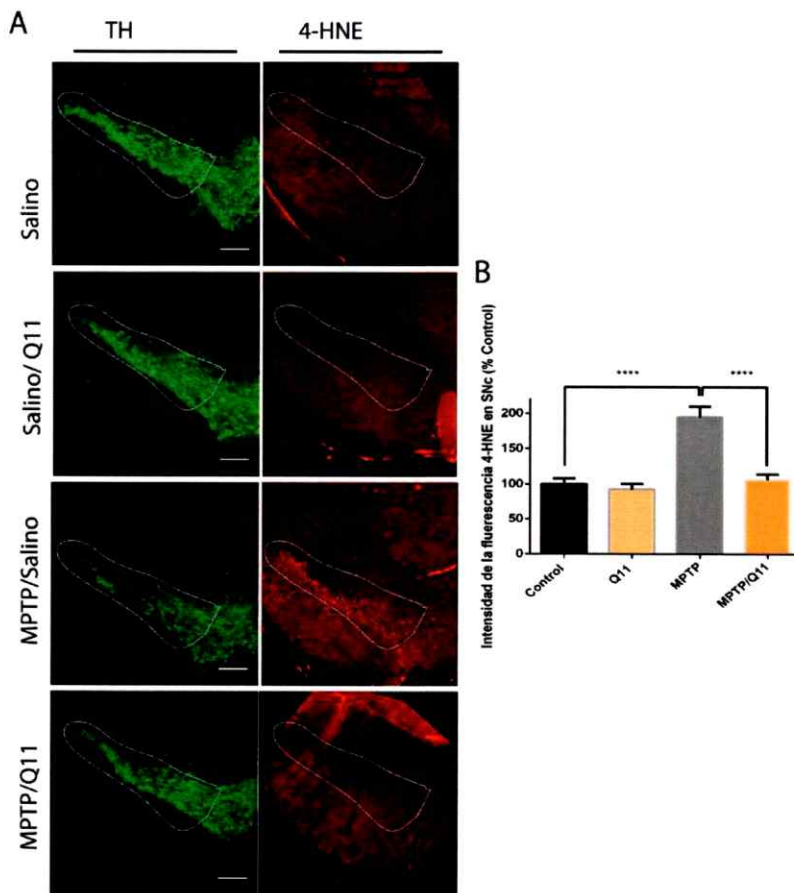


Figura 13. Q11 previene la formación de aductos de 4-HNE en la SNc tras la intoxicación con MPTP. A) Imágenes representativas de cortes de SNc de ratones sometidos a diferentes tratamientos, marcados con anticuerpos contra TH y 4-HNE. B) Gráfico de cuantificación de la intensidad de la fluorescencia correspondiente al canal para 4-HNE en la zona de la SNc delimitada por la marca de TH. Barra de escala = 200 μ m. La línea blanca punteada indica la zona de la SNc. Se muestra el valor promedio \pm la desviación estándar de las mediciones. 3-5 cortes analizados por condición. Control, Q11 y Q11/MPTP: 5 ratones por condición. MPTP: 4 ratones. **** $p < 0,0001$.

4. DISCUSIÓN

En este seminario evaluamos como el compuesto Q11, diseñado y sintetizado como quelante de Fe, puede ejercer protección en diferentes contextos que modelan la enfermedad de Parkinson. Las propiedades y efectos encontrados se discuten a continuación.

4.1 Resultados

4.1.1 Capacidad quelante, permeabilidad y localización subcelular de la actividad quelante.

Dos experimentos fueron realizados para determinar la capacidad quelante de Q11. En el primero se utilizó calceína, un compuesto con una amplia utilización en ensayos celulares, para determinar además de la concentración de Fe intracelular, la viabilidad celular, visualización de ondas de calcio, fuga desde liposomas, etc. Calceína forma un complejo con Fe^{+2} en una razón 1/1 (Figura 4B). La formación de este complejo provoca la pérdida de la fluorescencia a los 515 nm que posee la calceína libre. Por lo tanto, la lógica de este experimento fue examinar si la incubación con Q11 puede disminuir la formación del complejo Cal-Fe y por ende aumentar la fluorescencia a los 515 nm. El resultado fue muy evidente para el quelante DFO que es ampliamente utilizado en terapias contra la sobrecarga de Fe sistémico, y forma un complejo 1/1 con los átomos de Fe, preferentemente de Fe^{+3} (Motekaitis y Martell, 1991). En cambio, Q11 ejerció un menor pero progresivo aumento dependiente de la concentración de la fluorescencia a los 515 nm bajo las condiciones probadas. La mayor afinidad de DFO respecto de Q11

mostradas en este ensayo puede explicarse por la estructura hexadentada de DFO, que permite la formación del complejo 1/1 de mayor estabilidad y probabilidad de ocurrencia versus la estructura bidentada de Q11, que genera un complejo 1/3 (3 moléculas de quelante por 1 de Fe) (Zheng, 2005). Por otro lado, la propia afinidad relativa de calceína por Fe^{2+} puede ser mayor a la de las quinolinas, que tienen mayor afinidad por Fe^{3+} (Turnquist y Sandell, 1968; Zheng, 2005). Sin embargo, a pesar de que el efecto producido por Q11 es menor y por ende requiere de mayores concentraciones para lograr un efecto similar al de DFO, la actividad quelante por Fe^{+2} existe y podría incluso representar una ventaja respecto de quelantes fuertes que pueden generar efectos de déficit de Fe, con consecuencias igualmente adversas a la acumulación.

En seguida se determinó la posible capacidad de Q11 de impedir la formación del radical hidroxilo por la reacción de Fenton. Para esto se utilizó la sonda fluorescente H_2DCF , que posee dos grupos hidroxilos sensibles a la oxidación por diferentes radicales libres, entre ellos el radical hidroxilo (Mayhre y col., 2003; Setsukinai y col., 2003) dando lugar a DCF, forma que posee fluorescencia a los 515 nm. La adición de H_2O_2 y luego Fe permite la generación del radical hidroxilo, la oxidación de la sonda y por ende un aumento de la fluorescencia. La capacidad quelante queda en evidencia entonces como la disminución en el grado de oxidación de la sonda como se muestra con las diferentes concentraciones de quelante utilizadas (Figura 5). La demostración de este punto es importante ya que la coordinación inestable de los átomos de Fe puede igualmente dar lugar a la reacción de Fenton (Graf y col., 1984), que es lo que ocurre en las células con el Fe lábil unido a ligandos débiles tales como citratos o aminoácidos

(Breuer y col., 1996). Por lo tanto, este ensayo demuestra que Q11 es capaz no sólo de quelar Fe, sino de impedir su reactividad en la reacción de Fenton.

La utilización de calceína-AM, una versión modificada de calceína que al ingresar a la célula es desesterificada por esterasas celulares impidiendo su salida, permitió monitorear el llamado “pool de Fe lábil” (LIP), como se comentó anteriormente, correspondiente al Fe celular que no está unido a ligandos fuertes (Ferritina, neuromelanina) y por tanto es redox-activo (Epsztejn y col.,1997). La calceína desesterificada apaga su fluorescencia al unir Fe lábil. Por tanto, la actividad de un quelante de Fe se observa como el aumento de la fluorescencia de calceína al ser agregado al medio (Petrat y col., 1999). De esta forma se evalúa la capacidad del quelante de entrar a las células cargadas con calceína y quelar el Fe unido a esta. Q11 demostró permeabilidad a la membrana plasmática. La permeabilidad de Q11 puede estar dada por los anillos de la quinolina que le otorgan la hidrofobicidad necesaria y ha sido documentada para otros derivados de esta estructura (Zheng y col., 2005). El experimento de quelación de Fe citoplasmático por Q11 confirma lo observado en la aproximación con calceína en solución respecto de la capacidad quelante de Q11 (Figuras 4 y 6), apuntando a este último como un quelante débil, si se le compara con DFO o M30.

4.1.2 Toxicidad, neuroprotección y neuroregeneración in vitro

Dado el interés en los posibles efectos terapéuticos de quelantes de Fe, evaluamos la posible toxicidad y capacidad neuroprotectora de Q11. Ambos parámetros fueron

evaluados con un ensayo de viabilidad utilizando el reactivo MTT. En este ensayo las células tratadas con Q11 en diferentes concentraciones (toxicidad), o con rotenona 5 μM y diferentes concentraciones de Q11 (protección) fueron posteriormente incubadas con MTT y la viabilidad, o más precisamente la actividad metabólica de las células se evaluó por la capacidad de formar un producto coloreado (formazan) que es posible detectar por su absorbancia a los 570 nm.

La incubación con Q11 en un amplio espectro de concentraciones (0,1-100 μM) no produjo efecto en la viabilidad de las células SH-SY5Y, descartando un efecto de toxicidad de este derivado. Esto es interesante puesto que por ejemplo incubaciones con altas concentraciones de DFO y M30 (>10 μM) si han mostrado disminución de la viabilidad (datos no mostrados).

Al evaluar sin embargo la posibilidad de que Q11 protegiera células SH-SY5Y contra rotenona, agente oxidante capaz de inhibir el complejo I mitocondrial, no se encontró protección. Si bien algunos quelantes de Fe han sido informados como capaces de proteger en sistemas celulares tratados con rotenona (Zheng y col., 2005; Mena y col., 2015), es posible que este tratamiento (5 μM , 24 h) fuese demasiado agudo como para ser rescatado por la quelación Fe. En este sentido, trabajos han mostrado que rotenona puede afectar otros sistemas dentro de la célula, por ejemplo, componentes del citoesqueleto (Sanchez y col., 2008). Por lo tanto, efectos en la viabilidad que involucren vías independientes del aumento del tono oxidativo, pueden ser insensibles a la quelación de Fe y estar participando en este modelo.

Al evaluar el daño oxidativo a ácidos nucleicos en células SH-SY5Y determinando la formación de 8-OHdG, se observó que rotenona originó un aumento en la formación de este producto. Interesantemente este aumento se evitó mediante la coincubación con Q11, lo que indica una protección por Q11 a la modificación oxidativa de los ácidos nucleicos en la población de células que sobrevive a la muerte inducida por rotenona. La muerte celular que no es rescatable por Q11 podría atribuirse además a otros fenómenos tales como depleción de ATP producto de la inhibición del complejo I mitocondrial (Tsujimoto, 1997), además de una acumulación de daño oxidativo. En esta misma línea celular se ha visto que la acumulación de ROS es más preponderante en la inducción de apoptosis que la depleción de ATP (Watabe y Nakaki, 2007). Sin embargo, las concentraciones de rotenona utilizadas en el trabajo citado son mucho menores ($<0,5 \mu\text{M}$) lo que sugiere que la baja en la viabilidad observada en nuestro sistema (rotenona $5 \mu\text{M}$) da cuenta de un fenómeno de muerte insensible a la quelación de Fe.

Dado que en la EP son neuronas dopaminérgicas las que degeneran, fue importante evaluar Q11 en un modelo complejo de muerte neuronal. Teniendo en cuenta además la posible importancia de la dopamina en la sensibilidad de estas neuronas (Hare y Double, 2016), se evaluó el rol protector de Q11 en cultivo primario de mesencéfalo, que tiene como componente minoritario (1-2%) neuronas dopaminérgicas TH-positivas. Se encontró que después de inducido el daño con MPP+, la incubación con diferentes concentraciones de Q11 fue capaz de regenerar el árbol neurítico de las neuronas dopaminérgicas de este cultivo. Esto indica que Q11 tiene un efecto neuritogénico en estas neuronas, que además se hallan en un contexto heterogéneo en el que posiblemente

otros actores celulares estén interactuando (astrocitos, microglías). Este resultado es concordante con lo hallado en trabajos anteriores con antioxidantes y el quelante M30 (Aguirre y col., 2015). Como se vio en las células SH-SY5Y este efecto puede estar relacionado con la disminución del estrés oxidativo en estas neuronas, hecho que les permitiría recuperar el tono redox más rápido que aquellas células no tratadas con Q11 y por ende restablecer la tasa metabólica necesaria para la síntesis de biomoléculas requeridas para la posterior extensión neurítica. Esta habilidad “regeneradora” de Q11 es un factor valorable desde el punto de vista de una posible aproximación terapéutica dada la muerte retrógrada de neuronas en la EP y lo avanzado de la enfermedad cuando el paciente es diagnosticado.

4.1.3 Toxicidad, neuroprotección y neuroregeneración in vivo

En el protocolo utilizado para la evaluación in vivo, el régimen de administración del quelante, antes y después de la intoxicación, no permite distinguir o atribuir al quelante efectos de protección o regeneración distintamente. El resultado es evaluado al final del experimento una vez sacrificados los animales y su efecto benéfico es una combinación de una posible adaptación previa de los niveles de Fe que minimiza los niveles de daño inicial y un posible efecto posterior que mejora el tono redox celular y permite una más rápida recuperación. Se descarta algún grado de toxicidad dopaminérgica de Q11 por no verse afectada la cantidad de células TH-positivas en la SNc ni la densidad de fibras TH-positivas en el cuerpo estriado respecto el grupo control (Figura 11A y 12.A). Esto, esta se acuerdo con lo encontrado en otros trabajos con las 8-hidroxiquinolinas M30, Q1 y

VAR tanto en menores y mayores dosis (0,1-20 mg/kg) (Gal y col., 2010; Bar-am y col., 2015; Mena y col., 2015). El hallazgo de pruebas de protección por la administración oral de Q11 previa y post intoxicación con MPTP sugiere que el quelante es absorbido a través de la mucosa intestinal y que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Gal y col., 2010; Mena y col., 2015), a diferencia de lo hallado con quelantes de mayor peso molecular como DFO. Este último es impermeable al epitelio intestinal, a la membrana plasmática y a la barrera hematoencefálica, lo que limita su acción a la quelación de Fe a nivel sistémico mediante inyección i.p. Al mismo tiempo es posible especular que el efecto quelante de Q11 es leve y no afecta excesivamente la disponibilidad de Fe, factor que también puede generar neurodegeneración (Matak y col., 2016). En esta línea cabe destacar que el Fe capaz de inducir ROS, el llamado LIP, representa una fracción pequeña del Fe total que dispone la célula almacenado (~2 %) (Kakhlon y col., 2002). Por tanto, su aumento a niveles dañinos no necesariamente representaría un aumento significativo del Fe total, y al mismo tiempo podría ser manejado por una concentración moderada de un quelante débil como Q11, sin perjuicio de la disponibilidad de Fe fisiológico.

De este modo, la actividad quelante de Q11 sería capaz de contener el aumento de Fe inducido por la intoxicación con MPTP, gatillada probablemente por el aumento del transportador de entrada de Fe DMT1 (Salazar y col., 2008), que sobrepasa la capacidad tampón de proteínas almacenadoras de Fe como ferritina. La disminución de la marca de 4-HNE en el tejido correspondiente a la SNc indica que Q11 está disminuyendo la generación ROS, similarmente a lo encontrado en las células SH-SY5Y con la

generación de 8-OHdG. Todo esto, presumiblemente, al evitar la disponibilidad del Fe lábil para reaccionar y generar el radical hidroxilo.

Es posible especular, como se ha observado con otros quelantes, que Q11, además de inhibir el daño oxidativo, actúe de forma protectora mediante la activación de genes antioxidantes y de sobrevida. Esto ocurriría mediante la quelación de Fe y la subyacente inactivación de las Prolil Hidroxilasas (PHDs) dependientes de Fe del factor inducible por hipoxia 1α (HIF 1α) que hidroxilan HIF 1α para su posterior degradación. Al disminuir el Fe, la disminución de la actividad de las PHDs genera la acumulación de HIF 1α y en consecuencia su translocación al núcleo y posterior inducción de sus genes blancos (Speer y col., 2012). Entre estos genes destacan VEGF, EPO1, iNOS, GLUT 1, que han sido indicados como genes pro-sobrevida en este contexto (Kupersmidt y col., 2011). Más aún, estudios in vivo con la administración del quelante M30 han encontrado inducción de otros genes pro-sobrevida y antioxidantes tales como BDNF, GDNF, SOD1, CAT y GPx (Kupersmidt y col., 2012). A su vez el efecto neuroprotector de HIF 1α ha sido demostrado en el modelo de intoxicación con MPTP utilizando inhibidores de las PHDs (Lee y col., 2009).

En resumen, el efecto de Q11 podría ir más allá de su actividad de quelar hierro y reducir el daño oxidativo generado por su exceso y la consecuente generación del radical hidroxilo. Podría, además, inducir vías de señalización de sobrevida y de aumento de la capacidad antioxidante.

4.2 Relevancia

Las posibilidades terapéuticas actuales de la cual disponen los pacientes de EP son bastantes limitadas. El tratamiento con L-DOPA significó un cambio radical en la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la eficacia de este tratamiento termina por decaer en el tiempo y la neurodegeneración persiste. Esto mismo es válido para otros medicamentos cuyo efecto es el de suplementar el déficit de dopamina de algún modo, tales como inhibidores de la MAO-B y la catecol-O-metil-transferasa (COMT) (que disminuyen su degradación), agonistas de los receptores de DA (que imitan su acción), o anti-colinérgicos (que compensan la falta de dopamina). Por esto la búsqueda de un medicamento capaz de revertir o por lo menos detener el daño ya causado en el proceso neurodegenerativo es una materia relevante.

En particular los quelantes de Fe han demostrado ejercer protección en modelos de EP y recientemente en estudios clínicos con pacientes (Devos y col., 2014). Los mecanismos exactos de este efecto deberán ser dilucidados en un futuro y serán claves para determinar el mejor diseño terapéutico, la posibilidad de proteger o incluso inducir regeneración en las zonas dañadas. Por otro lado, la investigación en relación al rol de la acumulación de Fe como causa o consecuencia de la enfermedad y su dinámica en los diferentes tipos celulares del sistema nervioso también contribuirán al entendimiento del proceso neurodegenerativo y abrirán nuevos horizontes terapéuticos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Q11 queló Fe^{+2} en solución y evitó la producción del radical hidroxilo
- En células SH-SY5Y, Q11 permeó la membrana celular y queló Fe en el citoplasma, pero no en las mitocondrias.
- Q11 protegió células SH-SY5Y contra la generación de daño oxidativo.
- Q11 indujo la recuperación del árbol neurítico de neuronas dopaminérgicas previamente tratadas con la neurotoxina MPP+.
- La administración oral de Q11 disminuyó la pérdida de neuronas y de fibras TH-positivas en ratones intoxicados con MPTP.

Los datos obtenidos en este seminario indican que Q11 es un quelante de Fe de baja afinidad capaz de evitar la producción del radical hidroxilo; sugiriendo que los efectos neuroprotectores mostrados por Q11 están mediados por su capacidad de secuestrar el exceso de Fe celular y en consecuencia disminuir el daño oxidativo, sin descartar posibles efectos neuroprotectores y neuroregenerativos subyacentes a la actividad quelante de Fe.

REFERENCIAS

- Aguirre, P., Mena, N. P., Carrasco, C. M., Muñoz, Y., Pérez-Henríquez, P., Morales, R. A., Cassels, B. K., Méndez-Gálvez, C., García-Beltrán, O., González-Billault, C., & Núñez, M. T. (2015). Iron Chelators and Antioxidants Regenerate Neuritic Tree and Nigrostriatal Fibers of MPP+/MPTP-Lesioned Dopaminergic Neurons. *PLoS One*, *10*(12), e0144848. doi: 10.1371/journal.pone.0144848
- Bar-Am, O., Amit, T., Kupershmidt, L., Aluf, Y., Mechlovich, D., Kabha, H., Danovitch, L., Zurawski, V. R., Youdim, M. B. H., & Weinreb, O. (2015). Neuroprotective and neurorestorative activities of a novel iron chelator-brain selective monoamine oxidase-A/monoamine oxidase-B inhibitor in animal models of Parkinson's disease and aging. *Neurobiology of Aging*, *36*(3), 1529-1542. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.026
- Bedford, M. R., Ford, S. J., Horniblow, R. D., Iqbal, T. H., & Tselepis, C. (2013). Iron chelation in the treatment of cancer: a new role for deferasirox? *J Clin Pharmacol*, *53*(9), 885-891. doi: 10.1002/jcph.113
- Berg, D., Grote, C., Rausch, W. D., Mäurer, M., Wesemann, W., Riederer, P., & Becker, G. (1999). Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, *25*(6), 901-904.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, *20*(4), 415-455.
- Bisaglia, M., Tessari, I., Mammi, S., & Bubacco, L. (2009). Interaction between alpha-synuclein and metal ions, still looking for a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med*, *11*(4), 239-251. doi: 10.1007/s12017-009-8082-1
- Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M. D., Del Vecchio, G. C., Romeo, M. A., Forni, G. L., Gamberini, M. R., Ghilardi, R., Piga, A., & Cnaan, A. (2004). Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica*, *89*(10), 1187-1193.
- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*. doi: 10.1111/jnc.13731
- Breuer, W., Epsztejn, S., & Cabantchik, Z. I. (1996). Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells. *FEBS Lett*, *382*(3), 304-308.
- Brubacher, J. L., & Bols, N. C. (2001). Chemically de-acetylated 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods*, *251*(1-2), 81-91.
- Burke, R. E., & O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, *246*, 72-83. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.011
- Buss, J. L., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2003). The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem*, *10*(12), 1021-1034.
- Bussell, R., & Eliezer, D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J Biol Chem*, *276*(49), 45996-46003. doi: 10.1074/jbc.M106777200
- Calabrese, V. P. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, *69*(2), 223-224; author reply 224. doi: 10.1212/01.wnl.0000271777.50910.73
- Castellani, R. J., Siedlak, S. L., Perry, G., & Smith, M. A. (2000). Sequestration of iron by Lewy

- bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 100(2), 111-114.
- Crichton, R. R., Dexter, D. T., & Ward, R. J. (2011). Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *J Neural Transm (Vienna)*, 118(3), 301-314. doi: 10.1007/s00702-010-0470-z
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703(2), 93-109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluzza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J. C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z. I., & Bordet, R. (2014). Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 21(2), 195-210. doi: 10.1089/ars.2013.5593
- Dexter, D. T., Statton, S. A., Whitmore, C., Freinbichler, W., Weinberger, P., Tipton, K. F., Della Corte, L., Ward, R. J., & Crichton, R. R. (2011). Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration. *J Neural Transm (Vienna)*, 118(2), 223-231. doi: 10.1007/s00702-010-0531-3
- Dexter, D. T., Wells, F. R., Lees, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 52(6), 1830-1836.
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*, 10(1), 9-17. doi: 10.1038/nchembio.1416
- Dorey, C., Cooper, C., Dickson, D. P., Gibson, J. F., Simpson, R. J., & Peters, T. J. (1993). Iron speciation at physiological pH in media containing ascorbate and oxygen. *Br J Nutr*, 70(1), 157-169.
- Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., & Cabantchik, I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem*, 248(1), 31-40.
- Farrer, L., Christensen, H., Leach, L. S., Griffiths, K. M., & Jorm, A. F. (2006). Age differences in mental health literacy. *Acta Neuropsychiatr*, 18(6), 285-286. doi: 10.1017/s092427080003115x
- François, C., Yelnik, J., Tandé, D., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1999). Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *J Comp Neurol*, 414(3), 334-347.
- Gal, S., Zheng, H., Fridkin, M., & Youdim, M. B. (2010). Restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP treatment by the novel multifunctional brain-permeable iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drug, M30. *Neurotox Res*, 17(1), 15-27. doi: 10.1007/s12640-009-9070-9
- German, D. C., Manaye, K., Smith, W. K., Woodward, D. J., & Saper, C. B. (1989). Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol*, 26(4), 507-514. doi: 10.1002/ana.410260403
- Gibbs, C. R. (1976). Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Analytical Chemistry* 48 (8), 1197-1201.
- Gille, G., Hung, S. T., Reichmann, H., & Rausch, W. D. (2004). Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1018, 533-540. doi: 10.1196/annals.1296.066
- Gispert, S., Brehm, N., Weil, J., Seidel, K., Rüb, U., Kern, B., Walter, M., Roeper, J., & Auburger, G. (2015). Potentiation of neurotoxicity in double-mutant mice with Pink1 ablation and A53T-SNCA overexpression. *Hum Mol Genet*, 24(4), 1061-1076. doi:

10.1093/hmg/ddu520

- Gómez, F. J., Aguirre, P., Gonzalez-Billault, C., & Núñez, M. T. (2011). Iron mediates neuritic tree collapse in mesencephalic neurons treated with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *J Neural Transm (Vienna)*, *118*(3), 421-431. doi: 10.1007/s00702-010-0489-1
- Gorell, J. M., Ordidge, R. J., Brown, G. G., Deniau, J. C., Buderer, N. M., & Helpner, J. A. (1995). Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology*, *45*(6), 1138-1143.
- Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., & Eaton, J. W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem*, *259*(6), 3620-3624.
- Graumann, R., Paris, I., Martinez-Alvarado, P., Rumanque, P., Perez-Pastene, C., Cardenas, S. P., Marin, P., Diaz-Grez, F., Caviedes, R., Caviedes, P., & Segura-Aguilar, J. (2002). Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Pol J Pharmacol*, *54*(6), 573-579.
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A. M., Beinis, J. Y., Gallinari, C., Meaume, S., Piette, F., Hauw, J. J., & Duyckaerts, C. (2006). Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol*, *63*(4), 584-588. doi: 10.1001/archneur.63.4.584
- Hare, D. J., Adlard, P. A., Doble, P. A., & Finkelstein, D. I. (2013). Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Metallomics*, *5*(2), 91-109. doi: 10.1039/c2mt20164j
- Hare, D. J., & Double, K. L. (2016). Iron and dopamine: a toxic couple. *Brain*, *139*(Pt 4), 1026-1035. doi: 10.1093/brain/aww022
- He, Y., Thong, P. S., Lee, T., Leong, S. K., Mao, B. Y., Dong, F., & Watt, F. (2003). Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys. *Free Radic Biol Med*, *35*(5), 540-547.
- Hernández-Vargas, R., Fonseca-Ornelas, L., López-González, I., Riesgo-Escovar, J., Zurita, M., & Reynaud, E. (2011). Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease Drosophila model. *Genesis*, *49*(5), 392-402. doi: 10.1002/dvg.20740
- Hider, R. C., & Kong, X. (2013). Iron: effect of overload and deficiency. *Met Ions Life Sci*, *13*, 229-294. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8_8
- Hider, R. C., Roy, S., Ma, Y. M., Le Kong, X., & Preston, J. (2011). The potential application of iron chelators for the treatment of neurodegenerative diseases. *Metallomics*, *3*(3), 239-249. doi: 10.1039/c0mt00087f
- Hirsch, E. C., Brandel, J. P., Galle, P., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1991). Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem*, *56*(2), 446-451.
- Hökfelt, T., & Ungerstedt, U. (1973). Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. *Brain Res*, *60*(2), 269-297.
- Kakhlon, O., & Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med*, *33*(8), 1037-1046.
- Kaur, D., & Andersen, J. (2004). Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev*, *3*(3), 327-343. doi: 10.1016/j.arr.2004.01.003
- Kell, D. B. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*, *2*, 2. doi: 10.1186/1755-8794-2-2

- Kempster, P. A., Hurwitz, B., & Lees, A. J. (2007). A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology*, *69*(5), 482-485. doi: 10.1212/01.wnl.0000266639.50620.d1
- Kupersmidt, L., Amit, T., Bar-Am, O., Youdim, M. B., & Weinreb, O. (2012). Neuroprotection by the multitarget iron chelator M30 on age-related alterations in mice. *Mech Ageing Dev*, *133*(5), 267-274. doi: 10.1016/j.mad.2012.03.001
- Kupersmidt, L., Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Bar-Am, O., & Youdim, M. B. (2011). Novel molecular targets of the neuroprotective/neurorescue multimodal iron chelating drug M30 in the mouse brain. *Neuroscience*, *189*, 345-358. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.040
- Langston, J. W. (1996). The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology*, *47*(6 Suppl 3), S153-160.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, *219*(4587), 979-980.
- Li, W., Jiang, H., Song, N., & Xie, J. (2011). Oxidative stress partially contributes to iron-induced α -synuclein aggregation in SK-N-SH cells. *Neurotox Res*, *19*(3), 435-442. doi: 10.1007/s12640-010-9187-x
- Ma, Y., Dhawan, V., Mentis, M., Chaly, T., Spetsieris, P. G., & Eidelberg, D. (2002). Parametric mapping of [18F]FPCIT binding in early stage Parkinson's disease: a PET study. *Synapse*, *45*(2), 125-133. doi: 10.1002/syn.10090
- Marrugo-Gonzales, A. J., Orlov, V. D., & Fernandez-Maestre, E. R. (2012). Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Chalcones: Trans configuration, intramolecular hydrogen bonds, bromination and antifungal activity. *J. Chil. Chem. Soc.*, *57*(3), 1287-1293.
- Matak, P., Matak, A., Moustafa, S., Aryal, D. K., Benner, E. J., Wetsel, W., & Andrews, N. C. (2016). Disrupted iron homeostasis causes dopaminergic neurodegeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, *113*(13), 3428-3435. doi: 10.1073/pnas.1519473113
- McNaught, K. S., & Olanow, C. W. (2006). Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *60*(2), 243-247. doi: 10.1002/ana.20936
- Mena, M. A., & de Yébenes, J. G. (2006). Drug-induced parkinsonism. *Expert Opin Drug Saf*, *5*(6), 759-771. doi: 10.1517/14740338.5.6.759
- Motekaitis, R. J., & Martell, A. E. (1991). Stabilities of the iron chelates of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone and related ligands. *Inorg. Chim. Acta*, *183*, 71-78.
- Muñoz, Y., Carrasco, C. M., Campos, J. D., Aguirre, P., & Núñez, M. T. (2016). Parkinson's Disease: The Mitochondria-Iron Link. *Parkinsons Dis*, *2016*, 7049108. doi: 10.1155/2016/7049108
- Niu, Y., Guo, X., Chen, Y., Wang, C. E., Gao, J., Yang, W., Kang, Y., Si, W., Wang, H., Yang, S. H., Li, S., Ji, W., & Li, X. J. (2015). Early Parkinson's disease symptoms in α -synuclein transgenic monkeys. *Hum Mol Genet*, *24*(8), 2308-2317. doi: 10.1093/hmg/ddu748
- Núñez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., & Salazar, J. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, *25*(4), 761-776. doi: 10.1007/s10534-012-9523-0
- Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *348*(14), 1356-1364. doi: 10.1056/NEJM2003ra020003
- Ostrerova-Golts, N., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, J. M., Farer, M., & Wolozin, B. (2000). The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J Neurosci*, *20*(16), 6048-6054.
- Papapetropoulos, S., Adi, N., Ellul, J., Argyriou, A. A., & Chroni, E. (2007). A prospective study of familial versus sporadic Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, *4*(6), 424-427. doi: 10.1159/000107702

- Parent, M., & Parent, A. (2010). Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *Can J Neurol Sci*, 37(3), 313-319.
- Petrat, F., Weisheit, D., Lensen, M., de Groot, H., Sustmann, R., & Rauen, U. (2002). Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J*, 362(Pt 1), 137-147.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L. M., Nuñez, M. T., Garrick, M. D., Raisman-Vozari, R., & Hirsch, E. C. (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(47), 18578-18583. doi: 10.1073/pnas.0804373105
- Sanchez, M., Gastaldi, L., Remedi, M., Cáceres, A., & Landa, C. (2008). Rotenone-induced toxicity is mediated by Rho-GTPases in hippocampal neurons. *Toxicol Sci*, 104(2), 352-361. doi: 10.1093/toxsci/kfn092
- Schaur, R. J., Siems, W., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2015). 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules*, 5(4), 2247-2337. doi: 10.3390/biom5042247
- Schuff, N. (2009). Potential role of high-field MRI for studies in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24 Suppl 2, S684-690. doi: 10.1002/mds.22647
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., & Nagano, T. (2003). Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*, 278(5), 3170-3175. doi: 10.1074/jbc.M209264200
- Siddiq, A., Ayoub, I. A., Chavez, J. C., Aminova, L., Shah, S., LaManna, J. C., Patton, S. M., Connor, J. R., Cherny, R. A., Volitakis, I., Bush, A. I., Langsetmo, I., Seeley, T., Gunzler, V., & Ratan, R. R. (2005). Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system. *J Biol Chem*, 280(50), 41732-41743. doi: 10.1074/jbc.M504963200
- Smirnova, N. A., Rakhman, I., Moroz, N., Basso, M., Payappilly, J., Kazakov, S., Hernandez-Guzman, F., Gaisina, I. N., Kozikowski, A. P., Ratan, R. R., & Gazaryan, I. G. (2010). Utilization of an in vivo reporter for high throughput identification of branched small molecule regulators of hypoxic adaptation. *Chem Biol*, 17(4), 380-391. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.008
- Speer, R. E., Karuppagounder, S. S., Basso, M., Sleiman, S. F., Kumar, A., Brand, D., Smirnova, N., Gazaryan, I., Khim, S. J., & Ratan, R. R. (2013). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free Radic Biol Med*, 62, 26-36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.026
- Steiger, T. K., Weiskopf, N., & Bunzeck, N. (2016). Iron Level and Myelin Content in the Ventral Striatum Predict Memory Performance in the Aging Brain. *J Neurosci*, 36(12), 3552-3558. doi: 10.1523/jneurosci.3617-15.2016
- Sumantran, V. N. (2011). Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol*, 731, 219-236. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_19
- Thomas, F., Serratrice, G., Béguin, C., Aman, E. S., Pierre, J. L., Fontecave, M., & Laulhère, J. P. (1999). Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells. *J Biol Chem*, 274(19), 13375-13383.
- Trojanowski, J. Q. (2003). Rotenone neurotoxicity: a new window on environmental causes of Parkinson's disease and related brain amyloidoses. *Exp Neurol*, 179(1), 6-8.
- Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ*, 4(6), 429-434. doi: 10.1038/sj.cdd.4400262
- Turnquist, T. D., & Shndell, I. B. (1968). Stability constants of iron(III)-8-Hydroxyquinoline

- complexes. *Analytica Chimica Acta*, 239-245.
- Uhl, L., Gerstel, A., Chabaliier, M., & Dukan, S. (2015). Hydrogen peroxide induced cell death: One or two modes of action? *Heliyon*, 1(4), e00049. doi: 10.1016/j.heliyon.2015.e00049
- Um, J. W., Im, E., Lee, H. J., Min, B., Yoo, L., Yoo, J., Lübbert, H., Stichel-Gunkel, C., Cho, H. S., Yoon, J. B., & Chung, K. C. (2010). Parkin directly modulates 26S proteasome activity. *J Neurosci*, 30(35), 11805-11814. doi: 10.1523/jneurosci.2862-09.2010
- Watabe, M., & Nakaki, T. (2004). Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(3), 948-953. doi: 10.1124/jpet.104.071381
- Wu, D. C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6145-6150. doi: 10.1073/pnas.0937239100
- Xie, Y., & Chen, Y. (2016). microRNAs: Emerging Targets Regulating Oxidative Stress in the Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci*, 10, 298. doi: 10.3389/fnins.2016.00298
- Zheng, H., Weiner, L. M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z. I., Warshawsky, A., Youdim, M. B., & Fridkin, M. (2005). Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorg Med Chem*, 13(3), 773-783. doi: 10.1016/j.bmc.2004.10.037