

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Química Analítica y Físicoquímica
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular
(IBIMOL-CONICET)
Cátedra de Físicoquímica

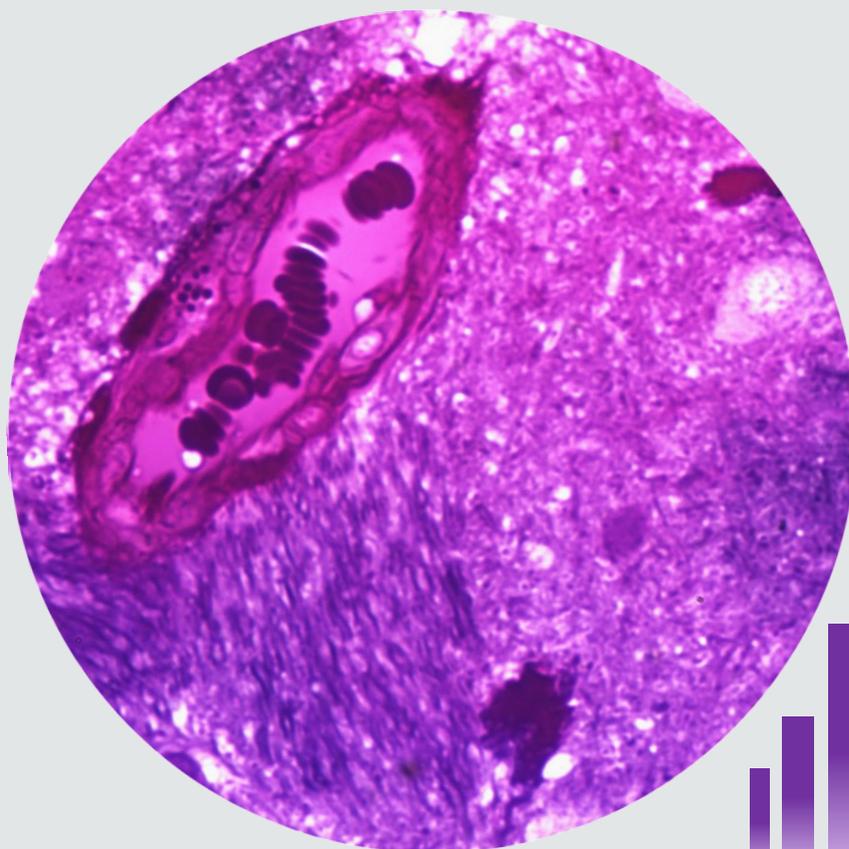


IBIMOL

Tesis de Doctorado

**SOBRECARGA DE HIERRO: EFECTO SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN CEREBRO DE RATA**

Lic. Natacha E. Piloni



Directora: Dra. Susana Puntarulo

Quiero agradecer especialmente a mi directora Dra. Susana Puntarulo por haber dirigido este trabajo, por su guía, por la paciencia, por los consejos y por el tiempo dedicado en cada etapa de esta tesis.

Al Dr. César Fraga por haberme permitido doctorarme en esta honorable casa de estudios.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Farmacia y Bioquímica, al Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme brindado un lugar para trabajar y continuar mi formación profesional.

Agradezco especial y profundamente a las Dras. Andrea Galatro, Gabriela Malanga y Elizabeth Robello por su ayuda invaluable, por su generosidad y amabilidad para compartir su experiencia y conocimiento conmigo, por sus enseñanzas, por la paciencia y tolerancia, por ayudarme siempre, tanto a nivel profesional como a nivel personal y por los buenos momentos compartidos.

A los integrantes del Laboratorio de Hipertensión Portal y Encefalopatía Hepática, especialmente Dr. Juan Carlos Perazzo por su ayuda, paciencia y dedicación, y a las Tcas. Silvia Caram y Silvia Fariña por la colaboración.

A la Dra. Virginia Fernández y al Dr. Luis Videla, por compartir parte de la enorme experiencia que poseen en el ámbito científico, y por el amable y cálido trato que han tenido siempre conmigo. También agradezco a la Lic. Romina Vargas por su gran ayuda.

A mis compañeros de laboratorio Biot. Julián Bonetto, Dra. Paula M. González, y Lic. Juan Manuel Ostera por el tiempo compartido y por hacer de mi lugar de trabajo un lugar agradable.

Gracias a todos mis compañeros y excompañeros, con los que he compartido innumerables momentos a lo largo de estos años: Ana Almeida, Lic. María Belén Aguiar, Dra. Silvia Alvarez, Bioq. Silvina Bombicino, Dra. Agustina Buet, Dra. Juanita Bustamante, Lic. Valeria Calabró, Mg. Cecilia Cimolai, Dra. Analía Czerniczyniec, Dra. Mónica Galleano, Gabriela Garavaglia, Bioq. Mariana Garcés, Bioq. Darío Iglesias, Dra. Analía Karadayian, Dra. Corina Litterio, Dra. Silvia Lorez Arnaiz, Nicolás López Goldemberg, Dra. Natalia Magnani, Dr. Timoteo Marchini, Dra. Bárbara Piotrkowski, Lic. Paula Prince, Dr. Iván Rousseau, Dra. Marcela Simontacchi, Dra. Laura Valdez, Dra. Virginia Vanasco y Dra. Tamara Zaobornyj.

Al Dr. Claudio Cervino, al Dr. Marcelo Hernando, y la Lic. Macarena Reiteri por los buenos momentos que pasamos trabajando juntos.

Al Dr. Andrés Caro por su colaboración.

A los bioteristas: Téc. Verónica Casanova, Téc. Diego Giaquinta Romero, Téc. Alma Kremmling y Téc. María Carola Romero por su ayuda y excelente predisposición para trabajar, siempre.

A mis amigos, mis “hermanos del alma”, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo. Estoy absolutamente agradecida de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir una persona muy afortunada. No hace falta que los nombre, ellos saben quienes son y lo importantes que son para mí y, aunque algunos están lejos, tengo la suerte de poder sentirme siempre acompañada.

A toda mi familia, por ser una fuente de apoyo constante e incondicional en mi vida: a Aldana y especialmente a mis hermanos, Tamara, quien es un verdadero ejemplo para mí, y Gabriel.

A Diego, por ser el principal responsable de que este trabajo llegara a buen puerto, estando incondicionalmente siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Le doy las gracias por todos los esfuerzos que ha hecho y por recordarme cada día que podía terminar este trabajo.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy sea una meta cumplida.

Y finalmente, pero en primer lugar en mi corazón, quiero agradecer a mis padres, *Marcela* (quien ya no está físicamente presente) y *Gabriel*, quienes me enseñaron que con trabajo, esfuerzo y constancia todo se consigue, quienes han sabido formarme con buenos sentimientos y valores, lo que me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles. Les agradezco su amor infinito, sacrificio y paciencia invaluable. Por todo eso y mucho más, *este trabajo también les pertenece*.

Los resultados presentados en esta tesis están parcialmente incluidos en los trabajos que se detallan a continuación:

Publicaciones periódicas con referato:

1.- Robello E., **Piloni N.**, Puntarulo S., 2012. γ - Irradiation effect on Fe content in developing neural precursor cells requires mother-fetus interaction. *Research Trends. Current Topics in Toxicology*. 8:82-93.

2.- Galatro A., Gonzalez P.M., Malanga G., Robello E., **Piloni N.E.**, Puntarulo S., 2013. Nitric oxide and membrane lipid peroxidation in photosynthetic and non-photosynthetic organisms under several stress conditions. Ed. Angel Catalá, *Front. Physiol.* Lausanne, Switzerland. 4:276. doi: 10.3389/fphys.2013.00276. *Frontiers in Membrane Physiology and Membrane Biophysics*.

3.- **Piloni N.E.**, Fernandez V., Videla L.A., Puntarulo S., 2013. Acute iron overload and oxidative stress in brain. *Toxicology*. 314: 174-182.

4.- **Piloni N.E.**, Perazzo, J.C., Fernandez V., Videla L.A., Puntarulo S., 2015. Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. Enviado a *Biometals* para su consideración para publicación.

Capitulo de libro:

5.- **Piloni N.E.** y Puntarulo S., 2010. Iron role in the oxidative metabolism of animal and plant cells. Effect of iron overload. En: *Metals in biology systems: Research Signpost*, Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, Ed. María Sofía Giménez, pp. 29-50. ISBN: 978-81-308-0426-2.

6.- Gonzalez P.M., **Piloni N.E.** y Puntarulo S. Iron overload and lipid peroxidation in biological systems. En *Lipid peroxidation*. Intech, Rijeka, Croatia. Ed. Angel Catalá, 2012. pp. 89-108. ISBN 978-953-51-0716-3. <http://dx.doi.org/10.5772/2929>

Resúmenes publicados:

1.- Robello E., **Piloni N.E.**, Puntarulo S., 2010. *Cellular Fe in fetal brain gamma-irradiated both in vivo and in vitro*. XXXIX Anual Meeting of the Argentinean Biophysical Society 2010. Workshop CeBEM-Structural Biology in Latin America. 3rd Latin American Protein

Society Meeting. Salta, Argentina, 12-16 Octubre. Publicado: Workshop CeBEM Latin American Protein Society Meeting, Abstract Book, vol 1, p.142. ISSN 978-987-26254-0-5.

2.- Robello E., **Piloni N.E.**, Puntarulo S., 2010. *Metabolismo del Fe en células de cerebro en desarrollo irradiadas in utero*. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Fisiología, XLII Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 17-20 Noviembre. Publicado: Medicina Buenos Aires, vol 70 (Supl.II), p.079. ISSN 0025-7680.

3.- Piloni N.E., Puntarulo S., 2011. *Alteraciones oxidativas asociadas al Fe en cerebro de rata*. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Buenos Aires, Argentina, 5-7 Diciembre. Publicado: XL SAB 2011, vol 2, p.216. ISSN 978-987-27591-0-0.

4.- Piloni N.E., Puntarulo S., 2012. *Sobrecarga aguda de Fe. Efecto sobre el metabolismo oxidativo en cerebro*. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LX Reunión Científica Anual Sociedad Argentina Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 14-17 Noviembre. Publicado: Medicina Buenos Aires, vol 72 (Supl.II), p.214. ISSN 0025-7680.

5.- Reiteri M., **Piloni N.E.**, Hernando M., Cervino C.O., Puntarulo S., 2013. *Sobrecarga aguda de Fe: Efecto sobre la capacidad antioxidante en áreas cerebrales de rata*. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 20-23 Noviembre. Publicado: Medicina Buenos Aires, vol 73 (Supl.III), p.287, 2013. ISSN 0025-7680.

6.- Piloni N.E., Puntarulo S., 2014. *Efecto del pretratamiento con Fe sobre el daño oxidativo dependiente de clorpromazina en cerebro de rata*. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 19-22 Noviembre. Publicado: Medicina Buenos Aires, vol 74 (Supl.III), p.124, 2014. ISSN 0025-7680 (impresa) ISSN 1669-9106 (en línea).

Abreviaturas

- A[•]: radical ascorbilo
- A: absorbancia
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AH⁻: ascorbato
- AO: ascorbato oxidasa
- AP-1: proteína activadora 1
- ApoTf: apotransferrina
- APP: proteína productora de amiloide
- ATP: adenosina trifosfato
- B^o: campo magnético externo
- BCECs: células del endotelio capilar del cerebro
- BSA: seroalbúmina bovina
- BTH: butilhidroxitolueno
- CA: calceína
- CA₁: fracción de calceína libre fluorescente
- CA-Fe: calceína unida a Fe
- CAT: catalasa
- Cit: citocromo
- CPZ: clorpromazina
- CuZn-SOD: superóxido dismutasa que contienen cobre y cinc
- DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato
- DcytB: reductasa duodenal
- DF: mesilato de deferroxamina
- DHA: dehidroascorbato
- DHAR: dehidroascorbato reductasa
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMT1: transportador de metales divalentes tipo 1
- DNIC: dinitrosil complejos de Fe
- DTNB: 5, 5'-dithio-bis (2nitrobenzoic acid)
- e⁻: electrón
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- EH: Enfermedad de Huntington
- EP: Enfermedad de Parkinson
- EPR: resonancia paramagnética electrónica
-

F₁: valor mínimo estable de fluorescencia
F₂: valor máximo estable de fluorescencia
Fe₁: fracción de Fe libre, no unido a calceína
Fpn: ferroportina
Ft: ferritina
GPx: glutatión peroxidasa
GSH: forma reducida del glutatión
GSSG: forma oxidada del glutatión
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
Hb: hemoglobina
HE: hematoxilina-eosina
HPLC: cromatografía líquida de alta performance
HR: compuestos orgánicos
IL-1β: interleuquina-1 beta
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
ip: intraperitoneal
IR: isquemia reperfusión
K_d: constante de disociación
LIP: *pool* de Fe lábil
LPS: lipopolisacárido de endotoxemia
MDA: malondialdehído
MDAR: monodehidroascorbato reductasa
MNIC: mononitrosil complejos de Fe
MnSOD: superóxido dismutasa que contiene manganeso
MOAR: microscopía óptica de alta resolución
MPA: ácido metafosfórico
N₂: nitrógeno
NADH: forma reducida de la dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH: forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBIA: enfermedades llamadas colectivamente “neurodegeneración con acumulación de Fe en el cerebro.
NF-κB: factor nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NP-40: nonidet P-40
Nrf2: factor eritroide redox sensible nuclear 2

O₂: oxígeno
O₂^{•-}: anión superóxido
OH⁻: anión hidroxilo
•OH: radical hidroxilo
ONOO⁻: peroxinitrito
PBN: N-t-butil-α-fenil nitrona
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PF: peso fresco
PGE2: prostaglandina E2
PMSF: fluoruro de fenilmetiltiosulfonilo
PS: peso seco
R[•]: radical alquilo
RA[•]: aducto paramagnético estable
RI[•]: radical libre
RL[•]: radical lipídico
RNS: especies reactivas del nitrógeno
RO[•]: radical alcohoxilo
ROO[•]: radical peroxilo
ROOH: peróxidos orgánicos
ROS: especies reactivas del oxígeno
RTf: receptor de transferrina
RTf1: receptor de transferrina 1
SDS: dodecil sulfato de sodio
SNC: sistema nervioso central
SOD: superóxido dismutasa
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEMPO: 2,2,5,5-tetrametil piperidina 1-oxilo
Tf: transferrina
Tf-RTf: complejo transferrina-receptor de transferrina
TGA: ácido tioglicólico
TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa
UA: unidades arbitrarias
UF: unidades de fluorescencia
XO: xantina oxidasa

α -T: alfa-tocoferol

α -T[•]: radical α -tocoferol, forma oxidada del antioxidante α -tocoferol

[A[•]]_{ee}: concentración de radical ascorbilo en estado estacionario

[Fe-S]: clusters Fe-S

ΔF : incremento fraccional de la fluorescencia

¹O₂: oxígeno singulete

1.- Introducción	Página
1.1- Radicales libres	1
1.2- Fuentes celulares de generación de RI^\bullet	1
1.3- Protección enzimática antioxidante	2
1.3.1- Catalasa (CAT)	2
1.3.2- Superóxido dismutasa (SOD)	3
1.3.3- Glutación peroxidasa (GPx)	3
1.4- Protección antioxidante no enzimática	4
1.4.1- Ascorbato (AH^\cdot)	4
1.4.2- Glutación	5
1.5- Estrés oxidativo	5
1.6- Metabolismo del Fe	6
1.6.1- Reacciones celulares en las que participa el Fe	6
1.6.2- Ingreso y almacenamiento de Fe en el organismo	8
1.6.3- Importancia del Fe en el SNC	14
1.6.4- Modelos de sobrecarga de Fe	17
1.7- ROS y activación de vías de señalización	20
1.8- Espectroscopía de Resonancia Paramagnética	25
1.9- Hipótesis y Objetivos	29
2.- Materiales y Métodos	
2.1- Modelos experimentales	31
2.1.1- Modelo de sobrecarga aguda de Fe	31
2.1.2- Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe	31
2.1.3- Modelo de sobrecarga aguda de Fe y LPS	32
2.1.4- Modelo para sobrecarga subcrónica de Fe y LPS	33
2.1.5- Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe y CPZ	34
2.1.6- Obtención de áreas cerebrales	35
2.2- Caracterización de la distribución de Fe en cerebro	36
2.2.1- Determinación del contenido total de Fe	36
2.2.2- Determinación del LIP	36
2.3- Ensayos específicos	39
2.3.1- Detección de A^\bullet por EPR	39
2.3.2- Determinación del contenido de AH^\cdot	39
2.3.3- Detección de la velocidad de generación de RL^\bullet por EPR	39
2.3.4- Contenido de TBARS	40

2.3.5- Actividad de la enzima SOD	40
2.3.6- Actividad de la enzima CAT	42
2.3.7- Contenido de α -T	42
2.3.8- Obtención de proteínas citosólicas y nucleares	42
2.3.9- Ensayo de unión de NF- κ B a ADN	43
2.3.10- Determinación de la velocidad de oxidación de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)	43
2.3.11- Evaluación de daño al ADN nuclear y mitocondrial mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa	43
2.3.12- Histopatología	44
2.3.13- Determinación de tioles totales	44
2.3.14- Determinación del contenido de proteínas	44
2.4- Análisis estadístico	45
2.5- Reactivos	45
2.6- Instrumental	45

3.- Resultados

3.1- Caracterización del metabolismo oxidativo del cerebro	
3.1.1- Caracterización de la determinación del contenido de Fe total en cerebro de rata mediante mineralización ácida	47
3.1.2- Caracterización de la determinación del contenido de LIP en cerebro de rata	48
3.1.3- Caracterización de la determinación de la actividad de CAT en cerebro de rata	50
3.1.4- Caracterización de la determinación de la actividad de SOD en cerebro de rata	52
3.1.5- Caracterización de la determinación del contenido de A^{\bullet} en cerebro de rata	53
3.1.6- Caracterización de la determinación de la velocidad de generación de RL^{\bullet} en cerebro de rata	54
3.1.7- Caracterización de la determinación de la velocidad de oxidación de DCFH-DA en cerebro de rata	56
3.1.8- Caracterización de la determinación del contenido de AH^{\bullet} en cerebro de rata	56
3.1.9- Caracterización de la determinación de daño a ADN nuclear y mitocondrial en cerebro de rata	57

3.1.10- Caracterización de la determinación de tioles totales en cerebro de rata	59
3.2- Modelo de sobrecarga aguda de Fe	
3.2.1- Determinación del contenido de Fe total	61
3.2.2- Determinación del contenido de LIP	61
3.2.3- Determinación de la velocidad de oxidación de DCFH-DA	62
3.2.4- Determinación de A [•]	63
3.2.5- Determinación del contenido de AH [•]	63
3.2.6- Determinación del índice A [•] /AH [•]	63
3.2.7- Determinación de daño celular mediante histología	64
3.2.8- Determinación de la generación de RL [•] por EPR	66
3.2.9- Determinación del contenido de TBARS	66
3.2.10- Determinación de α-T	67
3.2.11- Determinación de los índices RL [•] /α-T y TBARS/α-T	67
3.2.12- Unión de NF-κB a ADN	67
3.2.13- Determinación de la actividad de CAT	68
3.2.14- Determinación de la integridad de ADN nuclear y mitocondrial por PCR	69
3.2.15- Contenido de Fe total en áreas cerebrales	70
3.2.16- Determinación de la generación de RL [•] en áreas cerebrales	72
3.2.17- Determinación de la actividad de CAT en áreas cerebrales	72
3.2.18- Determinación del contenido de tioles totales en áreas cerebrales	73
3.2.19- Determinación del contenido de α-T en áreas cerebrales	74
3.2.20- Determinación del índice RL [•] /α-T en áreas cerebrales	75
3.2.21- Determinación del índice A [•] /AH [•] en áreas cerebrales	76
3.3-Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe	
3.3.1- Determinación del contenido de Fe total en cerebro	79
3.3.2- Determinación del contenido de LIP	81
3.3.3- Determinación de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA	81
3.3.4- Determinación del índice A [•] /AH [•]	82
3.3.5- Determinación de la generación de RL [•] por EPR	83
3.3.6- Determinación del índice RL [•] /α-T	84
3.3.7- Determinación de la actividad de SOD	85
3.3.8- Determinación de la actividad de CAT	86
3.3.9- Unión de NF-κB a ADN	87

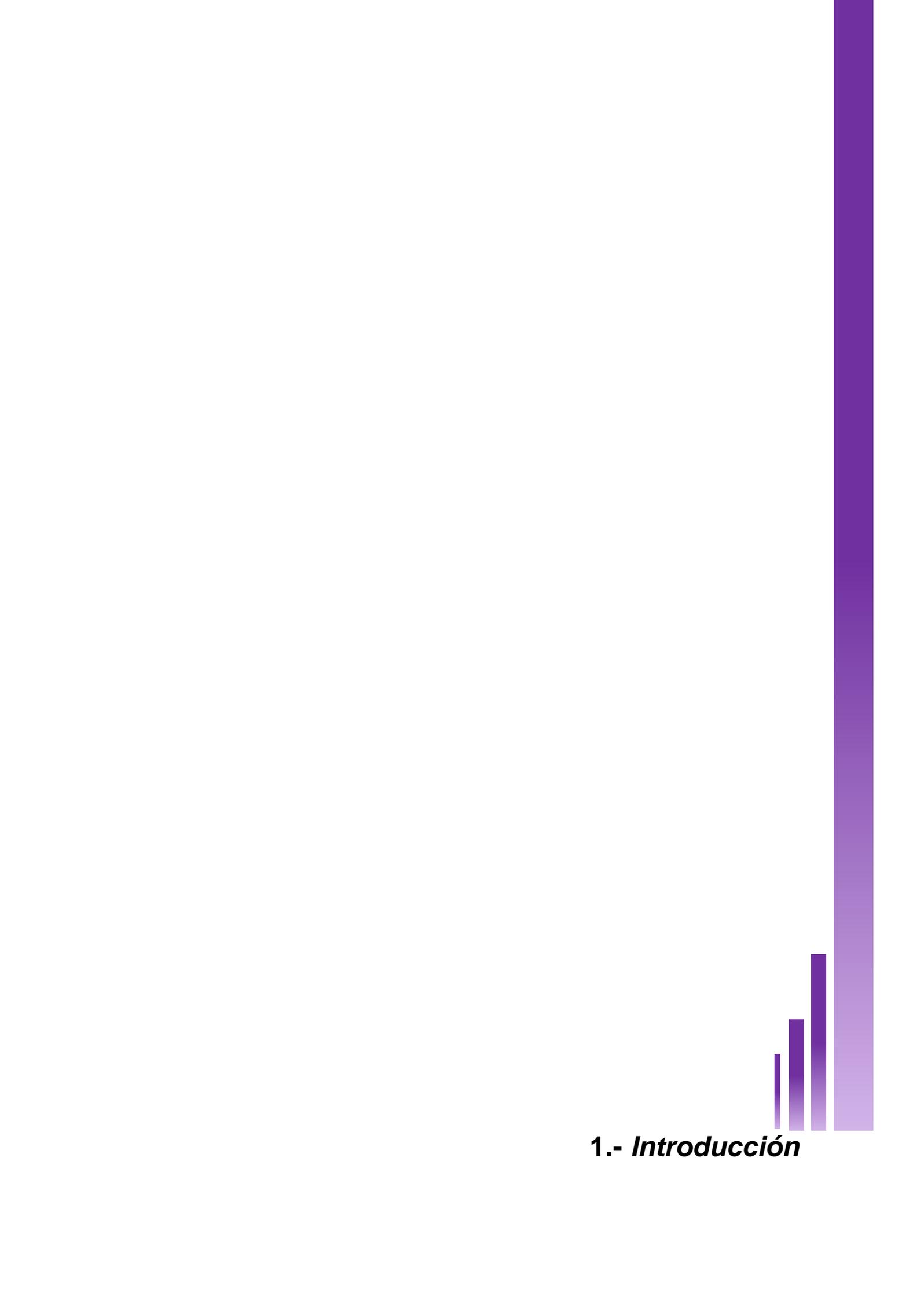
3.3.10- Determinación de la integridad de ADN nuclear y mitocondrial mediante PCR cuantitativa	87
3.3.11- Contenido de Fe total en áreas cerebrales	88
3.3.12- Determinación de la actividad de CAT en áreas cerebrales	90
3.4- Sobrecarga de Fe como factor modificador de la respuesta a la exposición a estrés oxidativo o nitrosativo	
3.4.1- Exposición a LPS de animales sometidos a sobrecarga aguda con Fe	92
3.4.1.1- Determinación del contenido de Fe total	92
3.4.1.2- Determinación del contenido de A [•]	92
3.4.2- Exposición a LPS de animales sometidos a sobrecarga subcrónica de Fe	94
3.4.2.1- Determinación del contenido de Fe total	94
3.4.2.2- Determinación del contenido de A [•]	95
3.4.2.3- Determinación del contenido de AH [•]	96
3.4.2.4- Determinación del índice A [•] /AH [•]	97
3.4.2.5- Determinación del contenido de TBARS	97
3.4.3- Modelo de tratamiento con CPZ en animales sometidos a una sobrecarga subcrónica con Fe	98
3.4.3.1- Velocidad de generación de RL [•]	98
3.4.3.2- Determinación de la actividad de CAT	99
4.- Discusión	
4.1- Toxicidad del Fe	100
4.2- Metabolismo oxidativo del Fe en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga aguda de Fe-dextrán	100
4.2.1- Fe como agente de daño oxidativo en otros órganos	103
4.2.2- Modelo del estado estacionario para el A [•] en sobrecarga aguda de Fe	105
4.3- Metabolismo oxidativo del Fe en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga subcrónica de Fe	114
4.3.1- Modelo de estado estacionario para el A [•] en sobrecarga subcrónica de Fe	120
4.4- Efecto de situaciones de estrés oxidativo en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga de Fe	124

4.4.1- Administración aguda de Fe y LPS	124
4.4.2- Administración subcrónica de Fe seguida de LPS	126
4.4.3- Administración subcrónica de Fe seguida de CPZ	127

5.- Conclusiones

6.- Resumen

7.- Referencias



1.- *Introducción*

1.1- Radicales libres

Un radical libre (RI^\bullet) es definido como una especie química con un electrón (e^-) no apareado en los orbitales de valencia exterior, o como una especie química con un número impar de e^- . Estas especies pueden ser un átomo, tal como el hidrógeno o el átomo de cloro, un metal de transición como el Fe, o una molécula en cuyo caso el e^- desapareado está situado en un orbital molecular. El e^- desapareado confiere una reactividad relativamente elevada a la molécula debido a la fuerte tendencia a adquirir un segundo e^- en el orbital. Sin embargo, los metales de transición con un número impar de e^- y las moléculas orgánicas grandes que forman RI^\bullet , como por ejemplo melaninas u óxido nítrico (NO) en el que el átomo de nitrógeno (N_2) está en un anillo aromático, son en general estables y no reactivos (Boveris, 1998).

El oxígeno (O_2) se puede reducir hasta formar agua (Figura 1). Los intermediarios parciales de la reducción parcial del O_2 incluyen especies radicales y no radicales que son especies químicas derivadas de las reducciones univalentes secuenciales del O_2 molecular: anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet OH$).

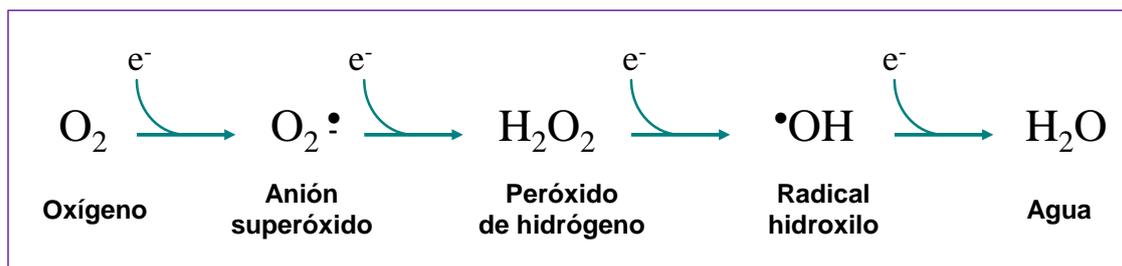


Figura 1: Intermediarios de la reducción parcial del O_2 .

1.2- Fuentes celulares de generación de RI^\bullet

Fisiológicamente, en las células aerobias se producen RI^\bullet . Entre el 2 y el 4% del O_2 consumido por las células vivas genera especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto se debe a que diversas organelas (como las mitocondrias, el retículo endoplasmático y los peroxisomas) y enzimas citoplasmáticas como la xantina oxidasa (XO) son capaces de reducir parcialmente el O_2 a $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Figura 1), generando secundariamente $\bullet OH$ (Boveris, 1998).

La vida media promedio de cada una de las ROS, está inversamente relacionada con su reactividad (Fröhlich, 2013). El $\bullet OH$ es una de las especies más reactivas que se conocen. Posee un tiempo de vida media muy corto (10^{-9} s) y reacciona con la mayoría de las biomoléculas con velocidades cercanas al límite de

difusión (Boveris, 1998), mientras que el O_2^\bullet es menos reactivo y tiene una vida media de 10^{-6} s (Fröhlich, 2013).

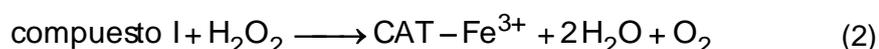
Las ROS se originan en la célula debido principalmente a las actividades enzimáticas de la mieloperoxidasa y Citocromo (Cit) P_{450} , de oxidasas y flavoproteínas en los peroxisomas, de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) oxidada en la membrana plasmática, de la XO citoplasmática, de la autooxidación de la hemoglobina (reacción de Fenton), riboflavina y catecolaminas, de metales de transición, y de la cadena de transporte de e^- de las mitocondrias (Fröhlich, 2013).

En la naturaleza, que ha estado expuesta a las ROS por dos mil millones de años, se han seleccionado mecanismos que no sólo permiten convivir con ellas sino también que las utilizan en múltiples funciones. Las ROS no son inevitablemente tóxicas, sino que su toxicidad depende de su concentración y del contexto celular en el que se producen (Nunn, 1985). En concentraciones fisiológicas, las ROS son importantes reguladoras de los procesos celulares, como el crecimiento, la supervivencia, la proliferación, la detención del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, la migración de las células, la inflamación, y cambios de la matriz extracelular. Sin embargo, un aumento patológico de ROS puede causar daño oxidativo a los lípidos (peroxidación lipídica), proteínas (modificación de aminoácidos, fragmentación y la agregación) y al ADN (mutaciones y alteración de la transcripción de genes) (Fröhlich, 2013). Además de las ROS, existen especies reactivas del N_2 (RNS), como por ejemplo el NO, que es sintetizado por la enzima NO sintasa (NOS), expresada en células endoteliales, macrófagos y células neuronales.

1.3- Protección enzimática antioxidante

1.3.1- Catalasa (CAT)

La enzima CAT está formada por 4 subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe^{3+} -protoporfirina) unido a su sitio activo. Cada subunidad usualmente contiene una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) unida a este grupo, que ayuda a estabilizar la enzima. La función de la CAT es la remoción de H_2O_2 dentro de las células, catalizando las siguientes reacciones (reacciones 1 y 2) (Aebi, 1984; Konigsberg Fainstein, 2008).



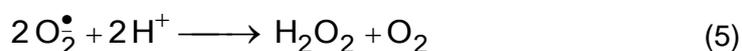
En los animales la CAT está presente en la mayoría de los órganos, y se encuentra especialmente concentrada en el hígado. El cerebro, el corazón y el músculo esquelético sólo contienen pequeñas cantidades de esta enzima (Halliwell y Gutteridge, 1989). En mamíferos, la actividad de la CAT se encuentra localizada mayoritariamente en los peroxisomas y en menor proporción en la mitocondria (Zamocky y col., 2008). Además, recientemente se han descrito genes que codifican para una CAT citosólica (Mhamdi y col., 2010).

1.3.2- Superóxido dismutasa (SOD)

Las SODs son una familia de enzimas que contienen Cu y Zn o Mn. Las SODs que contienen Cu y Zn (CuZn-SODs) son enzimas muy resistentes al calor, al ataque de proteasas, a la desnaturalización por cloruro de guanidinio, dodecil sulfato de sodio (SDS) y urea. El ciclo catalítico para la reacción de dismutación del O_2^{\bullet} involucra las reacciones 3 y 4 (Halliwell y Gutteridge, 1989):



La reacción neta catalizada por las CuZn-SODs es la reacción 5:



La MnSOD es una variante de la enzima que contiene Mn. Este tipo de SOD es más lábil a la desnaturalización por calor o por químicos, como los detergentes, que la CuZn-SOD. Sin embargo, no es inhibida ni por el cianuro ni por el dietilditiocarbamato. La reacción catalizada por la Mn-SOD es la misma que la catalizada por la CuZn-SOD, pero la actividad de esta enzima parece depender fuertemente del pH (Halliwell y Gutteridge, 1989). En mamíferos se ha detectado actividad de CuZn-SOD en el citoplasma, el núcleo, los peroxisomas y en la membrana externa de las mitocondrias (Konigsberg Fainstein, 2008).

1.3.3- Glutación peroxidasa (GPx)

La enzima GPx cataliza la oxidación de un tiol de bajo peso molecular, el glutatión, en su forma reducida (GSH), a glutatión en su forma oxidada (GSSG) a expensas de H_2O_2 (reacción 6) (Tappel, 1974).

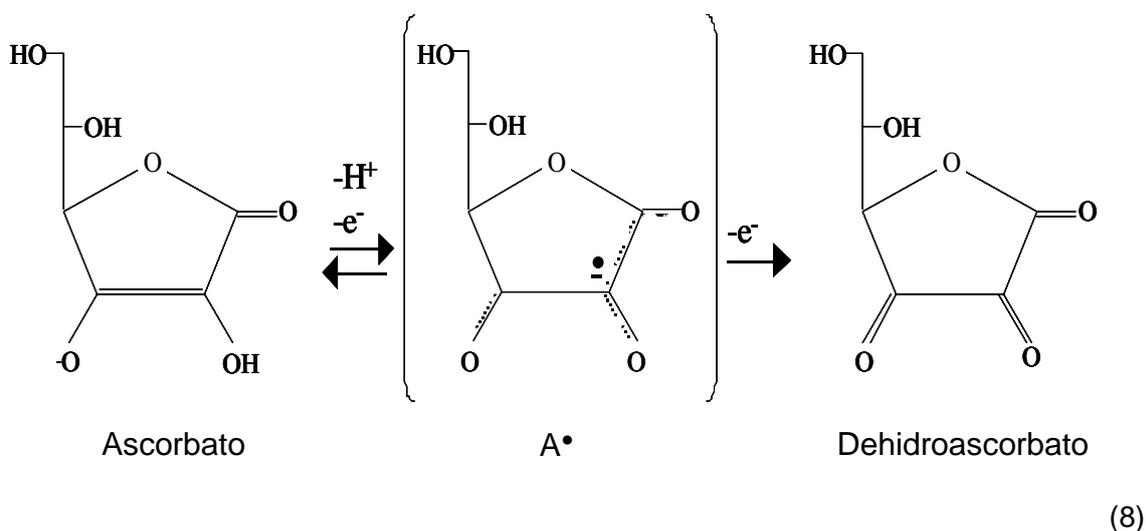


El GSH se encuentra en los animales, las plantas y en muchas bacterias aerobias en concentraciones del orden milimolar. La mayoría del glutatión libre está presente en las células como GSH más que como GSSG. En los mamíferos, la enzima GPx presenta alta actividad en el hígado, una actividad moderada en el corazón, los pulmones y en el cerebro, y una baja actividad en el músculo. Esta enzima emplea específicamente GSH como dador de hidrógeno y es de localización citosólica (Tappel, 1974).

1.4- Protección antioxidante no enzimática

1.4.1- Ascorbato (AH⁻)

El AH⁻ puede actuar como agente reductor. La donación de un e⁻ por el AH⁻ al radical α-tocoferol (α-T•) da lugar a la formación del radical ascorbilo (A•) (reacción 7), el cual puede ser nuevamente oxidado para generar dehidroascorbato (DHA) (reacción 8),



La mayoría de los animales y las plantas pueden sintetizarlo a partir de glucosa, a excepción de los seres humanos y otros primates, que requieren la incorporación de AH⁻ con la dieta (como vitamina C). El AH⁻ participa en la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ y facilita así la absorción de Fe por el intestino (Smirnov, 2000; Harrison y May, 2009). Este antioxidante no enzimático es cofactor de numerosas enzimas, incluyendo aquellas que participan en la síntesis de las catecolaminas, la carnitina, el colesterol (y, por lo tanto, en la síntesis de la mielina en el cerebro), los aminoácidos y ciertas hormonas peptídicas (Chatterjee y col., 1975; Rice, 2000). Las

concentraciones más altas de AH^- en el cuerpo se encuentran en el cerebro y en los tejidos neuroendócrinos (Harrison y May, 2009). En el líquido cefalorraquídeo su concentración promedio alcanza 500 μM , en el fluido extracelular cerebral llega a 200 μM , en las células gliales a 1 mM y en las neuronas a 10 mM (Rice, 2000; Harrison y May, 2009).

1.4.2- Glutati3n

El glutati3n es un antioxidante de s3ntesis end3gena. Es un trip3ptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) y es el tiol celular m3s abundante en c3lulas animales. El GSH no s3lo act3a como dador de hidr3geno (H^+) para la familia de las enzimas GPx, sino que tiene funciones antioxidantes por s3 mismo. Es un nucle3filo fuerte y tambi3n un reductor. Participa en el mecanismo molecular de prevenci3n debido a la reacci3n directa del tiol con RI^\bullet , tales como el O_2^\bullet , el $\bullet OH$, y el radical peroxilo (ROO^\bullet), como tambi3n a la regeneraci3n de la α -T (vitamina E) a partir de sus formas radicales (Di Mascio y col., 1991). El GSH se encuentra en concentraciones celulares de 7-8 mM en c3lulas de h3gado de rata y de 2 mM en c3lulas de pulm3n y coraz3n de rata (Halliwell y Gutteridge, 1989). En el sistema nervioso central (SNC), el glutati3n se encuentra en un rango de concentraci3n de 1 a 3 mM, dependiendo de la regi3n (Owen y Butterfield, 2010).

1.5- Estr3s oxidativo

La concentraci3n de las especies activas puede mantenerse en estado estacionario en valores controlados gracias a la actividad de antioxidantes enzim3ticos y no-enzim3ticos. Se define la concentraci3n en estado estacionario como aquella en la cual la velocidad de utilizaci3n o desaparici3n de la especie es igual a su velocidad de producci3n (Boveris, 1998). El "estr3s oxidativo" se produce por un desequilibrio, ya sea por un aumento en la producci3n de las especies oxidantes o por una disminuci3n de la actividad de las especies antioxidantes. Bajo estas condiciones, tanto las ROS como RNS pueden reaccionar con biomol3culas y generar estr3s oxidativo y nitrosativo, respectivamente. Estas reacciones pueden modificar la estructura y funci3n de las biomol3culas, para dar lugar a alteraciones por da3o oxidativo y nitrosativo. La mayor velocidad de producci3n de $\bullet OH$ determina una mayor extensi3n de las reacciones iniciadas por dicho radical produci3ndose modificaciones observables en la estructura y funci3n de todos los tipos de mol3culas org3nicas. Si el $\bullet OH$ reacciona con un l3pido, se produce lipoperoxidaci3n. El mecanismo en cadena de la reacci3n de lipoperoxidaci3n ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su significado biol3gico.

Por ejemplo, en las membranas biológicas disminuye la resistencia eléctrica y la fluidez, se produce inactivación de las enzimas integrales y pérdida de la permeabilidad selectiva, con las consecuentes modificaciones en los balances hidrosalinos. En el ADN, los oxidantes producen lesiones en bases individuales o rupturas de una o dos cadenas de la doble hélice. Como consecuencia se observan mutaciones y cambios en la información transmitida. La reacción del H_2O_2 o del $\bullet OH$ con proteínas puede alterar las estructuras primaria, secundaria o terciaria de las mismas por oxidación de aminoácidos susceptibles, fragmentación de la cadena peptídica o formación de las uniones cruzadas entre cadenas y agregados insolubles. Por otro lado, un aumento en la generación de NO puede dar lugar a un aumento de RNS, como el peroxinitrito ($ONOO^-$) produciendo daño celular por nitración, nitrosilación y lipoperoxidación. Esto puede promover la muerte celular y dar lugar a estados fisiopatológicos, como la neurodegeneración, el cáncer, la mutagénesis, diversas enfermedades cardiovasculares, y al envejecimiento, entre otros.

Es posible evaluar el estado oxidativo en sistemas biológicos a través de distintos tipos de metodologías. El A^\bullet tiene un tiempo de vida media relativamente largo en comparación con otras especies, tales como los radicales $\bullet OH$, ROO^\bullet , alcoxilo (RO^\bullet) y alquilo (R^\bullet) y se ha propuesto como un marcador de estrés oxidativo en numerosos sistemas (Malanga y col., 2015). Todos los sistemas biológicos contienen antioxidantes, incluyendo compuestos solubles en agua (tales como el AH^- y el glutatión), y antioxidantes solubles en lípidos, tales como el α -T (Malanga y col., 2015). Se han descrito índices de balance de estrés oxidativo, que pueden ser utilizados *in vitro* o *in vivo* como por ejemplo: quimioluminiscencia de órgano intacto, la relación GSH/GSSG, sondas fluorescentes, el índice radicales lipídicos (RL^\bullet)/contenido de antioxidantes o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)/contenido de antioxidantes en el medio lipofílico y el índice A^\bullet/AH^- en el medio hidrofílico celular, entre otros (Malanga y col., 2015).

1.6- Metabolismo del Fe

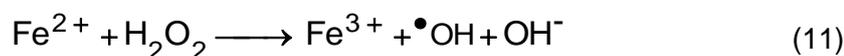
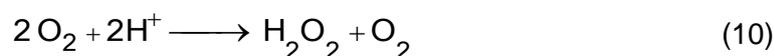
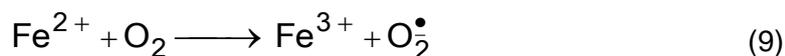
1.6.1- Reacciones celulares en las que participa el Fe

El Fe es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre y junto a otros metales, como el Cu y el Zn, es un micronutriente esencial para todas las formas de vida. El Fe en los seres vivos se encuentra formando parte de componentes celulares que contienen, requieren o almacenan el metal. En el cerebro de mamíferos, el Fe cumple diversas funciones: es cofactor de numerosas enzimas que están involucradas en la síntesis de neurotransmisores (Crichton, 2008), así como también

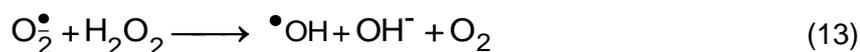
es esencial para la síntesis de lípidos y colesterol, los cuales son sustratos de la síntesis de mielina. De este modo, el Fe es un componente fundamental en la neurotransmisión, mielinización y en la división celular.

En soluciones acuosas, el Fe puede encontrarse en dos estados de oxidación: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico). Esta propiedad lo hace capaz de participar en reacciones que abarcan gran parte de la bioquímica celular, interviniendo tanto en la síntesis de ADN, como en el transporte de e^- , la respiración celular, la mielinización y la neurotransmisión (Weinberg y col., 2000). El Fe, al tener e^- desapareados, es un excelente catalizador de la producción de formas reducidas del O_2 .

La oxidación de Fe^{2+} conduce, a través de la pérdida de un e^- que es recibido por el O_2 , a la formación de O_2^\bullet . La generación de O_2^\bullet da origen al H_2O_2 , que puede reaccionar con Fe^{2+} y producir $\bullet\text{OH}$, de esta forma el Fe resulta un catalizador adecuado de la producción de intermediarios de la reducción parcial del O_2 de alta reactividad (reacciones 9 a 11). Esta última reacción se conoce como reacción de Fenton (reacción 11) y produce la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} mediada por H_2O_2 , generando un anión hidróxido (OH^-) y el $\bullet\text{OH}$.



Por otro lado, el O_2^\bullet no es oxidante particularmente potente y más bien actúa como agente reductor: por sí mismo no es muy reactivo pero tiene además la capacidad de reaccionar con el Fe^{3+} y generar Fe^{2+} (reacción 12) y así generar, indirectamente, más $\bullet\text{OH}$. Así, sólo se necesitan cantidades catalíticas de esta sal de Fe para generar $\bullet\text{OH}$. La suma de las reacciones 11 y 12 es conocida como la reacción de Haber-Weiss (reacción 13).



Es importante destacar que el $\bullet\text{OH}$ es una especie de muy alta energía y puede oxidar y fragmentar compuestos orgánicos. En principio, el $\bullet\text{OH}$ reacciona

abstrayendo hidrógenos de los compuestos orgánicos (HR) y generando R• (reacción 14) que pueden reaccionar con otros compuestos orgánicos generando peróxidos orgánicos.



A su vez, otro reductor como el AH⁻ puede reducir al Fe³⁺, generando Fe²⁺ (reacción 15), y promoviendo la toxicidad del sistema Fe/H₂O₂ (reacción 11), mientras que el GSH, puede reducir el H₂O₂ (reacción 16), desfavoreciendo la toxicidad del mismo.



En los sistemas aerobios las reacciones que involucran la generación de RI• ocurren fisiológicamente bajo condiciones controladas que mantienen las concentraciones estacionarias en niveles no deletéreos, empleando los sistemas antioxidantes endógenos de control de las especies reactivas. Una pequeña fracción del total del Fe celular (3-5%) (Kruszewski, 2003) se define como el “pool” de Fe débilmente unido a compuestos de bajo peso molecular o “labile iron pool” (LIP), fácilmente quelable, que pasa rápidamente a través de la célula, que está constituido por Fe²⁺ y Fe³⁺, asociado con una variedad de ligandos con baja afinidad por iones de Fe (Kakhlon y Cabantchik, 2002). También se sugirió que el LIP en realidad representa Fe ligado en forma relativamente débil a grupos prostéticos en sitios funcionales de las proteínas que contienen Fe, como proteínas no transferrina (Tf) y no ferritina (Ft) (Petrák y Vyoral, 2001). La accesibilidad del Fe celular a quelantes como la deferoxamina mesilato (DF) es comúnmente utilizado como criterio de “labilidad”.

1.6.2- Ingreso y almacenamiento de Fe en el organismo

El Fe ingresa al organismo a través de la ingesta de alimentos. Allí puede encontrarse como Fe³⁺ o como Fe hémico, mientras que el incorporado a través de productos farmacológicos usualmente está presente como Fe²⁺. El Fe³⁺ es insoluble en soluciones con pH mayor a 3, por lo que, en el estómago, se forman complejos solubles del metal que aumentan su disponibilidad para ser absorbido en el duodeno.

El ingreso diario de Fe en los seres humanos a través del duodeno es de 1-2 mg/día. Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción de este metal esencial, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal (Pérez y col., 2005). El Fe, ya sea como Fe^{3+} , como Fe hémico o dentro de la proteína de almacenamiento de Fe, Ft, puede ser absorbido por las células intestinales en la superficie apical por diferentes proteínas transportadoras. Dentro de las células intestinales todo el Fe absorbido por cualquiera de las vías descritas es reducido a Fe^{2+} por un complejo proteico citoplasmático llamado paraferitina. El Fe citosólico puede ser exportado desde la superficie basolateral del enterocito, donde se expresan receptores para la transferrina (RTf) que permiten la entrada del Fe a la apotransferrina (apoTf), es decir a la Tf despojada de Fe.

La circulación de Fe en el enterocito se esquematiza en la Figura 2. Una vez que el Fe se une a la apoTf, circula principalmente en plasma unido a la Tf y en menor medida unida a la albúmina o a especies de bajo peso molecular. La Tf es una proteína plasmática que se halla también en otros fluidos de los vertebrados, tales como el líquido cefalorraquídeo, la leche y el semen. En mamíferos también existe la lactoferrina (presente en las lágrimas, la leche y el jugo pancreático) que desempeña un papel importante en el control de infecciones ya que restringe la disponibilidad de Fe para el metabolismo microbiano.

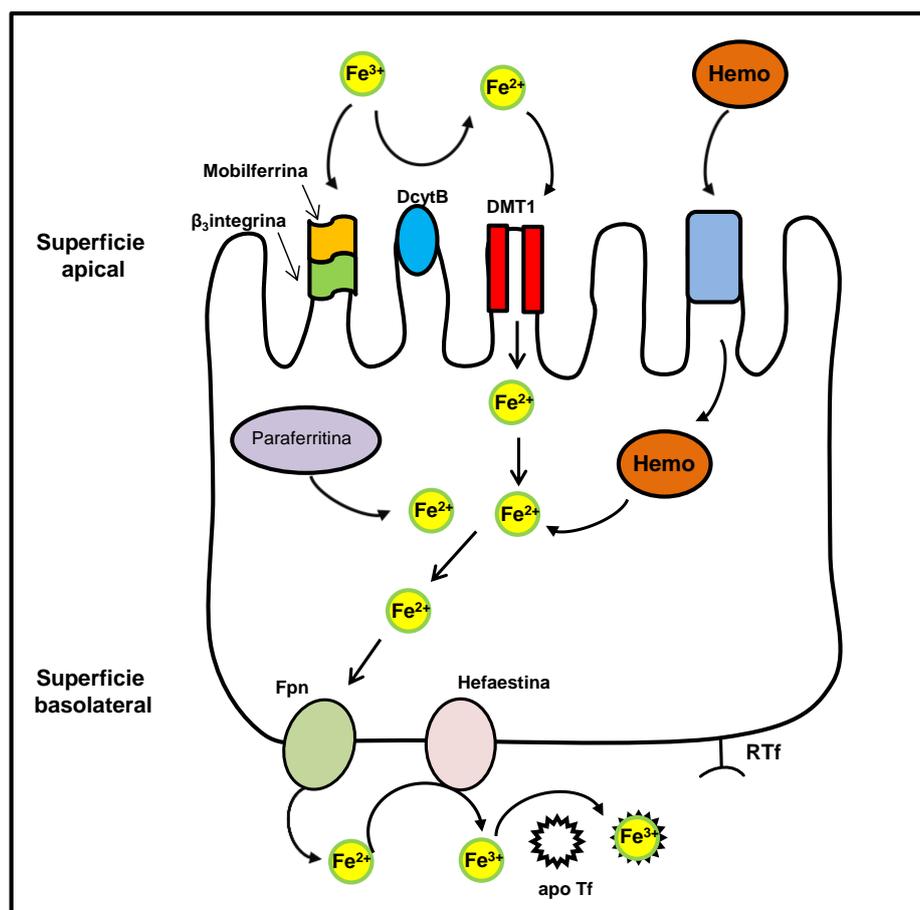


Figura 2: Mecanismos de absorción intestinal de Fe. Tf: transferrina, RTf: receptor de transferrina, DMT1 (divalent metal transporter 1): transportador de metales divalentes, DcytB (duodenal cytochrome b): Cit b duodenal, ferri-reductasa asociada a membrana duodenal, Fpn (ferroportina): proteína exportadora de Fe. Figura tomada y modificada de Pérez y col. (2005).

El ingreso de Fe^{3+} a las células puede realizarse, según el tipo celular, a través de los RTf, a través de la β_3 -integrina y la mobilferrina (involucradas en la captación de Fe^{3+} por la vía independiente de Tf) y/o a través de los receptores DMT1 (involucrados en la captación de Fe^{2+}). El Fe^{3+} transportado por la Tf ingresa a través de un proceso de endocitosis mediada por receptor. Los RTf se encuentran concentrados en fosas (invaginaciones de la membrana plasmática) revestidas internamente por la proteína clatrina. Una vez formado el complejo Tf-RTf, el proceso de invaginación se completa, dando origen a una vesícula revestida por clatrina que es transportada junto con el complejo ligando-receptor al interior celular. Una vez que la clatrina es removida, la vesícula resultante se fusiona con un endosoma (Figura 3). El pH del interior del compartimiento endosomal oscila alrededor de 5,5 debido a la acción de una bomba de H^+ dependiente de ATP presente en su membrana, la cual bombea H^+ desde el citosol al interior del endosoma. A este pH, el Fe^{3+} es liberado del complejo Tf-RTf.

Posteriormente, el metal es reducido por una ferri-reductasa endosomal y transportado al citoplasma por el transportador de cationes divalentes DMT1. El complejo apoTf-RTf es transportado intacto hacia la membrana plasmática donde, al tomar contacto nuevamente con el medio extracelular de pH neutro, se disocia. La apoproteína queda entonces disponible para captar nuevamente Fe y comenzar otro ciclo de transporte e internalización (Figura 3). Luego el Fe^{2+} puede ser incorporado i) a la Ft para ser almacenado en una forma segura y biodisponible, ii) a proteínas que requieren Fe para su funcionamiento; y/o iii) formar parte del LIP.

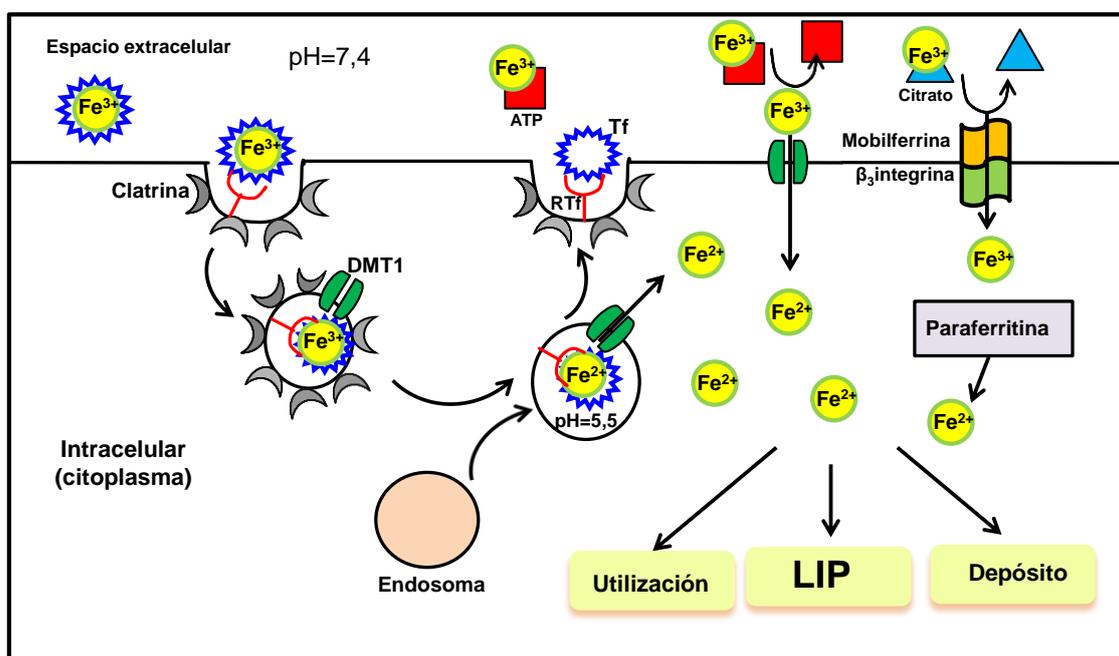


Figura 3: Captación y transporte celular de Fe. Figura tomada y modificada de Pérez y col. (2005).

El cerebro es el único órgano que expresa RTf del tipo 1 (RTf1) en el lado luminal de sus capilares. Por lo tanto, el mecanismo más importante de incorporación de Fe por las células endoteliales capilares del cerebro (*brain capillary endothelial cells* - BCECs) es el mediado por RTf1. Así, la mayoría del transporte de Fe se produce por endocitosis de la Tf unida a su receptor a través de las BCECs desde el lado luminal al lado adluminal de los capilares (Figura 4).

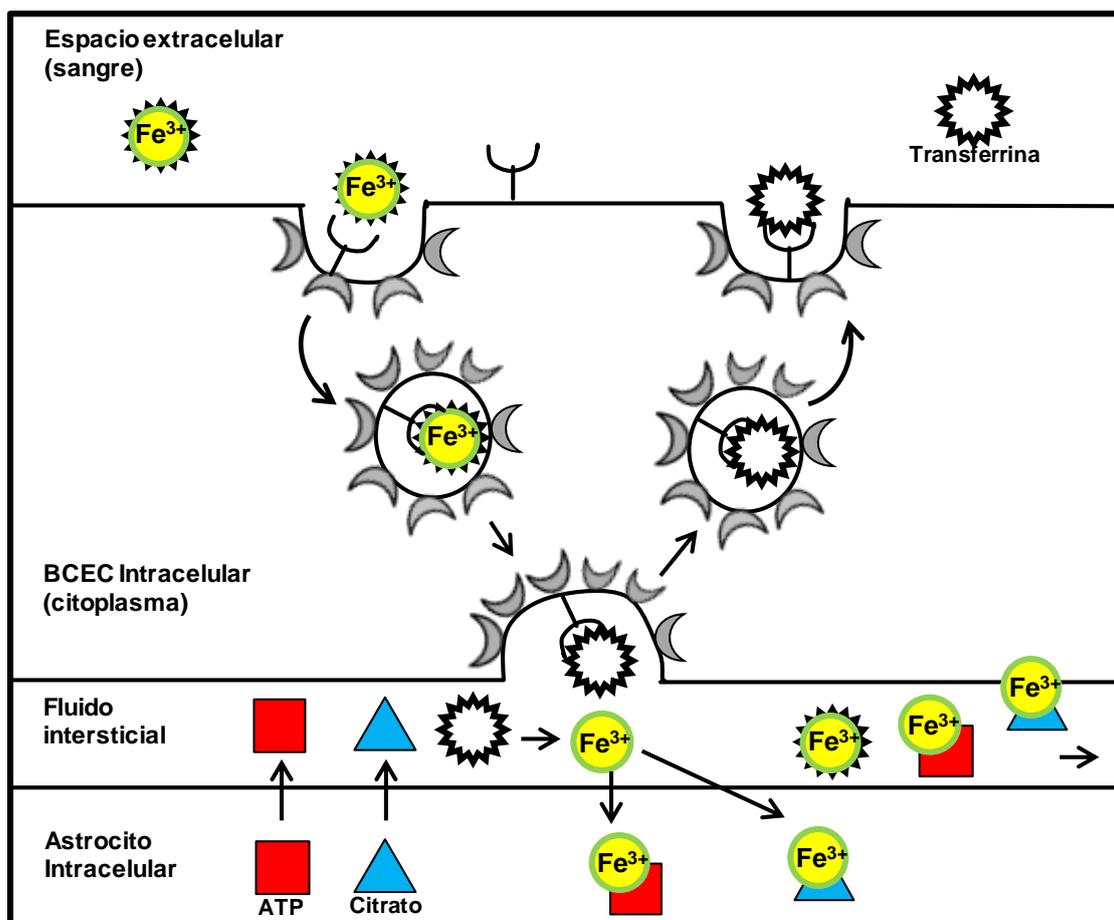


Figura 4: Corte transversal de un capilar cerebral donde se muestra la interacción entre las BCECs y los astrocitos que facilita el transporte de Fe al cerebro. Figura tomada y modificada de Moss y col. (2007).

Cuando las vesículas llegan al lado adluminal se expone la Tf unida al Fe, luego el Fe se libera en forma de Fe^{3+} al fluido intersticial gracias a la presencia de altas concentraciones de H^+ , ATP, otros nucleótidos y citrato, liberados probablemente por los astrocitos presentes en el SNC. Allí queda como Fe no unido a la Tf complejoado a citrato, a ATP y a AH^+ , o puede unirse a la Tf (Figura 4), y así difundir desde los ventrículos cerebrales, o puede unirse a la lactoferrina. Por otro lado, sólo una pequeña proporción de Fe, se incorpora a través del plexo coroideo como Fe no unido a Tf (Moos y col., 2007).

Una vez en el interior de la célula, ese Fe pasa a ser parte del LIP citoplasmático y tiene tres destinos posibles: incorporarse a los componentes que lo depositan (Ft), incorporarse a los componentes que necesitan Fe para cumplir sus funciones (como por ejemplo las hemoproteínas y las proteínas con grupos 4S-4Fe) o

pasar al interior de ciertas organelas como las mitocondrias y el núcleo (Breuer y col., 2008; Kruszewski, 2003). También se ha identificado la presencia de LIP en el núcleo de neuronas. Sin embargo, ni la función ni la fuente de ese LIP ha sido identificada; si bien se ha demostrado la existencia de un equilibrio dinámico entre el LIP nuclear y el citoplasmático. Además, se ha detectado en neuronas la presencia de los receptores DMT1 en el núcleo, en los endosomas y en el retículo endoplasmático neuronales por lo que se postula la presencia de LIP en estas organelas en las neuronas. El compartimiento lisosomal es el centro de recambio de todas las organelas por autofagia y de muchas proteínas que contienen Fe. Así, los lisosomas de todas las células cuentan con un *pool* de Fe con capacidad redox. Este compartimiento lisosomal consiste en un gran número de vacuolas, así, aquellas que se encuentren degradando compuestos ricos en Fe tendrán una gran cantidad de LIP, mientras que los lisosomas que se encuentren en reposo no contendrán LIP en su interior.

Por otro lado, el Fe puede ser liberado del interior de las células al fluido intersticial por un transportador de Fe, la ferroportina. Luego este Fe se puede unir a la Tf; sin embargo, al ser la concentración de Tf muy baja en este espacio es más probable que el Fe se una a la lactoferrina, a la Ft o que permanezca como Fe no unido a la Tf formando diferentes complejos con los quelantes presentes en este espacio. De esta manera, el Fe es transportado hasta los capilares endoteliales cerebrales desde donde pasa a la sangre realizando el camino contrario al descrito para ingresar desde la sangre a los capilares.

La Ft es una proteína cuya función principal es la de almacenar Fe. Es muy resistente a los agentes desnaturizantes, incluyendo el calentamiento a más de 80°C (Harrison y Arosio, 1996). La Ft se expresa en las arqueobacterias, las eubacterias, los animales y las plantas, pero no se encuentra en las levaduras. La Ft animal está codificada en el núcleo y es una proteína primordialmente citosólica, aunque también se la ha hallado en las mitocondrias, en el núcleo (en los hepatocitos, en las células musculares y las células nerviosas) y en las mitocondrias de los espermatozoides humanos, la retina, el cerebro, la médula espinal, el riñón y los islotes de Langerhans, en ratón. Además, una proporción menor de la Ft se encuentra expresada en los fluidos secretorios y en el plasma humano (123 ng/ml en hombres y 56 ng/ml en mujeres) (Harrison y Arosio, 1996; Arosio y col., 2009).

Esta proteína está compuesta de 24 subunidades. En los mamíferos, existen dos tipos de subunidades, la subunidad H (*heavy*) y la L (*light*), con un peso molecular aparente de 21 y 19,5 kDa, respectivamente. Se ha observado que tienden a formarse heteropolímeros originando un gran número de isoFts ($H_{24}L_0, H_{22}L_2, \dots, H_0L_{24}$) con una distribución tejido-específica. La subunidad H contiene el centro ferroxidasa, necesario para la incorporación de Fe y su oxidación a Fe^{3+} . Por otro lado, la subunidad L carece de centros ferroxidasa pero contiene un sitio de nucleación importante. Los dos tipos de subunidades están formadas por un manojo de 4 hélices α (Harrison y Arosio, 1996).

1.6.3- Importancia del Fe en el SNC

Los iones metálicos poseen una importancia muy particular en la producción de energía, la contracción muscular, el transporte de O_2 y en la transmisión nerviosa. En el cerebro, metales como el Zn, el Cu y especialmente el Fe, son indispensables. En el SNC, estos procesos que requieren Fe incluyen la fosforilación oxidativa, la síntesis de mielina, la producción de neurotransmisores, el metabolismo del NO y el transporte de O_2 . Este metal cumple un papel importante en la transferencia de e^- y es un cofactor de numerosas enzimas incluyendo enzimas clave para la biosíntesis de neurotransmisores como la tirosina hidroxilasa (comprometida en la síntesis de catecolaminas), la dopamina, la triptofano hidroxilasa (involucrada en la síntesis de serotonina) y la monoamina oxidasa (metabolismo de la dopamina).

Tanto la deficiencia, como el exceso de Fe, pueden afectar la función neuronal. Las deficiencias nutricionales de trazas de elementos específicos como el Fe (Cook y col., 1994; Goodnough, 2012) culminan en enfermedades humanas. Además, exposiciones a niveles tóxicos de Fe, pueden dar lugar a condiciones patológicas (Schumann, 2001). Una inevitable consecuencia de la edad es el aumento de Fe en algunas áreas específicas del cerebro, como en el área cortical y subcortical (Ramos y col., 2014) y esto ocurre en mayor proporción en distintos desórdenes neurológicos.

Metales como Fe, Mn y Hg han recibido una atención considerable debido a su capacidad para inducir daño oxidativo y neurodegenerativo. Es importante mencionar que la etiología de las enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson (EP) y la Enfermedad de Alzheimer (EA) parecen ser en gran medida dependientes de factores ambientales y su interacción con factores genéticos (Marras y Goldman, 2011). Determinados metales, incluyendo al Fe, tienen propiedades pro-oxidantes y pueden perturbar genes por eventos epigenéticos, que conducen a la alteración de la expresión genética y a las enfermedades neurodegenerativas de

aparición tardía (Kwok, 2010). Debido a su capacidad para asumir dos estados de oxidación en sistemas biológicos, el Fe puede considerarse un productor intrínseco de ROS, que conduce a estrés oxidativo neuronal y neurodegeneración (Núñez y col., 2012). Se ha informado que la dishomeostasis de Fe es un evento importante en la fisiopatología de la EP y de la EA (Bartzokis y col., 2000; Jellinger, 1999) y se ha propuesto que podría ser un factor primordial que participa en la progresión de estas enfermedades y de otras como la Enfermedad de Huntington (EH) (Kell, 2010). De hecho, hay numerosas observaciones que apoyan la participación temprana de la sobrecarga del metal en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Rosas y col., 2012). Sin embargo, no se conocen los aspectos temporales de mediación o progresión de las condiciones neuropatológicas mediadas por Fe, como tampoco el papel exacto desempeñado por la activación de la vía toxicológica desencadenada por el Fe. (Andersen, 2004; Johnstone y Milward, 2010; Kumar y col., 2012).

En vista de su amplia distribución en la corteza de la tierra, los organismos vivos están expuestos constantemente al Fe, principalmente a través de la ingesta de alimentos. A pesar de que normalmente, la absorción de Fe está regulada fisiológicamente para evitar la toxicidad, pueden ocurrir exposiciones a elevadas concentraciones de Fe ya sean esporádicas, accidentales, suicidas intencionales o exposiciones ocupacionales a Fe, sin embargo, pocas veces han sido vinculadas a la neurotoxicidad (Andersen, 2004; Anderson, 1994; Carlsson y col., 2008; Howland, 1996; Jang y Hoffman, 2011; Magdalan y col., 2011; Siew y col., 2008; Sipahi y col., 2002; Tseng y col., 2011). En el contexto de la neurodegeneración, no existe fuerte evidencia de que un único episodio de exposición a niveles tóxicos de Fe den como resultado neurodegeneración retrasada. Sin embargo, existe evidencia epidemiológica limitada que indica que la co-exposición a Fe y otros metales tóxicos (Pb y Cu) presentan un factor de riesgo para la EP (Gorell y col., 1997, 1999).

Los cambios en el estado de oxidación del Fe son cruciales para la producción de energía en los organismos vivos. En las células aeróbicas, el Fe juega un papel vital en el transporte de e^- derivado de la oxidación de alimentos al O_2 situado al final de la cadena respiratoria (Levi y Rovida, 2009). Paradójicamente, las propiedades redox del Fe determinan su participación en reacciones potencialmente citotóxicas. Las formas Fe^{2+} / Fe^{3+} también están implicadas en la propagación de la peroxidación lipídica por un complejo mecanismo que aún no está claro. Sin embargo, que es probable que este mecanismo implique la interacción directa de Fe con el O_2 y ROS, tales como peróxidos orgánicos (ROOH) formados en las membranas biológicas

(Minotti y Aust, 1992; Tadolini y Hakim, 1996). Es importante destacar que la disfunción mitocondrial provocada por diferentes agentes ambientales tóxicos o endógenos, incluyendo el Fe, puede iniciar o propagar la liberación de Fe de los sitios de almacenamiento del metal (proteínas de unión a Fe como la Ft). Este efecto puede desencadenar y/o acelerar la progresión de enfermedades degenerativas (Horowitz y Greenamyre, 2010; Kumar y col., 2012; Mesquita y col., 2012.; Sebastiani y Pantopoulos, 2011). En las mitocondrias, los “clusters” [Fe-S] que se encuentran en los complejos I y III de la cadena de transporte de e⁻ pueden ser atacados por ROS, liberando Fe que queda disponible para participar en la reacción de Fenton y otros procesos oxidativos. Por lo tanto, el Fe es importante en la toxicidad celular y puede iniciar un conjunto de reacciones oxidativas extremadamente tóxicas por sí mismo, o alimentar el estrés oxidativo provocado por xenobióticos o metabolitos endógenos. Además, es muy importante considerar que el estrés oxidativo mediado por Fe ha sido clásicamente vinculado a la muerte celular por apoptosis (Ott y col., 2007; Wallace, 1999) y más recientemente a ferropoptosis, que representa una forma de muerte celular no-apoptótica dependiente de Fe (Dixon y col., 2012). Al respecto, se demostró que el Fe es un elemento clave en la participación en el estrés oxidativo y la muerte celular inducida por la mitocondria. Esta forma de muerte celular, descrita recientemente en células cancerígenas de mamíferos y fibroblastos es morfológica, bioquímica y genéticamente distinta de la apoptosis, necrosis o la autofagia, ya que puede ser activada por el glutamato (Dixon y col., 2012), y por moléculas como erastina, sulfasalazina y RSL3 (este último es un compuesto letal selectivo para una droga para células cancerígenas conocida como RAS). La ferropoptosis se puede prevenir mediante los antioxidantes lipofílicos tales como el trolox y la vitamina E, y quelantes de Fe como la DF, pero no puede prevenirse mediante la acción de las moléculas pequeñas conocidas como inhibidoras de la apoptosis, necrosis o autofagia. No siempre la muerte celular involucra procesos letales idénticos. Una explicación posible es que diferentes formas de Fe como por ejemplo, el LIP, [Fe-S] y grupos hemo, o el Fe lisosomal, mitocondrial o citosólico están implicados en la mediación de un fenotipo de muerte celular único en respuesta a diferentes estímulos letales (Dixon y Stockwell, 2014). En consecuencia, el Fe puede contribuir a la neurodegeneración mediante la activación de diferentes vías de muerte celular.

Tanto las enzimas dependientes de Fe como el LIP que producen ROS, se cree que contribuyen al daño y muerte celular. La manera en que esto ocurre es un área de estudio emergente, en gran parte debido a la dificultad en la definición de los blancos sobre los que actúan, y los efectos de las ROS relevantes para la muerte

celular y los efectos de la acumulación de Fe en las funciones celulares (Dixon y Stockwell, 2014).

La deposición de Fe se ha observado sólo en regiones específicas del cerebro en pacientes con enfermedades degenerativas crónicas (Kell, 2010; Kumar y col., 2012; Rosas y col., 2012; Sian-Hulsmann y col., 2011). Los ganglios basales representan un sitio preferencial de deposición de Fe en las enfermedades neurodegenerativas (Akatsu y col., 2012; Berg y col., 2001; Gregory y Hayflick, 2011). Un fenómeno similar también se observó en una amplia gama de enfermedades genéticas colectivamente llamadas neurodegeneración con acumulación de Fe en el cerebro (NBIA), tales como la ataxia de Friedreich, enfermedad Kufor-Rakeb, aceruloplasminemia y neuroferritinopatía, entre otras (Gregory y col., 2009; McNeill y col., 2008; Schipper, 2012). Estas enfermedades genéticas se caracterizan por la acumulación de Fe en los ganglios basales y están asociadas con mutaciones en las proteínas implicadas en el transporte o el metabolismo de Fe (Prohaska y col., 2012).

Como se indicó para el caso de enfermedades cerebrales degenerativas crónicas asociadas al Fe, poco se sabe acerca de los mecanismos que conducen a la acumulación de Fe en el cerebro (Prohaska y col., 2012). Sin embargo, el estudio y la comprensión de las modificaciones neuropatológicas asociadas con el amplio espectro de enfermedades NBIA han indicado la existencia de características clínicas, morfológicas y moleculares similares a las observadas en enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como la EP, EA y EH (Berg y col., 2001; Schneider y col., 2012). Como se ha señalado, la relación temporal entre deposición de Fe y neurodegeneración aún no se ha establecido claramente. Por lo tanto, en algunas enfermedades, la deposición de Fe puede ser la consecuencia y no la causa de la neurodegeneración. Aquí tenemos un vacío en el conocimiento, lo que indica la necesidad de estudios sobre el mecanismo para determinar los factores primarios, secundarios y terciarios (si los hubiese) que participan en la iniciación y la progresión de la neurodegeneración en diferentes patologías cerebrales asociadas al Fe. Lo más importante, desde el punto de vista terapéutico, es la identificación de un punto potencial de no retorno de la neurotoxicidad mediada por Fe, este hecho sería muy valioso en el desarrollo terapéutico y otros procedimientos de intervención que podrían retrasar la consecuente muerte celular (Farina y col., 2013).

1.6.4- Modelos de sobrecarga de Fe

Existen diversos modelos que se emplean para estudiar el efecto del Fe en el metabolismo oxidativo celular (Tabla 1). Yu y col. (2011) mostraron en un modelo de

estrés psicológico, que el Fe suministrado en la dieta, en 3 dosis diferentes (80, 160 y 320 mg Fe/kg de dieta), durante una semana, induce estrés oxidativo en el cerebro de ratas. Chen y col. (2013) indicaron que el aumento de Fe^{2+} (inyección intracerebral ventricular de Fe^{2+} ($FeCl_2$)) en el cerebro, produce muerte celular inducida por autofagia. Por otro lado, Papanastasiou y col. (2000) mostraron que la absorción de Fe por el cerebro en ratas suplementadas en forma crónica con Fe-carbonilo en la dieta o en forma intravenosa o intraperitoneal (ip) con Fe-polimaltosa, no se vio afectada significativamente. Maaroufi y col. (2009) desarrollaron un modelo de sobrecarga de Fe consistente en la administración de 3 mg Fe/kg/día ($FeSO_4$) ip a ratas adultas durante 5 días. Este tratamiento resultó en una acumulación significativa de Fe en el hipocampo, el cerebelo y los ganglios basales a los 16 días posteriores al tratamiento. Maaroufi y col. (2011) administraron durante 21 días consecutivos dosis de Fe ip de 3 mg Fe/kg/día ($FeSO_4$), y mostraron que la acumulación de Fe correlaciona con un déficit en el comportamiento (Tabla 1).

Tabla 1
Modelos de sobrecarga de Fe

Tratamiento	Forma de administración de Fe	Órgano estudiado	Referencia
Dieta (1 semana)	Dieta suplementada con Fe (80, 160 y 320 mg Fe/kg dieta)	Cerebro	Yu y col. (2011)
Dosis intracerebral ventricular	FeCl ₂	Cerebro	Chen y col. (2013)
Dieta (3 meses)	Fe-carbonilo 3% (P/P)	Cerebro Hígado Bazo	Papanastasiou y col. (2000)
Dosis intravenosa (4 meses)	Polimaltosa (una dosis cada 3 días)	Cerebro Hígado Bazo	Papanastasiou y col. (2000)
Dosis ip (4 meses)	Polimaltosa (una dosis cada 3 días)	Cerebro Hígado Bazo	Papanastasiou y col. (2000)
Dosis ip (5 días)	3 mg Fe/kg/día (FeSO ₄)	Cerebro	Maaroufi y col. (2009)
Dosis ip (21 días)	3 mg Fe/kg/día (FeSO ₄)	Cerebro	Maaroufi y col. (2011)
Dosis ip (única)	500 mg Fe/kg (Fe-dextrán)	Hígado	Rousseau y col. (2011)
Dosis ip (6 dosis)	50 mg Fe/kg (Fe-dextrán)	Hígado	Galleano y col. (2011)

En los últimos años, se han desarrollado distintos modelos de sobrecarga de Fe-dextrán en mamíferos. Rousseau y col. (2011) estudiaron el efecto de la sobrecarga de Fe en hígado de rata mostrando que la sobrecarga de Fe producida por la administración de una dosis de 500 mg/kg ip de Fe-dextrán causó un aumento en el contenido de Fe, en el contenido de Ft, en el contenido de Fe en la Ft, y en el contenido LIP en el suero de ratas. Además, la administración simultánea de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 0127:B8) (modelo de endotoxemia) y de Fe-dextrán conducen a un aumento significativo en el contenido de Fe en el suero, y también en la señal de NO-hemoglobina (Hb) detectada por Espectroscopía de Resonancia Paramagnética (EPR), en el contenido de Fe, de Fe en Ft, de LIP, y de proteínas carboniladas y nitrotirosiladas en el hígado, en comparación a los valores encontrados en los animales control. Además, Galleano y col. (2011), mostraron una significativa hepatoprotección frente a la isquemia-reperfusión hepática, en un modelo de sobrecarga de Fe, en el que se administraron 6 dosis de Fe-dextrán de 50 mg/kg ip.

1.7- ROS y activación de vías de señalización

Además de las especies intermediarias de la reducción parcial del O₂, otras dos especies oxidantes fisiológicamente relevantes son: el HOCl producido por la mieloperoxidasa de los neutrófilos, y el oxígeno singlete (¹O₂) generado durante la fotosensibilización y la irradiación con UVA. Actualmente está establecido que el H₂O₂ es uno de los principales mediadores en la señalización celular (Tonks, 2005; Aslan y Ozben, 2003). Cuando la producción celular de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante, se alcanza un estado de estrés oxidativo que puede conducir a lesiones celulares graves y que puede contribuir a la patogénesis de varias enfermedades. Un aumento moderado y reversible de las ROS en un período de tiempo definido puede ejercer la regulación de la expresión génica con respuestas citoprotectoras (Dröge, 2002), protegiendo así a los órganos de los efectos perjudiciales de eventos nocivos posteriores (Das y Das, 2008).

De acuerdo con Southam y Ehrlich (1943), el término hormesis fue propuesto para designar el efecto estimulante de concentraciones sub-inhedorias de cualquier sustancia tóxica de cualquier organismo. Calabrese (2004) propuso la teoría de que las dosis bajas de toxinas pueden desencadenar ciertas respuestas de defensa que permiten al organismo ser más resistente al mismo estímulo o a estímulos similares.

El fenómeno de hormesis describe la acción de las drogas que actúan como estimulantes de la respuesta antioxidante a dosis bajas y como inhibidores a dosis altas (Mao y Franke, 2013). Se ha observado en una amplia gama de sistemas biológicos. Aunque es un concepto más conocido en su contexto descriptivo, el modo subyacente de acción del fenómeno de hormesis ha sido en gran parte inexplorado. Recientemente, el concepto de hormesis ha estado recibiendo cada vez mayor atención en varios campos, entre los que se encuentra el campo de la investigación del envejecimiento (Mao y Franke, 2013). Se ha propuesto que el estrés oxidativo representa una forma de hormesis, con efectos biológicamente beneficiosos en un nivel bajo, y con respuestas que pueden ser perjudiciales en los niveles más altos o ante la exposición prolongada a las ROS (Videla, 2010). Dependiendo de los niveles de ROS, que pueden variar según el sistema en estudio, se ha propuesto que diferentes factores de transcripción redox sensibles se activan y coordinan respuestas biológicas distintas. Un bajo nivel de estrés oxidativo induciría al factor nuclear eritroide redox sensible 2 (Nrf2), un factor de transcripción implicado en la transactivación del gen que codifica para la expresión de las enzimas antioxidantes. Una cantidad intermedia de ROS desencadenaría una respuesta inflamatoria a través de la activación del factor nuclear κB (NF-κB) y la proteína activadora 1 (AP-1), y un

alto nivel de estrés oxidativo induciría la interrupción de la transferencia de e^- , lo que resulta en la apoptosis o necrosis (Figura 5) (Gloire y col., 2006). En la mayoría de los escenarios de apoptosis, el potencial de la membrana mitocondrial interna colapsa, indicando la apertura de un canal de conductividad conocido como el poro PT, en este sentido, el alto nivel de estrés oxidativo produciría la perturbación del mismo. Mao y Franke (2013) propusieron que dentro de una cierta concentración, las ROS o las RNS podrían actuar como principales mediadores en los procesos neuroprotectores y en la lucha contra el envejecimiento y los procesos neuroprotectores. Tal fenómeno hormético podría tener potenciales aplicaciones terapéuticas, si se emplea adecuadamente.

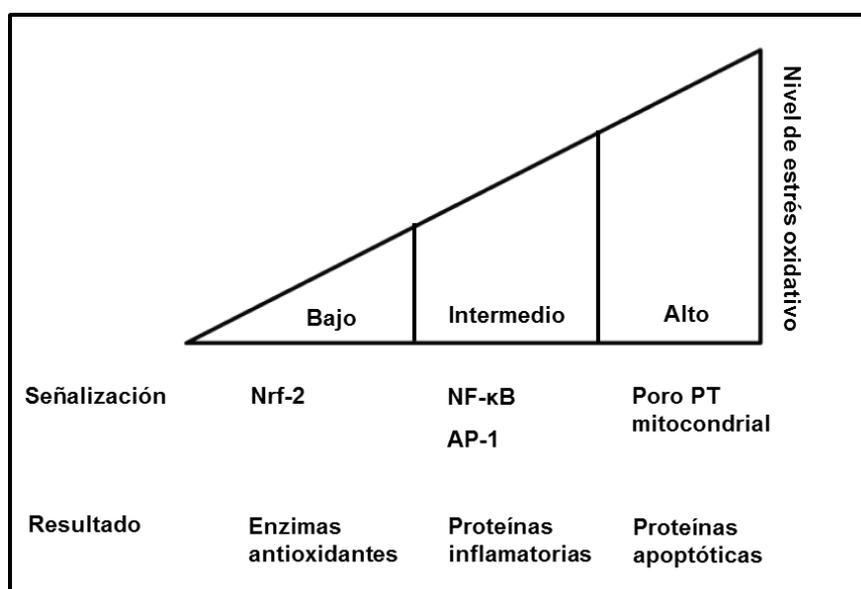


Figura 5: Modelo jerárquico de estrés oxidativo. Distintos niveles de estrés oxidativo desencadenan una respuesta inflamatoria a través de la activación de distintas vías de señalización. Figura tomada y modificada de Gloire y col. (2006).

La respuesta hormética a la exposición a Fe está relacionada con su capacidad para intercambiar un e^- bajo condiciones aeróbicas, siendo (i) esencial para la fosforilación oxidativa mitocondrial y respuestas citoprotectoras en niveles bajos; o (ii) letal debido a la generación de ROS incontrolada cuando la capacidad reguladora del Fe se supera (Pietrangelo, 2003). De acuerdo con estos puntos de vista, una baja concentración de Fe (20 μ M) induce la supervivencia de los cardiomiocitos de rata y la hipertrofia a través de un mecanismo celular que involucra la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mientras que a altas concentraciones (80 a 100

μM) se produce la necrosis de los cardiomiocitos (Muñoz y col., 2010). La protección cardíaca por Fe se ve apoyada por los hallazgos de que (i) el preconditionamiento isquémico activa una señal de Fe que conduce a la regulación positiva de la Ft (Chevion y col., 2008); y (ii) la administración de Fe a corto plazo regula la actividad de la enzima SOD (Metzler y col., 2007). La protección inducida por Fe se observó también en neuronas (Hidalgo y Núñez, 2007), las células de la oligodendroglia (Brand y col., 2008), y el hígado (Galleano y col., 2011) en distintos modelos de sobrecarga de Fe. Una administración subcrónica de Fe (50 mg Fe-dextrán/kg, 3 veces a la semana durante 2 semanas) protege al hígado contra la lesión por isquemia-reperfusión, hecho que constituye una estrategia de preconditionamiento que puede ser de interés para la aplicación clínica (Galleano y col., 2011). Esta sugerencia se basa en que las inyecciones repetidas de 100 a 125 mg/kg de complejos de Fe por vía intramuscular o intravenosa (100-125 mg/kg, 1-3 veces/semana durante 4-12 semanas) son consideradas como estrategias terapéuticas válidas y bien toleradas en los tratamientos de anemia en humanos (Silverstein y Rodgers, 2004; Bayraktar y Bayraktar, 2010). Sin embargo, la magnitud de los efectos secundarios de la sobrecarga con Fe en los tejidos extrahepáticos, tales como el cerebro, no han sido bien documentados.

Se ha propuesto que tanto la sepsis como el tratamiento con clorpromazina (CPZ) producen alteraciones oxidativas celulares.

i) La sepsis es una condición inflamatoria sistémica tras una grave infección bacteriana caracterizada por fiebre, baja presión sanguínea arterial, respuesta inflamatoria sistémica y hemocultivos bacterianos positivos (Zhang y col., 2013). Resulta en altas tasas de mortalidad (Riedemann y col., 2003). La sepsis es un problema de salud global con un aumento en la incidencia en los últimos años (Riedemann y col., 2003). Entre los patógenos más comúnmente aislados se encuentran distintas especies, entre ellas *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Muley y col., 2015). El hígado es un órgano vital del cuerpo y tiene varias funciones incluyendo la generación de energía a partir de los alimentos, el procesamiento y la excreción de los fármacos y productos de desecho en la sangre, y el filtrado de las bacterias dañinas que pueden entrar en el cuerpo a través del intestino. Diversas infecciones, incluyendo las debidas al abuso de alcohol y las infecciones virales, pueden causar daños en el hígado por lo general, de manera insidiosa. A veces, el daño hepático puede ser tan severo que el órgano es incapaz de llevar a cabo las funciones normales, lo que resulta en insuficiencia hepática (Gurusamy y col., 2014). El trasplante de hígado es eficaz en el tratamiento de la

insuficiencia hepática. Sin embargo, es un procedimiento quirúrgico importante y existe una significativa proporción de personas que desarrollan infecciones y complicaciones en la herida a causa de los medicamentos que se administran para suprimirlos inmunológicamente. Se han intentado diversas intervenciones para prevenir las complicaciones infecciosas bacterianas y complicaciones de la herida. Sin embargo, la eficacia de las mismas aún se desconoce (Gurusamy y col., 2014). La incidencia de una infección bacteriana después de un trasplante de hígado se ha informado que se produce en un 14,0 a 71,1% de los casos (Li y col., 2012; Vera y col., 2011). A pesar de la administración profiláctica de antibióticos la incidencia de infecciones postoperatorias ocurre en un rango de 10-30% en la cirugía de resección (Wade y col., 1995). A pesar de que se ha restringido el uso de antibióticos profilácticos, la aparición de resistencia a los antibióticos ha aumentado significativamente. La flora intestinal y la mucosa también se ven afectados por el trauma quirúrgico dando como resultado la disfunción de la barrera intestinal y el desequilibrio microbiano intestinal. Esto puede agravar aún más la inflamación sistémica y deprimir la función inmune (Hollenbeak y col., 2001). Todos estos factores contribuyen a un mayor riesgo a infecciones y sepsis en el período postoperatorio.

El LPS es un componente de las bacterias Gram-negativas que juega un papel importante en la lesión hepática aguda y en enfermedades crónicas del hígado, incluyendo el hígado graso, asociado ya sea con el consumo de alcohol o el síndrome metabólico y la obesidad (Nath y Szabo, 2009; Tilg y col., 2009). El LPS también está implicado en la resistencia a la insulina, así como en la esteatohepatitis, es decir en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Ghanim y col., 2009; Szabo y col., 2005; Miele y col., 2009). Existe una creciente evidencia que sugiere que el LPS derivado del intestino a través del eje intestino-hígado afecta la extensión del daño hepático en muchos tipos diferentes de enfermedades inflamatorias del hígado (Szabo y Bala, 2010). La mayoría de las infecciones luego de un trasplante hepático son causadas por bacterias de origen entérico (Dominguez, 1995). Por otra parte, eventos sistémicos inflamatorios pueden inducir la neuroinflamación en el SNC. Por ejemplo, la administración ip de LPS resulta en la muerte neuronal en el modelo de enfermedad priónica ME7 en ratón (Combrinck y col., 2002), aumenta el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) y la acumulación intracelular de proteína β amiloide ($A\beta$) (Sheng y col., 2003), y altera la actividad de transporte en la barrera hematoencefálica (Banks y col., 1999; Xaio y col., 2001). Existen estudios epidemiológicos que indican que el riesgo de EA se correlaciona positivamente con factores de riesgo proinflamatorio cardiovascular tales como la diabetes mellitus, la

hipertensión, la hipercolesterolemia y la aterosclerosis (Rosendorff y col., 2007), lo que sugiere que la inflamación sistémica crónica puede jugar un papel en el desarrollo de la EA (Butterfield y col., 2001; Morley y col., 2002).

ii) La CPZ es un neuroléptico antipsicótico perteneciente a la familia de las fenotiazinas, con una larga historia de uso clínico (Shen, 1999; Mc Naughton y col., 2001; Carpenter y Koenig, 2008). Se emplea para el tratamiento de la esquizofrenia, para aliviar las náuseas, el hipo intratable, y las manifestaciones de tipo maníaco de algunas enfermedades maníaco-depresivas. La CPZ es un inhibidor presináptico de la recaptación de serotonina produciendo efectos antidepresivo y antiparkinsoniano moderados, aunque también es la responsable de la agitación psicomotora y de la amplificación de la psicosis que a veces se observa en la clínica. Su efecto terapéutico es comúnmente atribuido a su capacidad para inhibir potentemente receptores de dopamina D₂ (Carpenter y Koenig, 2008). Sin embargo, el beneficio psiquiátrico de la CPZ está acompañado por numerosos efectos secundarios, tales como actividad antiserotoninérgica (Croll y col., 1997) y el bloqueo de los receptores α_1 postsinápticos adrenérgicos (Nedergaard y Abrahamsen, 1988). Además, se ha informado que la CPZ puede interferir con los receptores y los canales iónicos, tales como canales de Ca²⁺ (McNaughton y col., 2001).

La CPZ puede ser administrada por vía oral, parenteral y rectal. Es un fármaco altamente lipofílico que se une a una elevada proporción de las proteínas del plasma (95-98%). Las concentraciones más elevadas del fármaco se encuentran en el cerebro (Tsuneizumi y col., 1992), los pulmones y en otros tejidos muy irrigados. Después de la administración oral, sólo el 32% de la dosis aparece en su forma activa en la circulación sistémica, debido a un metabolismo hepático de primer paso. Las concentraciones máximas del fármaco se observan al cabo de 1 a 4 h de su administración. El tiempo de vida media es de 16 a 30 h (Galiano Ramos, 2008). La CPZ es altamente lipofílica, lo que facilitaría su paso a través de la bicapa lipídica y de la barrera hematoencefálica. Se ha informado que el cerebro capta $6 \pm 2\%$ de la CPZ inyectada 15 min luego de la administración de la dosis, y la concentración se mantiene constante durante 45 min (Comar y col., 1979).

Existe una gran evidencia en los últimos años que indica que las ROS juegan un papel importante en la patofisiología de la esquizofrenia. Akyol y col. (2002) evaluaron los cambios en la concentración de NO en el plasma, los niveles de TBARS, las actividades de las enzimas XO, SOD y GPx en pacientes con esquizofrenia en comparación con los individuos control normales. En los pacientes con esquizofrenia, se observó un aumento en la actividad de la enzima XO y en los niveles de NO, una

disminución de la actividad de la SOD y no se detectaron cambios en la actividad de la enzima GPx en plasma comparados con el grupo control. No se observaron efectos de la administración de CPZ sobre la duración de la esquizofrenia, o sobre el hecho de haber sido administrada a hombres o mujeres. Además, la administración de dos protocolos de dosis (bajas y altas) del tratamiento neuroléptico diario no mostró diferencias sobre los parámetros oxidantes y antioxidantes. Akyol y col. (2002) consideran que los resultados observados están principalmente relacionados con la enfermedad subyacente. Estos hallazgos indican un posible papel sobre el aumento del estrés oxidativo y la disminución de la actividad de los antioxidantes enzimáticos, los cuales pueden ser relevantes para la fisiopatología de la esquizofrenia. Por otro lado, el aumento de la producción de NO por el efecto sobre la actividad de las enzimas NOSs sugiere un posible papel del NO en el proceso fisiopatológico de la esquizofrenia. Estos resultados también pueden permitir la formulación de nuevas estrategias de tratamiento con antioxidantes e inhibidores de la NOS en la esquizofrenia (Akyol y col., 2002). Recientemente, Li y col. (2014) han demostrado que una sola inyección ip de CPZ en dosis de 5, 10 y 20 mg/kg, podría ejercer un efecto neuroprotector significativo sobre el daño al cerebro causado por esquizofrenia. Este intervalo de concentraciones podría activar los canales de K⁺ activados por Ca (BKCa) y sugieren que la CPZ en concentraciones terapéuticas juega un papel neuroprotector en el cerebro frente a la isquemia. En consistencia con estas observaciones, la CPZ ha demostrado ser capaz de ejercer efecto neuroprotector en la isquemia de la médula espinal (Sader y col., 2002), la neurotoxicidad inducida por el glutamato (Stone y Pilowsky, 2007), y la apoptosis neuronal inducida por etanol (Wu y col., 2011). Sin embargo, Pillai y col. (2007) informaron sobre el efecto de la exposición a la CPZ (10 mg/kg/día) en la expresión de las enzimas CAT y SOD y los niveles de peroxidación de lípidos en el cerebro de rata, luego de 90 y 180 días de exposición. La actividad y la expresión de CAT y SOD disminuyeron luego de ambos períodos, y la peroxidación de lípidos se vio incrementada. Estos datos pueden ser de gran ayuda en la planificación del uso de CPZ a largo plazo para el tratamiento de la esquizofrenia.

1.8- Espectroscopía de Resonancia Paramagnética (EPR)

La técnica de EPR es el único método directo que se conoce para la detección de RI[•]. Es un tipo de espectroscopía de absorción que se fundamenta en las propiedades magnéticas de los e⁻ desapareados y su entorno molecular. Al aplicar una radiación de microondas a una muestra, se producen transiciones de e⁻ desapareados

entre distintos niveles de energía magnética. El proceso físico que da origen a la separación entre niveles energéticos en la materia es el efecto Zeeman, de interacción entre un campo magnético externo y el momento magnético de los e^- .

El espectrómetro de EPR consta de una cavidad donde se coloca la muestra, una fuente de microondas, un puente de microonda, dos electromagnetos que generan el campo magnético externo y un diodo (Figura 6).

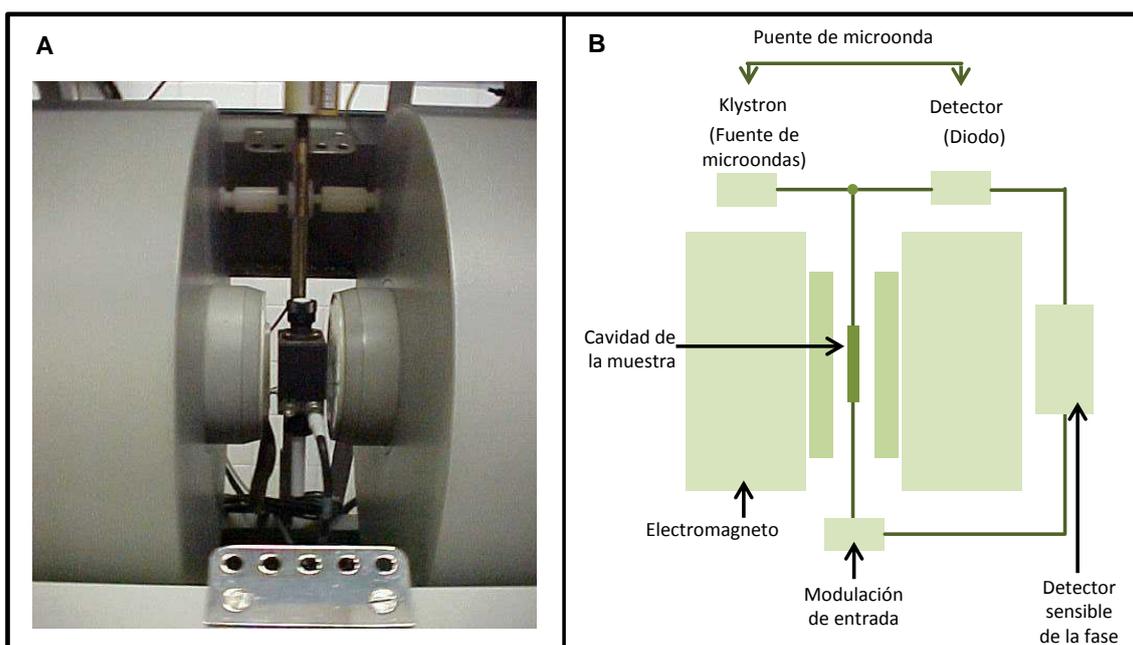


Figura 6: **A.** Imagen del equipo de EPR EMX plus Banda X. **B.** Figura esquemática indicando los componentes: cavidad, fuente de microondas, puente de microonda y electromagneto. Figura tomada y modificada de Química Física Atkins, 8ª Edición (2008).

Existen diversas especies paramagnéticas, algunas poseen un número impar de e^- y otras poseen e^- con espines paralelos. Numerosos sistemas satisfacen esa condición, como los RI^\bullet , birradicales y algunos iones de metales de transición. Un e^- desapareado posee un espín S de valor $\frac{1}{2}$. La rotación del e^- genera un campo magnético orientado a lo largo del eje de rotación, que produce un campo magnético μ asociado a su espín, que puede definirse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu = -gM_S\beta \quad [1]$$

donde g es el factor de desdoblamiento espectroscópico, cuyo valor es afectado por el entorno del e^- (2,00232 para un e^- libre); M_S , es el número cuántico del espín electrónico que puede tener valores de $+\frac{1}{2}$ o $-\frac{1}{2}$; y β la constante de Bohr (momento angular magnético del $e^- = 9,2741 \times 10^{-24} \text{ J Tesla}^{-1}$), es un factor de conversión de

momento angular a momento magnético. En ausencia de un campo magnético externo, los e^- desapareados se encuentran alineados al azar. La aplicación de un campo magnético externo (B^0) produce una alineación de los campos magnéticos de los e^- y establece dos niveles de energía (Figura 7 A). El e^- del nivel magnético inferior tiene el momento magnético del espín alineado con la dirección del campo magnético aplicado con un valor de $M_s = -1/2$. El e^- de mayor nivel energético queda alineado de forma antiparalela al campo magnético ($M_s = +1/2$).

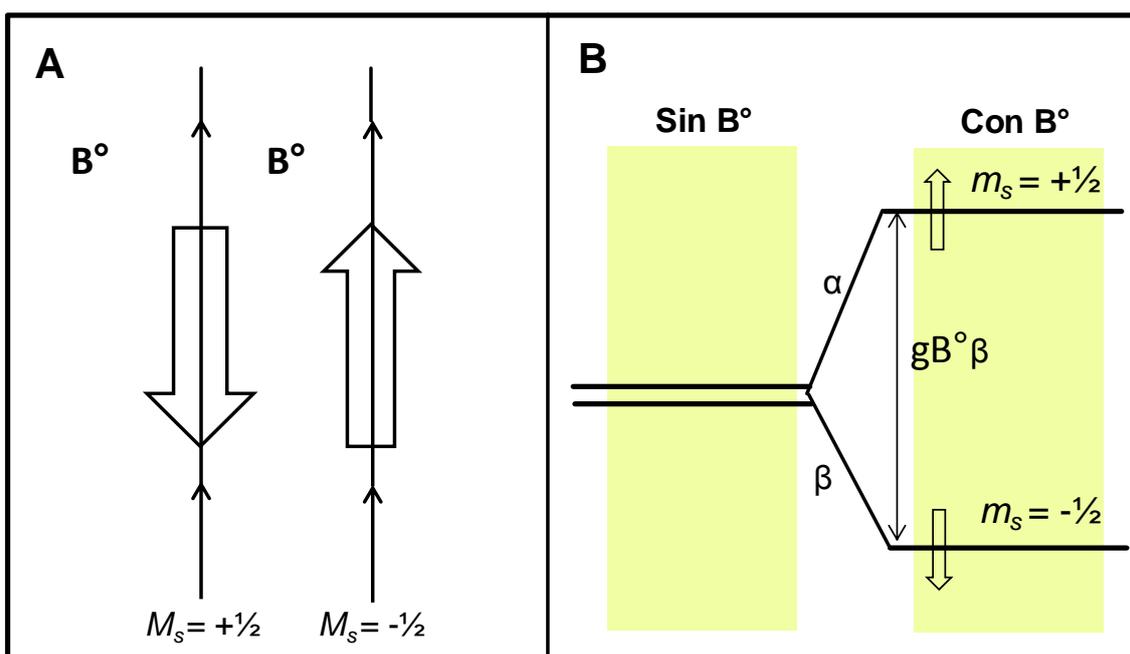


Figura 7: **A.** Alineación del espín electrónico frente a la aplicación de un campo magnético. **B.** Dependencia de la diferencia de energía con el campo magnético, β : constante de Bohr; g = factor de desdoblamiento espectroscópico; B^0 = Campo magnético aplicado. Figura tomada y modificada de Química Física Atkins, 8ª Edición (2008).

El valor de la diferencia entre los dos estados de energía está dado por la ecuación [2].

$$\Delta E = gB^0\beta = h\nu \quad [2]$$

La transición de un estado de energía a otro puede ser inducida por una radiación electromagnética de frecuencia ν (Figura 7 B). En los espectrómetros de banda X, $\nu = 9,4$ GHz. En ausencia de campo magnético, ambos estados de espín poseen la misma energía y la diferencia entre los dos estados aumenta linealmente con el aumento del campo magnético (Simontacchi y col., 2011 b). El factor g se calcula según la ecuación [3].

$$g = 0,71446 \times \nu/B^\circ \quad [3]$$

donde ν es la frecuencia de microonda aplicada y B° es el valor del campo magnético en resonancia. El valor de g es 2,00232 si el e^- libre es la única fuente de magnetismo, pero ese valor se ve afectado si dicho e^- desapareado se acerca a otros orbitales.

La mayor parte de las moléculas con número par de e^- no presentan momento magnético neto debido a sus e^- porque usualmente los espines de los e^- unidos a moléculas se encuentran apareados, es por eso que no dan lugar a un espectro de EPR. En la mayor parte de los RI^\bullet orgánicos, el factor g tiene un valor cercano al del e^- libre debido a que el e^- desapareado se encuentra en la periferia de la especie a la que está asociado. El e^- desapareado es muy sensible a campos magnéticos adyacentes (usualmente el del núcleo del átomo que lleva el e^-). Esta interacción provoca un fraccionamiento de la señal originada en líneas cuyo número e intensidad están definidas por el número de núcleos que interaccionan con el e^- . En general, el fraccionamiento de una señal de EPR (interacción hiperfina) está dado por la fórmula $2I + 1$, donde I es el número cuántico de espín nuclear.

Sólo es posible detectar por EPR en forma directa los radicales estables, relativamente estables que se acumulan hasta una concentración detectable, y los radicales inestables que llegan a una concentración de estado estacionario suficientemente alta. Muchos RI^\bullet de interés biológico, sin embargo, son altamente reactivos y nunca llegan a una concentración lo suficientemente elevada para ser detectados por EPR. Además, algunos radicales, como el NO, no son observables por EPR a temperatura ambiente dado que sus tiempos de relajación de espín son muy breves. A los efectos de permitir la detección de estas especies se utiliza una molécula diamagnética (atrapador de espín, A) para atrapar al inicialmente inestable RI^\bullet , formando un aducto paramagnético estable que puede ser observado a temperatura ambiente (RA^\bullet) (reacción 17)



Las constantes de acoplamiento hiperfino pueden proveer información para la identificación y cuantificación del radical original (Swartz y Swartz, 1983). Dado que el aducto estable se acumula, el atrapamiento de espín es un método integrativo de medida de RI^\bullet y es más sensible que los procedimientos que sólo miden concentraciones instantáneas o de estado estacionario. Los atrapadores de espín más

extensamente empleados para el estudio de RI^\bullet centrados en carbono y en O_2 son del tipo nitronas y nitroso compuestos (Buettner, 1987).

La técnica de EPR informa sobre las propiedades magnéticas de los e^- desapareados y su entorno molecular (Tarpey y col., 2004), combinado con la técnica de *spin trapping* (mediante la utilización de atrapadores de spin), han demostrado ser una herramienta apropiada para identificar los RI^\bullet formados en los tejidos en condiciones normales, así como condiciones de estrés biológicamente importantes. Tanto RI^\bullet como otras especies paramagnéticas, y muchos metales de transición se pueden identificar inequívocamente mediante espectroscopía EPR, en comparación con otras técnicas estándar. La combinación de técnicas de EPR con técnicas bioquímicas ha permitido desarrollar protocolos aplicables a sistemas biológicos complejos. Un claro ejemplo es la determinación del índice contenido de A^\bullet /contenido de AH^\cdot como índice del balance oxidativo celular en el medio hidrofílico (Galleano y col., 2002). El AH^\cdot posee un bajo potencial redox, lo que le permite donar un e^- a casi cualquier RI^\bullet de un sistema biológico o reducir un atrapador de radicales biológicos como el α -T (Vergely y col., 2003). El A^\bullet tiene un e^- desapareado dándole la estabilidad como el "antioxidante terminal de molécula pequeña" (Buettner, 1993). La concentración de A^\bullet es un valor de estado estacionario determinado por las velocidades de generación y decaimiento de estas especies. Puede formarse mediante un proceso de oxidación del AH^\cdot mediada o no por la catálisis de un metal como el Fe (Martell, 1982).

1.9- Hipótesis y Objetivos.

La hipótesis de trabajo plantea que *I) la sobrecarga aguda con una dosis no tóxica de Fe, y el precondicionamiento con dosis no tóxicas de Fe, son capaces de disparar una respuesta diferencial en cerebro que conduce a disminuir los efectos oxidativos generados por otros disparadores de estrés oxidativo, y II) que los mecanismos que subyacen en dichas respuestas son diferentes condicionando el posterior efecto de la nueva condición de exposición a estrés oxidativo.*

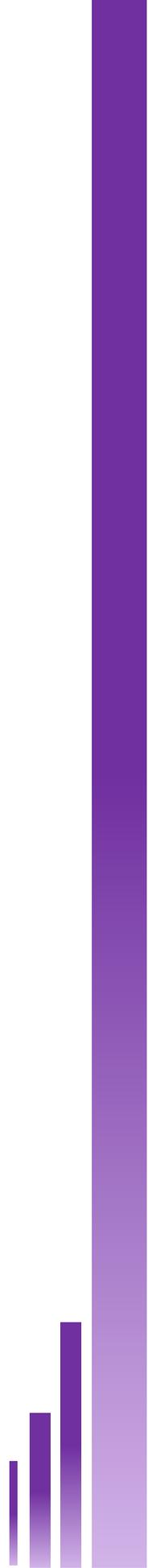
El objetivo general de este trabajo de tesis es el estudio, en cerebro, de los mecanismos vinculados al efecto de la sobrecarga con Fe en relación a la alteración al metabolismo oxidativo en un modelo agudo y subcrónico de exposición a Fe. Se plantea analizar cómo se verán afectados, el contenido de Fe y el LIP frente a la exposición de las células a la sobrecarga de Fe *in vivo*, analizando el efecto oxidativo, y el establecimiento de una respuesta hormética.

Objetivo 1: Caracterizar el efecto de la sobrecarga aguda *in vivo* con Fe sobre el metabolismo oxidativo en cerebro.

Objetivo 2: Caracterizar el efecto del tratamiento subcrónico con Fe *in vivo* sobre el metabolismo oxidativo en cerebro.

Objetivo 3: Análisis de las interacciones entre el Fe y el LPS en condición de sobrecarga aguda y subcrónica de Fe.

Objetivo 4: Análisis de las interacciones entre el Fe y la CPZ en condición de sobrecarga subcrónica de Fe.



2.- Materiales y Métodos

2.1- Modelos experimentales

2.1.1- Modelo de sobrecarga aguda de Fe

Se utilizaron ratas Sprague–Dawley macho de 180 ± 10 g y 45 ± 5 días, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad con acceso al alimento y la bebida *ad libitum*. La sobrecarga de Fe, fue realizada mediante la inyección ip con una única dosis de 500 mg/kg de Fe-dextrán. Las ratas control fueron inyectadas ip con solución fisiológica (NaCl 0,9% P/V). Luego de los tiempos indicados en cada caso, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero a distintos tiempos post-administración de Fe (Figura 8). Dichas muestras fueron utilizadas inmediatamente para realizar las determinaciones correspondientes y/o se reservaron en N₂ líquido hasta su posterior análisis. Las ratas recibieron los cuidados de acuerdo con la reglamentación de la Disposición N° 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Los protocolos experimentales y los procedimientos realizados con animales, fueron realizados cumpliendo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Academia Nacional de Ciencias, Publicación NIH 6–23, revisada en 1985).

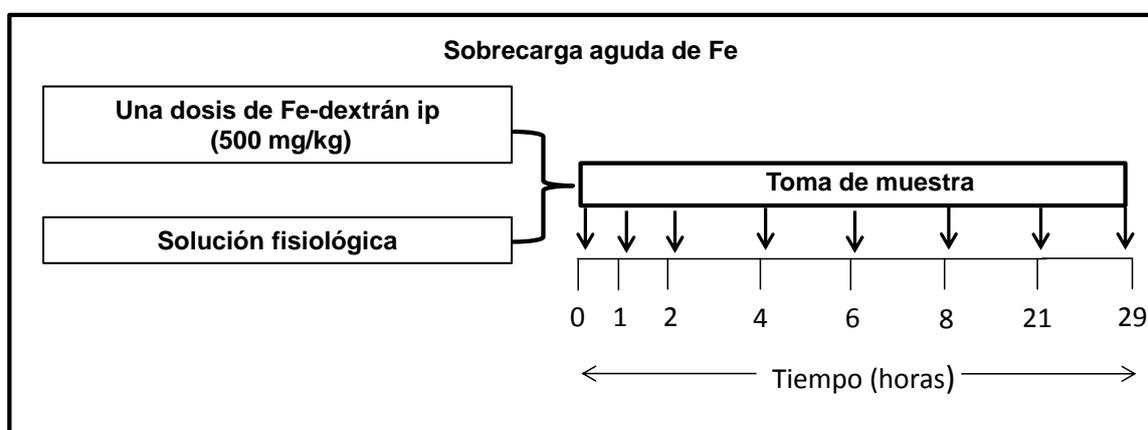


Figura 8: Esquema temporal del modelo de sobrecarga aguda de Fe. Luego de la administración de la dosis de Fe-dextrán o solución fisiológica, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero a los tiempos definidos luego de la administración de la única dosis.

2.1.2- Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 180 ± 10 g y 45 ± 5 días, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad con acceso al alimento y la bebida *ad libitum*. Los animales fueron inyectados cada 48 h en forma ip con 6 dosis de 50 mg/kg de Fe-

dextrán. Las ratas pertenecientes al grupo de animales control recibieron la misma cantidad de dosis ip de solución fisiológica (6 dosis). Luego de la administración de la 6^{ta} dosis, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y el cerebro entero fue aislado a los tiempos definidos (Figura 9). Dichas muestras fueron utilizadas inmediatamente para realizar las determinaciones correspondientes y/o se reservaron en N₂ líquido hasta su posterior análisis.

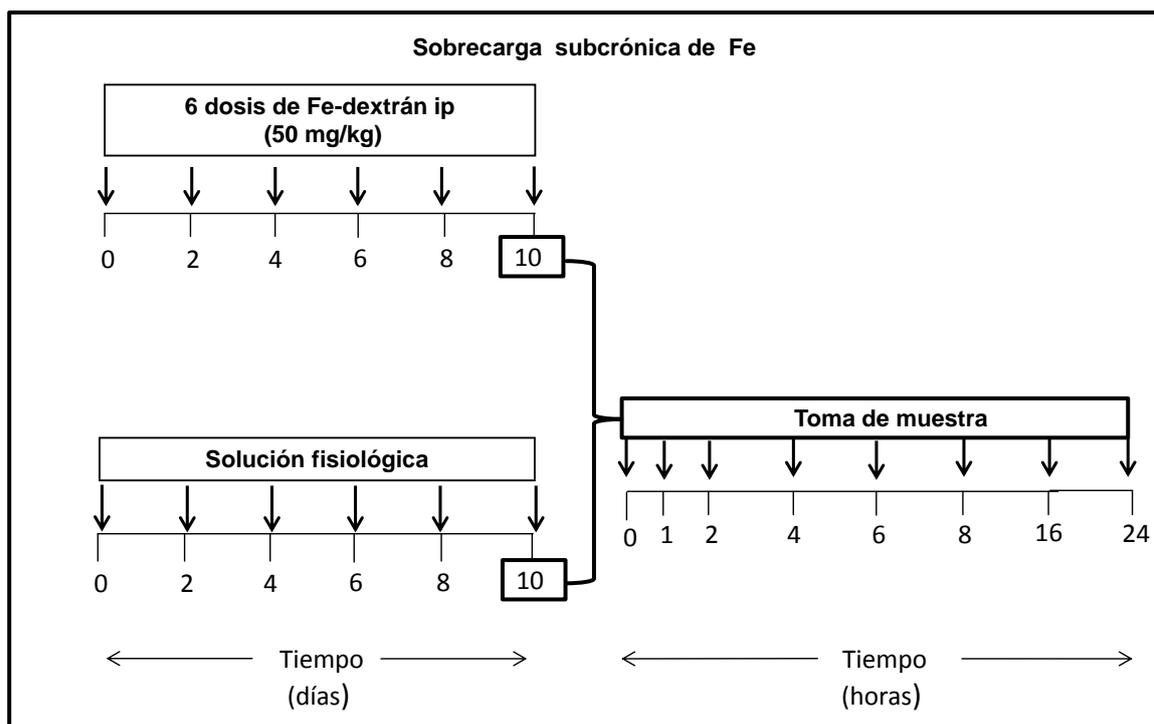


Figura 9: Esquema temporal del modelo de sobrecarga subcrónica de Fe. Luego de la administración de la 6^{ta} dosis, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero a los tiempos definidos luego de la administración de la 6^{ta} dosis.

2.1.3- Modelo de sobrecarga aguda de Fe y LPS

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 180±10 g y 45±5 días, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad con acceso al alimento y la bebida *ad libitum*. Los animales fueron inyectados en forma ip con una única dosis de 500 mg/kg de Fe-dextrán y/o 4 mg/kg de LPS de *Escherichia coli* (serotipo 0127:B8). Las ratas control fueron inyectadas ip con solución fisiológica (Figura 10). Luego de la administración de la dosis, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero 6 h pi. Dichas muestras fueron utilizadas inmediatamente para realizar las determinaciones correspondientes y/o se reservaron en N₂ líquido hasta su posterior análisis.

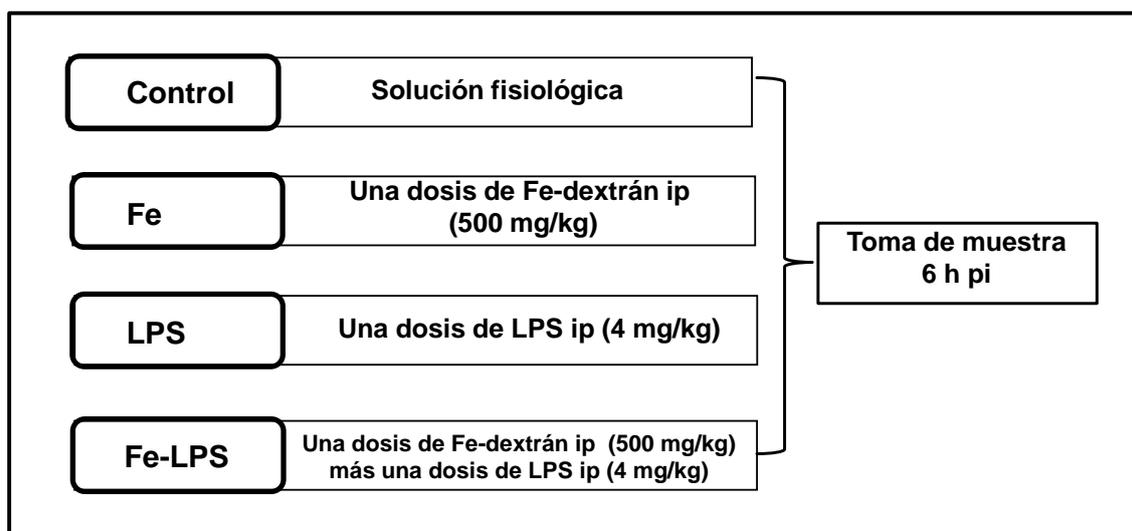


Figura 10: Esquema temporal del modelo esquemático de sobrecarga aguda de Fe y LPS. Luego de 6 h de la administración de la dosis de Fe-dextrán y/o LPS, o solución fisiológica, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero.

2.1.4- Modelo para sobrecarga subcrónica de Fe y LPS

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 180±10 g y 45±5 días, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad con acceso al alimento y la bebida *ad libitum*. Fueron inyectadas cada 48 h en forma ip con 6 dosis de 50 mg/kg de Fe-dextrán. Las ratas control recibieron la misma cantidad de dosis ip de solución fisiológica. Luego de 72 h de la administración de la 6^{ta} dosis, las ratas fueron inyectadas con 4 mg/kg de LPS de *Escherichia coli* (serotipo 0127:B8). Luego de 6 h, las ratas fueron anestesiadas en cámara de CO₂ (Figura 11). Dichas muestras fueron utilizadas inmediatamente para realizar las determinaciones correspondientes y/o se reservaron en N₂ líquido hasta su posterior análisis.

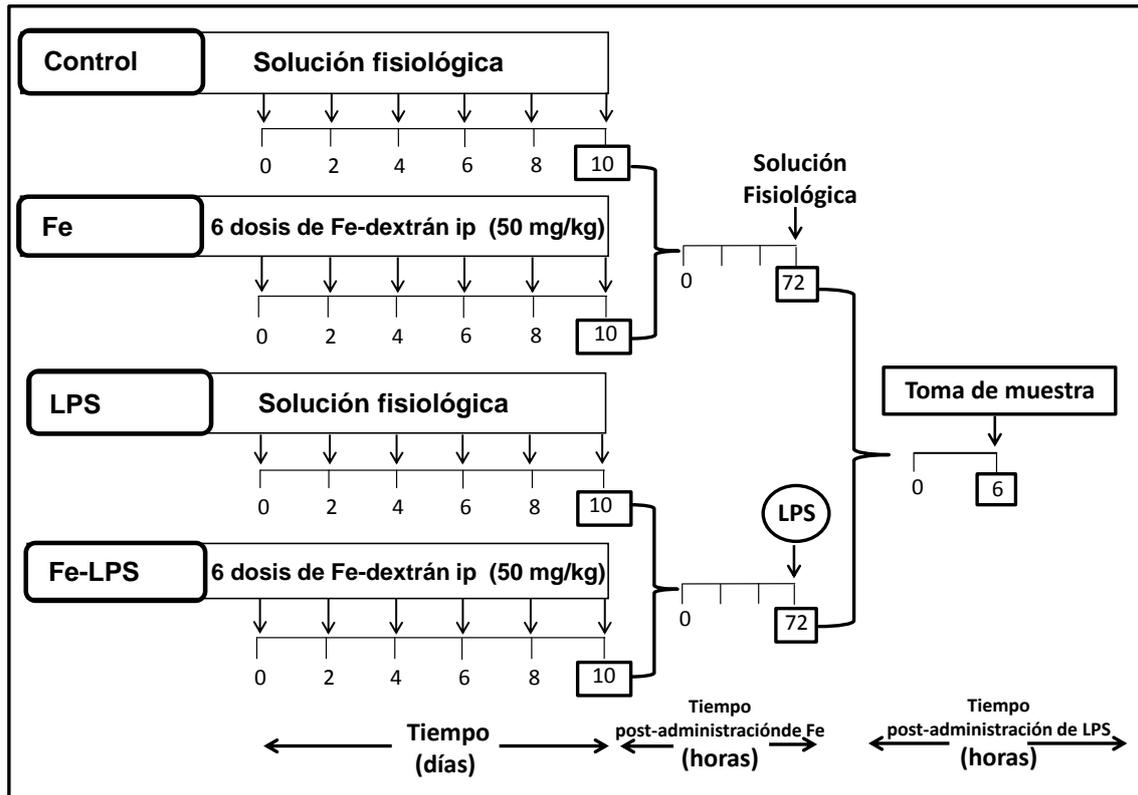


Figura 11: Esquema temporal del modelo esquemático de sobrecarga subcrónica de Fe y LPS. Luego de 72 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, las ratas recibieron una dosis de LPS de 4 mg/kg de peso ip o solución fisiológica. Luego de 78 h fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero.

2.1.5- Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe y CPZ

Se utilizaron ratas Sprague–Dawley macho de 180±10 g y 45±5 días, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad con acceso al alimento y la bebida *ad libitum*. Los animales fueron inyectados con 6 dosis de 50 mg/kg de Fe-dextrán, una cada 48 h. Las ratas control recibieron la misma cantidad de dosis ip de solución fisiológica. Luego de 8 h de administración de la 6^{ta} dosis de Fe o solución fisiológica, las ratas recibieron una dosis de CPZ 10 mg/kg de peso ip (disuelta en solución fisiológica) o solución fisiológica. Luego de 1 a 4 h fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero (Figura 12). Dichas muestras fueron utilizadas inmediatamente para realizar las determinaciones correspondientes y/o se reservaron en N₂ líquido hasta su posterior análisis.

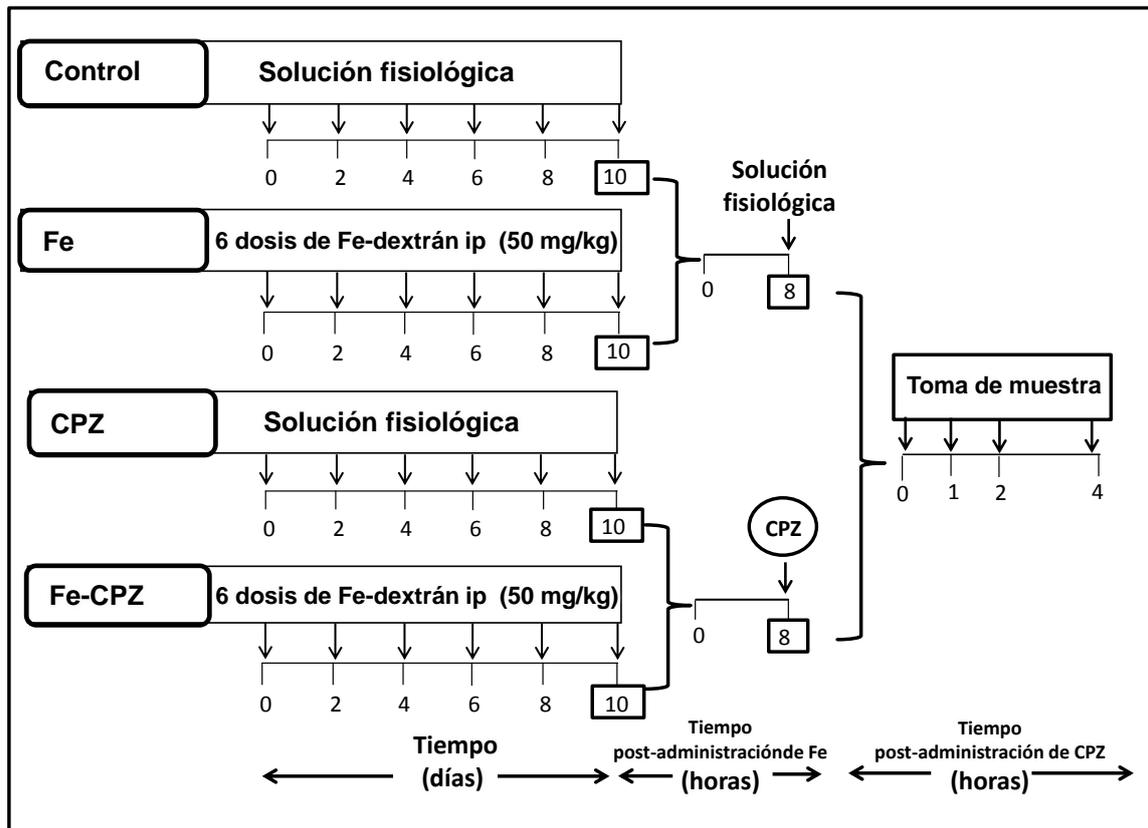


Figura 12: Esquema temporal del modelo esquemático de sobrecarga subcrónica de Fe y CPZ. Luego de 8 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, las ratas recibieron una dosis de CPZ 10 mg/kg de peso ip o solución fisiológica. Luego de 9, 10 o 12 h fueron anestesiadas en cámara de CO₂ y se obtuvo el cerebro entero.

2.1.6- Obtención de áreas cerebrales

Luego de la administración de la única dosis de Fe-dextrán en el modelo agudo o de la 6^{ta} dosis en el modelo subcrónico, a distintos tiempos t_i , se procedió a la separación de las tres áreas cerebrales: la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, según Czerniczyniec y col. (2011).

La coloración característica de los órganos internos (cerebro, hígado) de las ratas tratadas con exceso de Fe se tomó como un indicador macroscópico de la adecuada administración de Fe-dextrán (Figura 13).

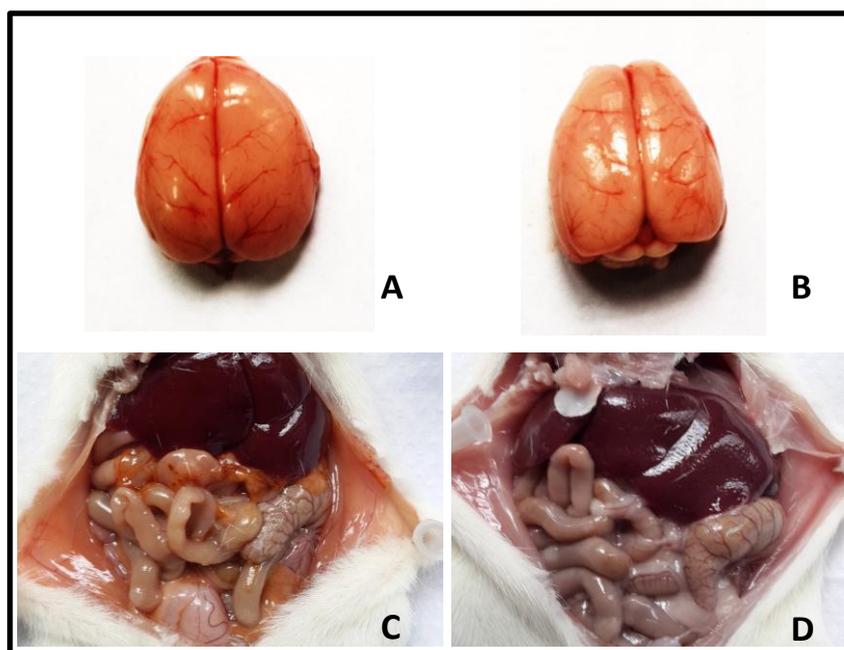


Figura 13: Imagen **A.** de cerebro de rata tratada con sobrecarga aguda de Fe (500 mg/kg); **B.** Imagen de cerebro de rata control; **C.** Imagen de región abdominal de rata expuesta a sobrecarga aguda de Fe luego de 6 h de la administración de la dosis; **D.** región abdominal de rata control inyectada con solución fisiológica.

2.2- Caracterización de la distribución de Fe en cerebro

2.2.1- Determinación del contenido total de Fe

Las muestras de tejido cerebral se colocaron en una estufa a 60°C hasta peso constante, que habitualmente se logra luego de aproximadamente 48 h. El tejido seco se mineralizó en presencia de HNO₃ concentrado de acuerdo con Laurie y col. (1991). El contenido de Fe total se determinó espectrofotométricamente después de la reducción con ácido tioglicólico (TGA), midiendo la absorbancia a $\lambda=535$ nm en presencia de batofenantrolina sódica, según Brumby y Massey (1967). Todos los reactivos fueron preparados en agua libre de Fe obtenida mediante el tratamiento de H₂O milli-Q con resina Chelex 100 hasta lograr un pH superior a 9.

2.2.2- Determinación del LIP

El LIP fue determinado mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando el sensor calceína (CA), según Robello y col. (2007). Las muestras de cerebro se homogeneizaron en concentración 500 mg/ml en solución reguladora 40 mM de fosfato de potasio, 120 mM de KCl, pH 7,4. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000g, 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se pasaron a través de filtros de peso molecular 30.000. Las soluciones filtradas fueron reducidas por 10 min con 1 volumen

de TGA al 8% (V/V). En la solución reducida, el Fe se midió utilizando solución de CA 1 mM en solución reguladora 40 mM de fosfato de potasio, 120 mM de KCl, pH 7,4.

Cuando el Fe se agrega a la solución de CA, una fracción de la misma se une al Fe^{2+} libre, generando un complejo no fluorescente (CA-Fe), una fracción queda como CA libre fluorescente en la solución (CA_1) y otra fracción como Fe libre (Fe_1). El complejo no fluorescente y la fracción CA_1 se encuentran en equilibrio según la reacción (18) (Epsztejn y col., 1997; Espósito y col., 2002; Darbari y col., 2003).



La constante de disociación K_d (Robello y col., 2007) se puede expresar según la ecuación [4]

$$K_d = \frac{[\text{CA}_1] \times [\text{Fe}_1]}{[\text{CA-Fe}]} \quad [4]$$

Luego de conocer el valor de K_d , fue posible conocer el valor de $[\text{Fe}_1]$ según la ecuación [5]

$$[\text{Fe}_1] = \frac{K_d \times [\text{CA-Fe}]}{[\text{CA}_1]} \quad [5]$$

Según la reacción 18, sólo una parte del Fe catalíticamente activo presente en el sistema está unido a la CA, en forma de CA-Fe, mientras que la otra fracción se encuentra no unida a la CA en solución (Fe_1). Entonces, el contenido del Fe catalíticamente activo total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$) presente en el sistema es expresado por la ecuación 6:

$$\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+} = [\text{CA-Fe}] + [\text{Fe}_1] \quad [6]$$

Reemplazando la $[\text{Fe}_1]$ por su igualdad en la ecuación [5] se obtiene la ecuación [7]

$$\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+} = [\text{CA-Fe}] + \frac{K_d \times [\text{CA-Fe}]}{[\text{CA}_1]} \quad [7]$$

Para calcular el contenido de Fe catalíticamente activo total presente en el sistema es necesario conocer el valor de K_d para el Fe y las concentraciones resultantes de CA-Fe y de CA_1 , cuando se realiza la reacción entre la CA con el Fe en cada sistema. Este valor fue calculado por Robello y col. (2007) en la solución reguladora de fosfato de potasio 40 mM, KCl 120 mM, pH=7,4 y resultó $K_d = 0,46 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Todos los reactivos fueron preparados en agua libre de Fe.

La fluorescencia fue monitoreada a $\lambda_{\text{exc}}=497 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=518 \text{ nm}$ hasta estabilización de la señal (F_1), posteriormente se adicionó DF en una concentración final de 800 μM . La fluorescencia se monitoreó hasta una nueva estabilización de la señal (F_2). De este modo se definió al incremento fraccional de la fluorescencia (ΔF) según la ecuación [8].

$$\Delta F = \frac{F_2 - F_1}{F_2} \quad [8]$$

El incremento fraccional de la fluorescencia (ΔF) correlaciona con la concentración Fe^{2+} que se une a la CA (Darbari y col., 2003). La ecuación [9] fue empleada para calcular la concentración de Fe catalíticamente activo total presente en todos los sistemas analizados en este trabajo.

$$\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+} = [\text{CA}] \times \Delta F + \frac{K_d \times \Delta F}{(1 - \Delta F)} \quad [9]$$

La determinación del contenido de LIP en un sistema modelo de células de cerebro (20×10^6 células), fue realizada por EPR en forma directa a baja temperatura (77 K) (Woodmansee y Imlay, 2002). Para la determinación de los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} por esta metodología, las células fueron homogeneizadas en 1 ml de una solución reguladora de Tris-HCl 10 mM, KCl 120 mM, pH = 7,4, conteniendo DF 1 mM. Las mediciones fueron realizadas usando los siguientes parámetros instrumentales: frecuencia de modulación 50 kHz, potencia de microondas 20 mW, frecuencia de microondas 9,42 GHz, centro de campo 1.600 G, constante de tiempo 81,92 ms, amplitud de modulación 4.759 G y ancho de barrido 800 G. Para cuantificar el contenido de $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ se utilizó como estándar una solución de FeCl_3 preparada en HCl 200 μM , con la cual se realizó una curva de calibración en presencia Tris-HCl 10 mM, KCl 120 mM, pH = 7,4, conteniendo DF 1 mM.

2.3- Ensayos específicos

2.3.1- Detección de A[•] por EPR

Las determinaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker EMX plus Banda X (Karlsruhe, Germany). Los tejidos cerebrales se homogeneizaron en dimetilsulfóxido (DMSO), en una concentración de 25 mg/ml e inmediatamente fueron transferidos a una pipeta Pasteur de vidrio para la detección de A[•]. Los parámetros utilizados durante las determinaciones fueron los siguientes: frecuencia de modulación 50 kHz, potencia de microonda 10 mW, frecuencia de microonda 9,75 GHz, centro de campo 3520 G, constante de tiempo 40,96 ms, tiempo de barrido 82 ms, tiempo de conversión 16 ms, amplitud de modulación 1G, ancho de barrido 15.000 G, ganancia 1.000. La cuantificación del contenido de A[•] se llevó a cabo utilizando una solución acuosa de 2,2,5,5-tetrametil piperidina-1-oxilo (TEMPO) de acuerdo a Kotake y col. (1996), colocado en la misma pipeta utilizada para la determinación del A[•] en la muestra. El espectro de EPR de la muestra y de la solución de TEMPO fueron obtenidos exactamente en las mismas condiciones experimentales. La primera derivada fue doblemente integrada para obtener el área de la señal.

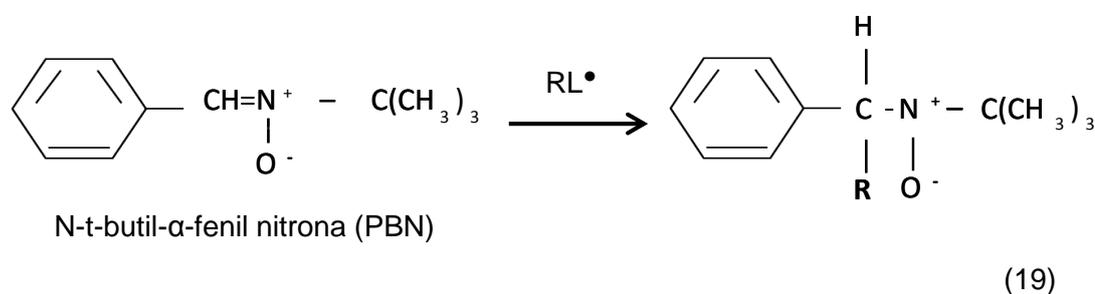
2.3.2- Determinación del contenido de AH⁻

Los tejidos cerebrales fueron homogeneizados en concentración 10 mg/ml en ácido metafosfórico (MPA) 10% (P/V). Luego se centrifugaron durante 10 min a 12.000g. El sobrenadante fue filtrado a través de membranas de nylon de 0,22 µm. La cuantificación del contenido de AH⁻ se llevó a cabo en la solución filtrada empleando un equipo de HPLC (Perkin-Elmer) en fase reversa, modalidad isocrática, con detector electroquímico (potencial de oxidación +0,6 V) de acuerdo a Kutnink y col. (1987). Se utilizó una columna Supercosil LC-18, que fue estabilizada con la fase móvil MPA 0,8% (V/V). Debido a las características del equipo se inyectó un volumen fijo de 20 µl de muestra. La cromatografía se realizó con un flujo constante de 1 ml/min y se utilizó como estándar ácido L-ascórbico (Sigma) preparado en concentración 10 mg/ml en MPA 10% (P/V) inmediatamente antes de ser utilizado.

2.3.3- Detección de la velocidad de generación de RL[•] por EPR

Los RL[•] fueron detectados mediante una técnica de *spin trapping* (reacción 19) utilizando N-t-butil-α-fenil nitrona (PBN). Se preparó una solución stock de PBN 40 mM en DMSO inmediatamente antes de ser utilizada. Los tejidos cerebrales fueron homogeneizados en PBN-DMSO en una concentración de 25 mg/ml, incubados

durante 30 min a 37°C e inmediatamente transferidos a una pipeta Pasteur para la detección de RL^\bullet . Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente en el espectrómetro Bruker EMX plus banda X utilizando los siguientes parámetros: frecuencia de modulación 50 kHz, frecuencia de microondas 9,88 GHz, centro de campo 3.515 G, constante de tiempo 81,92 ms, tiempo de conversión 82,00 ms, tiempo de barrido 83,97 ms, amplitud de modulación 1,20 G, ancho de barrido 100 G, ganancia 1×10^5 , potencia de microondas 20 mW. La cuantificación del contenido de los RL^\bullet fue realizada utilizando una solución acuosa de TEMPO. A los espectros de EPR de las muestras y del TEMPO se les realizó la doble integral para obtener la intensidad del área y luego la concentración del aducto se calculó de acuerdo a Kotake y col. (1996).



2.3.4- Contenido de TBARS

El contenido de TBARS se determinó según Boveris y Puntarulo (1998), con modificaciones, mediante un ensayo de fluorescencia. Para ello, 50 mg de tejido cerebral se homogeneizaron en 1 ml de solución reguladora de fosfato de potasio 40 mM, KCl 120 mM pH 7,4. A una alícuota de 0,1 ml de homogeneizado se le adicionaron 50 μ l de butilhidroxitolueno (BHT) 4% (P/V) y 250 μ l de dodecil sulfato de sodio 3% (P/V). Luego de mezclar, se adicionó 1 ml de HCl 0,1 N, 150 μ l de ácido fosfotúngstico 10% (P/V), y 500 μ l de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,7% (P/V). La mezcla fue incubada durante 45 min a 100°C. Se realizó la extracción del aducto malondialdehído-TBA (MDA-TBA) empleando 1 ml de n-butanol y en ese extracto se determinó la concentración de TBARS por medidas de fluorescencia en un espectrofluorómetro ($\lambda_{\text{ex}}=515$ nm; $\lambda_{\text{em}}=555$ nm). Se utilizó como estándar una solución preparada a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en el rango de 0,1 a 2 nmoles.

2.3.5- Actividad de la enzima SOD

La actividad de la enzima SOD fue determinada espectrofotométricamente, midiendo la reducción del Cit c. El O_2^\bullet es generado enzimáticamente por el sistema xantina-XO. El O_2^\bullet reduce al Cit c, que en su forma reducida absorbe a $\lambda=550$ nm

(Figura 14 A). La adición de la enzima SOD determina un decrecimiento en la formación de producto con respecto a la determinación realizada en ausencia de la muestra.

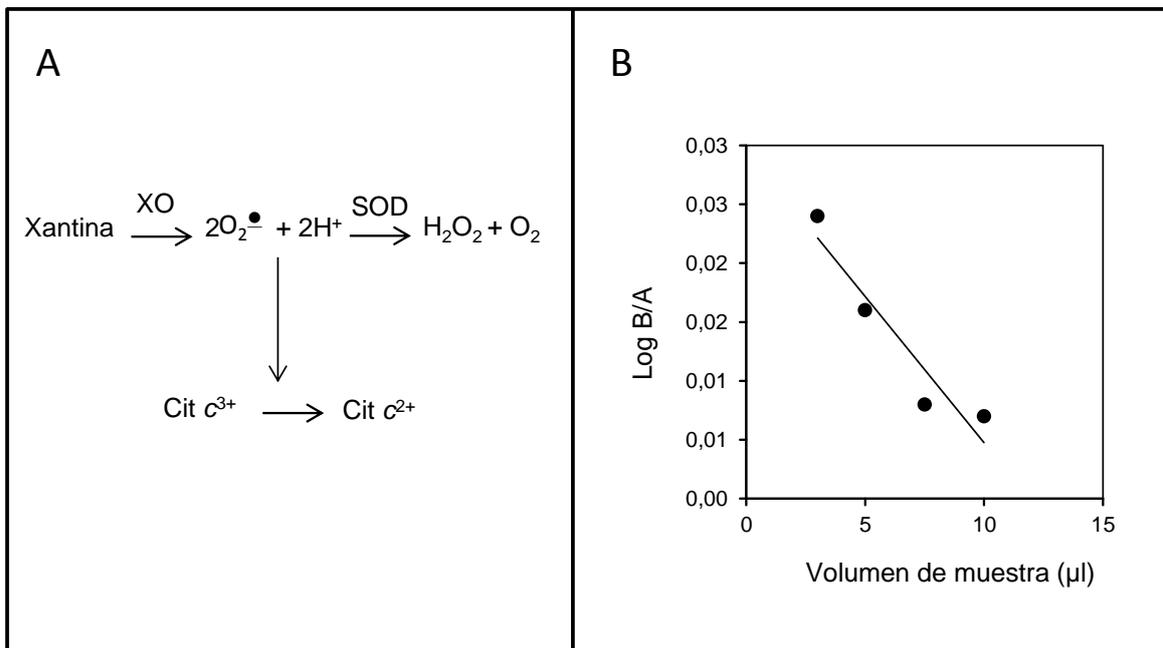


Figura 14: **A.** Esquema de reacciones que ocurren en la determinación de la actividad de SOD según el sistema xantina-XO. **B.** Gráfico de log B/A en función del volumen de una muestra tipo.

Los homogeneizados de tejido cerebral se prepararon en una relación 1:9 (P/V) en solución reguladora fosfato de potasio 30 mM con KCl 120 mM, pH 7,4. Las determinaciones se realizaron en solución reguladora fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8, etilendinitrototetracetado disódico (EDTA) 0,1 mM, empleando Cit c^{3+} 400 μM preparado en fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4 y xantina 500 μM preparada en NaOH 1×10^{-3} N. La cantidad de XO fue ajustada de forma tal que se registre un aumento de absorbancia de 0,025 unidades por min a temperatura entre 20-25°C. Se registró la absorbancia en función del tiempo a $\lambda=550$ nm. Luego del agregado de la muestra se registró la velocidad de disminución de la absorbancia ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$). Monitoreando el cambio de absorbancia durante 2 min se determinó la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}_A=A$. A continuación se repitió la determinación agregando volúmenes de muestra variable y se registró la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}_B=B$. Se calculó la relación B/A para cada volumen de muestra. Dicha relación indica la fracción remanente de la producción de O_2^{\bullet} en presencia de muestra (actividad de la enzima). Para cada muestra, se graficó el $\log B/A = f(\text{volumen de muestra})$ (Figura 14 B). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción de Cit c (McCord

y Fridovich, 2014). Los resultados se expresaron como unidades de SOD por mg proteína, estimada según Lowry y col. (1951).

2.3.6- Actividad de la enzima CAT

La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984). Los tejidos cerebrales fueron homogeneizados en solución reguladora fosfato de potasio 30 mM con KCl 120 mM, pH 7,4; utilizando una relación 1:9 (P/V). Los homogeneizados fueron centrifugados a 600g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para realizar las determinaciones. Las mediciones se realizaron en solución reguladora fosfato de potasio 50 mM, pH 7, en presencia de H₂O₂ 10 mM. En una cubeta de cuarzo se agregaron 975 µl de solución reguladora, 15 µl de H₂O₂ y 10 µl de la muestra. El consumo de H₂O₂ se midió espectrofotométricamente durante 30 s ($\epsilon=40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a $\lambda=240 \text{ nm}$ y 25°C.

2.3.7- Contenido de α -T

Para las determinaciones del contenido de α -T se homogeneizaron 100 mg de tejido cerebral con 150 µl de SDS 3% (P/V), 600 µl de metanol y 30 µl de BHT 4% (P/V). Luego se agregaron 500 µl de hexano, se vortexeó durante 1 min, y se centrifugó a 600g por 5 min. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf y se evaporó en N₂ gaseoso. El extracto hexanólico seco se resuspendió en 300 µl de etanol:metanol (1:1). El contenido de α -T en el homogeneizado de cerebro se cuantificó mediante HPLC en fase reversa con detección electroquímica utilizando un sistema bioanalítico (West Lafayette, IN, USA) LC-4C, detector amperométrico con un electrodo de trabajo de carbono vítreo en un potencial de oxidación aplicado de +0,6 V (Desai, 1984). Se utilizó como estándar D, L- α -T (Sigma).

2.3.8- Obtención de proteínas citosólicas y nucleares

Para obtener las proteínas citosólicas y nucleares se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A: Nonidet P-40 (NP-40) 0,6% (P/V), NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, pH 8,0 en H₂O libre de nucleasas. Al momento de utilizar se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM, ortovanadato 100 mM y leuceptina 1 mg/ml.

Solución B: 25% (V/V) glicerol, Hepes 20 mM pH 7,9, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,2 mM, EDTA 0,2 mM pH 8,0 en H₂O libre de nucleasas. Al momento de utilizar se adicionó PMSF 0,5 mM, aprotinina 1 mg/ml, leuceptina 1 mg/ml y pepstatina 1 mg/ml.

Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron en una concentración de 200 mg peso fresco (PF)/ml de solución A y luego se centrifugaron a 300g durante 3 min. Se incubaron 5 min en hielo y se volvieron a centrifugar a 600g durante 5 min. Los sobrenadantes que corresponden al extracto citosólico se reservaron en freezer a -80°C. Inmediatamente se resuspendieron los *pellets* en 150 µl de solución B. Luego se incubaron 20 min en hielo y se centrifugaron a 1.000g por 30 min. Los sobrenadantes que corresponden al extracto nuclear se reservaron en freezer a -80°C hasta su posterior análisis según Deryckere y Gannon (1994).

2.3.9- Ensayo de unión de NF-κB a ADN

Para realizar estos estudios se utilizaron extractos de proteínas nucleares de muestras de cerebro obtenidas a tiempos determinados después de la administración de Fe-dextrán en el modelo de sobrecarga aguda de Fe y después de la 6^{ta} administración de Fe-dextrán en el modelo de sobrecarga subcrónica. La unión de NF-κB a ADN fue determinada mediante el protocolo: NF-κB (Human p50/p60) Combo Transcription Factor Assay Kit. Assessments of NF-κB DNA *binding*.

2.3.10- Determinación de la velocidad de oxidación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)

La velocidad de oxidación del compuesto DCFH-DA fue determinada espectrofluorométricamente. Para eso se homogeneizaron 200 mg/ml de tejido cerebral en Tris-HCl 100 mM, pH 7,4; con EDTA 2 mM y MgCl₂ 5 mM. Luego una alícuota de 10 a 30 µl de homogeneizado fue incubada con 980 µl de HEPES 30 mM pH 7,2; con KCl 200 mM, MgCl₂ 1 mM y 10 µl de DCFH-DA 1 mg/ml disuelta en metanol. Las muestras se incubaron por 30 min a 37°C y se determinó la fluorescencia a $\lambda_{ex}=488$ nm y $\lambda_{em}=525$ nm.

2.3.11- Evaluación de daño al ADN nuclear y mitocondrial mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa

Extracción de ADN: Para extraer ADN del tejido cerebral se utilizó el QIAGEN Genomic Tip y el Genomic DNA Buffer Set Kit (Qiagen, Cat. Nos. 10323 y 19060, respectivamente). La cuantificación del ADN se realizó espectrofluorométricamente utilizando el reactivo PicoGreen (Molecular Probes, cat. no. P-7581) y solución reguladora 20X TE. La curva estándar se realizó con Lambda (λ)/HindIII ADN (Gibco; Cat. No.15612-013). El estándar fue diluido en solución reguladora 1X TE en concentraciones crecientes de acuerdo a Santos y col. (2006). Los productos de PCR

fueron cuantificados con el *kit* de ensayo de ADN de doble cadena PicoGreen Quant-iT (Molecular Probes, Eugene, OR), y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (P/V) con detección de bromuro de etidio.

2.3.12- Histopatología

Inmediatamente después de la obtención de las muestras, se fijaron para Microscopía Óptica y Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR). Para microscopía óptica se utilizó una fijación de rutina con una solución de formalina tamponada. Después de la inclusión en bloques de parafina, algunas rodajas se tiñeron con azul de Prusia de Perls para detectar la presencia de la Ft en ambos tejidos y a otras se les realizó la tinción hematoxilina-eosina (HE) con hematoxilina de Harris (1900). Las muestras para MOAR se fijaron en glutaraldehído al 3% (V/V), 0,1 M solución reguladora de cacodilato de sodio (2,14 g de cacodilato de sodio - 100 ml de agua destilada), se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio (solución Palade: 1 g de tetróxido de osmio, 50 ml de agua destilada) en solución reguladora de Caulfield (20 ml de solución Palade y 0,9 g de sacarosa) durante 90 min. A continuación, las muestras se lavaron con agua destilada durante 2 h, se tiñeron en bloque con acetato de uranilo al 2% (P/V) durante 2 h y después se lavaron dos veces con agua destilada. Después de la deshidratación frente a un aumento de las concentraciones de alcohol, los tejidos se incluyeron con resina de propileno-óxido de epoxi (óxido de propileno 100%, óxido de propileno-resina epoxi 2:1, luego 1:1 y finalmente 1:2). El tejido fijado se colocó en cápsulas BEEM (Better Equipment for Electron Microscopy), se cortaron con un Ultracut Reichert-Jung ultramicrotomo y se tiñeron con solución de toluidina, y con tinción nuclear. Para la observación y las fotografías se utilizó un Scanner Scope Leica Biosystems Aperio C52 (USA).

2.3.13- Determinación de contenido de tioles totales

Las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente a partir del tejido cerebral en presencia de EDTA 20 mM en una relación 15 mg/200 µl de acuerdo a Sedlak y Lindsay (1968). La curva estándar se realizó a partir de una solución madre de GSH 1 mM.

2.3.14- Determinación del contenido de proteínas

Se empleó el modelo de Lowry (1951) para determinar el contenido de proteínas. Se utilizó como estándar seroalbúmina bovina (BSA).

2.4- Análisis estadístico

Los estudios se realizaron utilizando al menos tres o cuatro experimentos independientes, empleando de 3 a 6 animales por grupo experimental y con duplicados o triplicados por muestra, según se indique en cada caso. Los datos se expresan como la media \pm ESM. Los análisis estadísticos correspondientes se realizaron empleando los programas GraphPad InStat para Windows, GraphPad Software, Inc. Versión 3.01 y GraphPad Prism para Windows, GraphPad Software, Inc. Versión 3.00, aplicando, a menos que se indique otro estadístico, el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, según corresponda, y utilizando el test de Newman-Keuls o Turkeys.

2.5- Reactivos

Los reactivos que se indican a continuación fueron adquiridos por SIGMA Chemical Co, St Luis, MO, USA: Fe-dextrán, batofenantrolina, resina Chelex 100 forma sódica, mesilato de deferoxamina, calceína, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , trizma base, BSA, $MgCl_2$, TEMPO, H_2O_2 (20 volúmenes), ácido fosfotúngstico, TBA, leuceoptina, pepstatina, PMSF, aprotinina, ácido L-ascórbico, glutatión, $NaNO_3$, BHT, SOD, glutatión reducido, ferrocina, LPS de Escherichia coli (serotipo 0127:B8), L- α -T, BSA, DCFH-DA, xantina, xantina oxidasa, HEPES, Cit c^{3+} , glicerol, PBN, NP-40, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, ferrocianuro de potasio, hematoxilina de Harris, clorhidrato de clorpromazina.

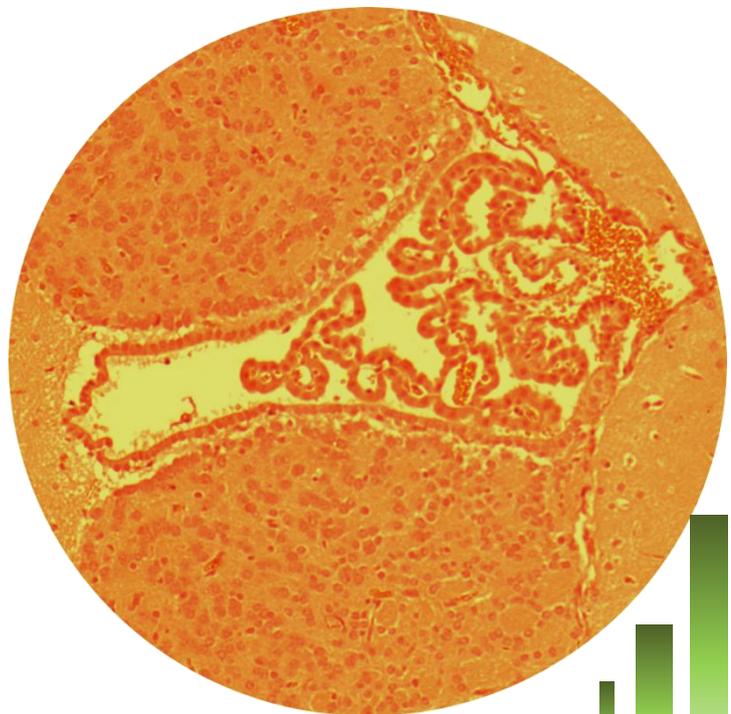
Los reactivos que se indican a continuación fueron adquiridos por Merck KgaA, Darmstadt, Alemania: NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , K_2SO_4 , KNO_3 , HCl, KCl, HNO_3 , metanol, acetona, $NaNO_2$, MPA, butanol, NaOH, etanol, ácido ortofosfórico, TGA, y ácido acético glacial, agua libre de nucleasas.

Los reactivos que se detallan a continuación fueron adquiridos de otras fuentes: acetato de sodio (Cicarelli), SDS (Riedel-deHaen), DMSO (Anedra), EDTA (Barker), hexano (EM Science).

2.6- Instrumental

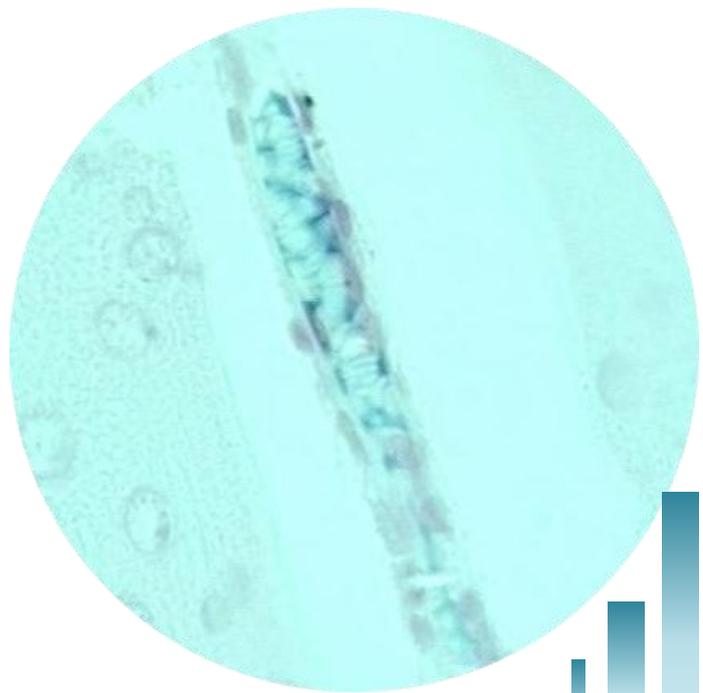
El instrumental empleado para el desarrollo de este trabajo de Tesis incluye: Espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica Bruker (ECS 106 banda X, cavidad ER 4102ST, y EMX plus Banda X), Centrífuga refrigerada Sorvall (RC5C), Ultracentrífuga Beckman (XL-90), Microcentrífuga ALC (micro CENTRIFUGETTE), Espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic) 101 Plus, Espectrofotómetro (Jasco) (UV/Vis 7850), Espectrofluorómetro (Hitachi) F-3010, HPLC (Perkin-Elmer), Electrodo

de pH (Consort) Multi-Parameter Analyser C831, Baño termostático (Vicking) Modelo Dubnoff, Ultrasonido (Branson) Sonifier 450, Balanzas (Mettler) Type H6 y PM 480, Balanza (Ohaus) Explorer, Freezer a -70°C (Righi); Granizadora (Righi) Escama-Jet; Agitador (Vicking) M-23, Agitador magnético (FAC) AMC 20, Microscopio (ENOSA), Espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic) 101 Plus, Tubo de CO₂, Tubo de N₂, Columna Supercosil LC-18 y LC-8.



Tercer ventrículo cerebral de rata (Tinción HE)

3.- Resultados



Hierro vascular en corteza cerebral de rata
(Tinción azul de Prusia de Perls)

3. 1- *Caracterización del metabolismo oxidativo del cerebro*



3.1.1- Caracterización de la determinación del contenido de Fe total en cerebro de rata mediante mineralización ácida

La determinación del contenido de Fe total se realizó a partir de muestras de cerebro llevadas a sequedad. El tejido seco se mineralizó con HNO₃ concentrado al 65% (V/V). Se realizó una curva de peso seco (PS) en función de peso fresco (PF) a fin de determinar la relación entre ambos parámetros, ya que ambas expresiones serán empleadas para caracterizar los efectos que se estudiarán posteriormente (Figura 15).

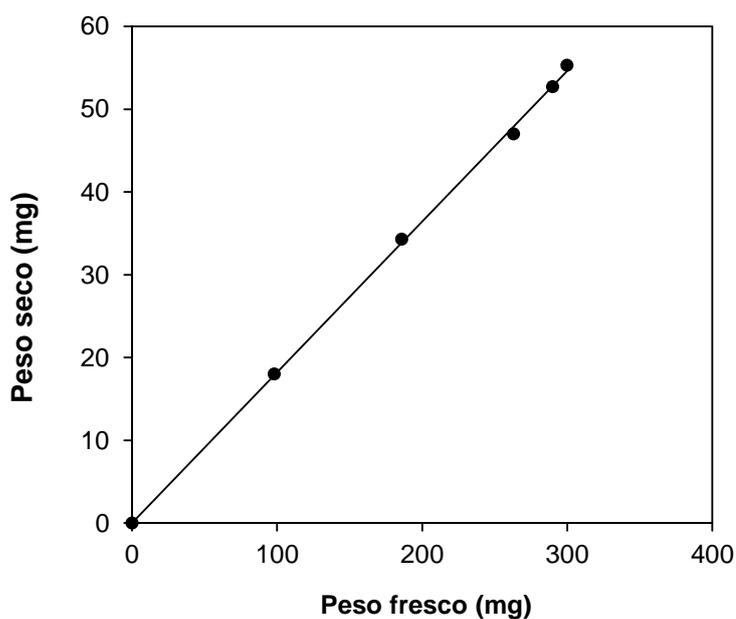


Figura 15: Curva de PS en función de PF de cerebro de rata control ($y=0,182x$, $R^2=0,999$).

Las determinaciones de contenido de Fe total se realizaron a partir de 200-300 mg de PF de cerebro total y de alrededor de 100 mg de PF de áreas cerebrales aisladas (corteza, hipocampo y cuerpo estriado).

Se realizó una curva de calibración empleando como estándar Fe, en una concentración de 1,08 mM (Figura 16). Las determinaciones del contenido de Fe total en los distintos tratamientos se realizaron utilizando entre 20 mg y 40 mg de cerebro llevado a sequedad, según se trate de áreas cerebrales o cerebro total, respectivamente (Figura 17).

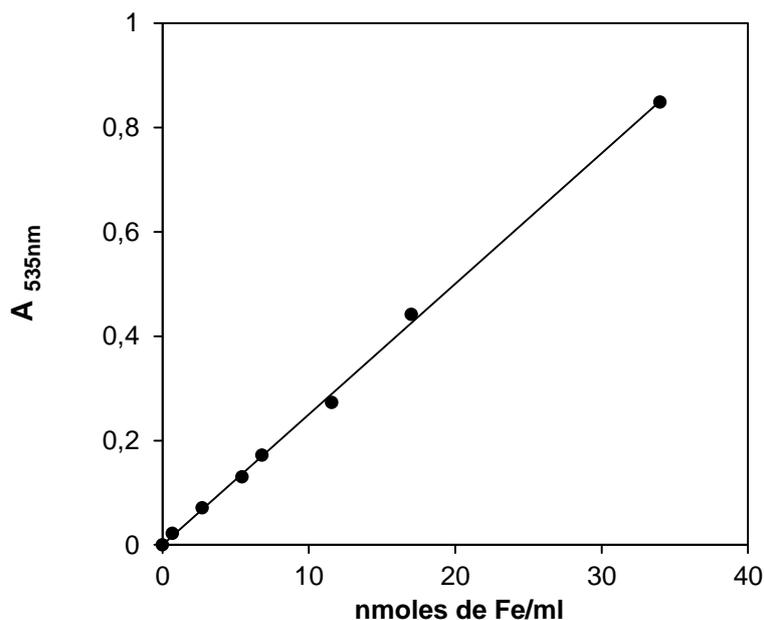


Figura 16: Curva de calibración del ensayo para la determinación de contenido de Fe total en cerebro de rata. Se emplearon homogeneizados de cerebro de rata control ($y=0,025x$, $R^2=0,998$).

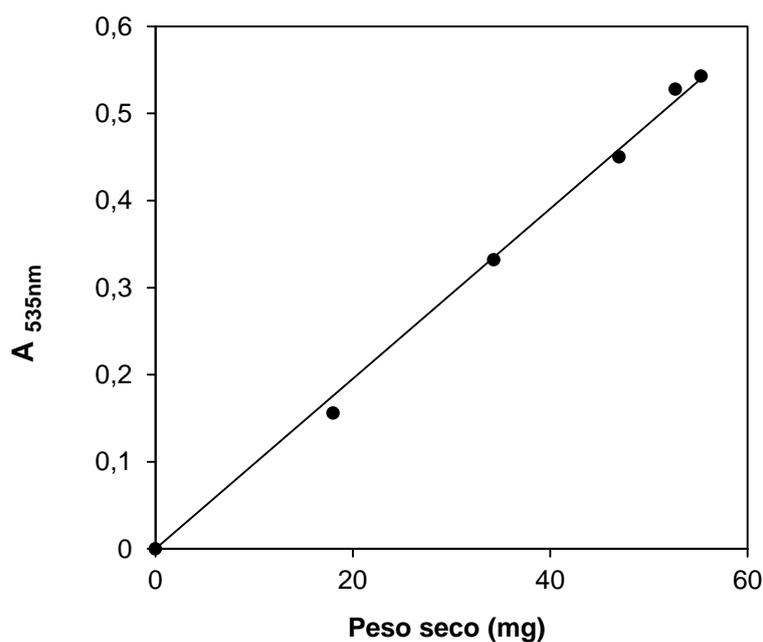


Figura 17: Determinación del contenido de Fe en función del PS en cerebro de rata control ($y=0,0098x$, $R^2=0,997$).

3.1.2- Caracterización de la determinación del contenido de LIP en cerebro de rata

Según se describió en la sección 2.2.2 de Materiales y Métodos de este trabajo, la determinación del contenido de LIP se efectúa según una técnica espectrofluorométrica empleando CA. Así, a los efectos de validar el uso de esta metodología en cerebro, se empleó un sistema *ex vivo* consistente en células

precursoras neuronales, preparando cultivos celulares primarios con cerebro de fetos de rata de 17 días de gestación. El LIP ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$) control determinado por EPR fue de $0,6 \pm 0,1$ pmol (10^6 células) $^{-1}$ y empleando CA de $0,42 \pm 0,03$ pmol (10^6 células) $^{-1}$. A continuación se estudió si un conocido agente que actúa como inductor de estrés oxidativo como la irradiación γ , produce cambios detectados adecuadamente en el LIP al emplearse ambas metodologías. Cuando los cultivos de células fueron irradiados en una unidad γ de teleterapia de ^{60}Co (Gammacell 220-Laboratorio de Dosimetría de Altas dosis-CNEA/CAE) con una dosis de 2 Gy a una tasa de dosis de $0,7$ Gy min^{-1} , a las 2 o 4 h de producida la irradiación, el valor obtenido para el LIP determinado por CA fue de $0,4 \pm 0,1$ y $0,51 \pm 0,03$ (pmol (10^6 células) $^{-1}$), respectivamente, y por EPR fue de $0,7 \pm 0,3$ y $0,6 \pm 0,2$ (pmol (10^6 células) $^{-1}$), respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre técnicas en ninguna de las condiciones estudiadas.

La consistencia entre los resultados empleando ambos procedimientos, cuando el contenido de Fe^{3+} resulta mayoritario, fue mostrado en base a los experimentos mencionados, en los que el LIP se determinó por ambos métodos. En los modelos subsiguientes incluidos en este trabajo de Tesis, se realizaron empleando CA.

Se realizó una curva de fluorescencia en función de la concentración de CA (Figura 18) a fin de determinar la concentración del fluoróforo adecuada para las determinaciones posteriores. Este es un dato indispensable para el cálculo del contenido de LIP, según fue descrito en la sección Materiales y Métodos de este trabajo.

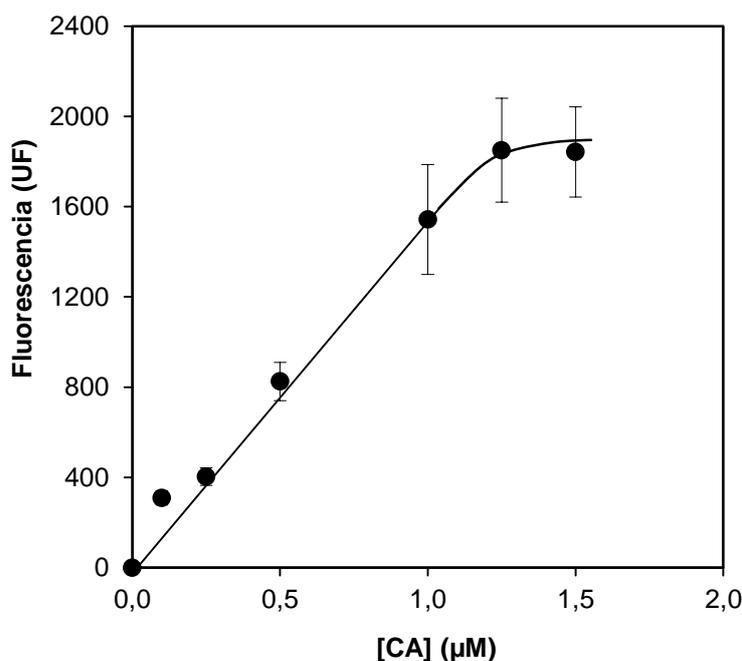


Figura 18: Determinación del LIP empleando fluorescencia, siendo $\lambda_{\text{exc}} = 497$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 518$ nm, en función de la [CA].

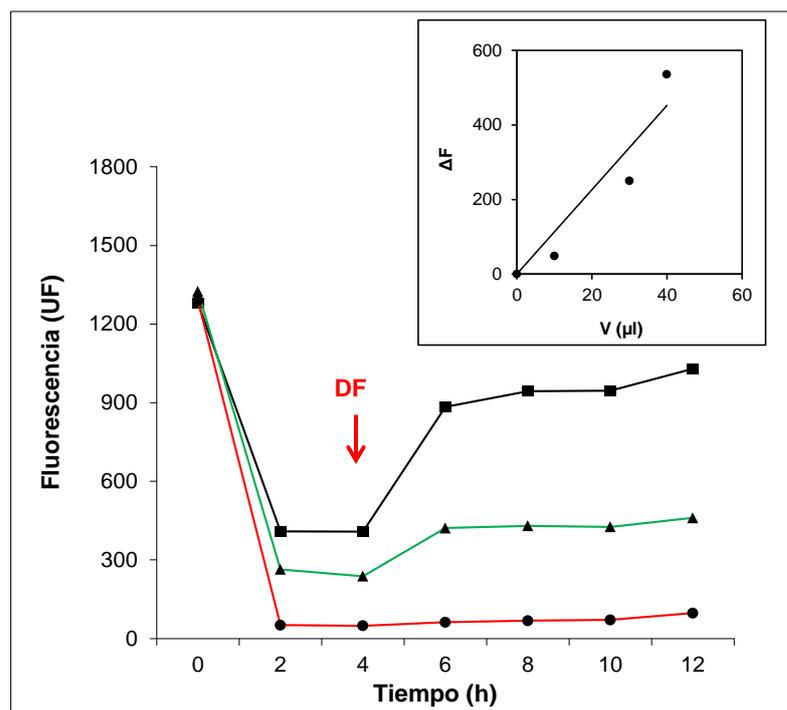


Figura 19: Determinación del LIP empleando fluorescencia ($\lambda_{exc} = 497 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$) en función del tiempo de reacción en función del volumen de homogeneizado de una muestra de cerebro de rata control: (●) 10 μl , (▲) 30 μl y (■) 40 μl . Inserto: ΔF en función del volumen de homogeneizado agregado.

La [CA] elegida fue 1 μM para ajustar la fluorescencia inicial entre 1400 y 1800 unidades de fluorescencia (UF), ya que estas condiciones optimizan el ensayo. El contenido de LIP fue determinado a partir de un homogeneizado en concentración 500 mg/ml, filtrado, a partir del cual se ensayaron diferentes volúmenes a fin de elegir el adecuado para realizar el seguimiento del avance de reacción. El agregado de DF se realizó a las 4 h de determinada la fluorescencia inicial (Figura 19).

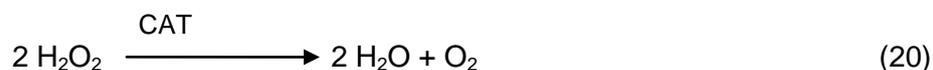
El volumen seleccionado para realizar las determinaciones fue de 40 μl , ya que es el volumen en el que se observa el mayor valor de ΔF , valor necesario para calcular el contenido de LIP según fue descrito en la sección Materiales y Métodos de este trabajo.

Los resultados obtenidos empleando CA son consistentes con las determinaciones empleando EPR, y por lo tanto, se seleccionó la técnica fluorescente que permite el uso de menor cantidad de material, para el resto de los estudios realizados en este trabajo.

3.1.3- Caracterización de la determinación de la actividad de CAT en cerebro de rata

La actividad de CAT fue determinada a partir de 100 mg/ml de homogeneizado de cerebro de rata. Dado que la velocidad de descomposición del H_2O_2 es directamente proporcional a la actividad de la CAT según la reacción 20, la

concentración de la enzima fue estimada siguiendo la ecuación 10. Debido a que la [CAT] y la k de velocidad son constantes, pueden agruparse en una k' (ecuación 11), siendo k para la CAT de hígado de rata igual a $4,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En la ecuación 11, k' representa las pendientes obtenidas de la relación entre el \ln de la absorbancia ($\ln A$) en función del tiempo de la medición del consumo del H_2O_2 .



$$v = -d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt = k [\text{CAT}] [\text{H}_2\text{O}_2] \quad [10]$$

$$k' = k [\text{CAT}] \quad [11]$$

Se graficó el $\ln A$ en función del tiempo con diferentes volúmenes de homogeneizado (Figura 20 A) según Aebi (1984) a fin de determinar el volumen de homogeneizado apropiado para realizar la reacción y se calculó la pendiente en cada caso. En la Figura 20 B se muestra la pendiente del gráfico indicado en función del volumen de muestra utilizado. La [CAT] se determinó a partir de 5 a 10 μl de homogeneizado.

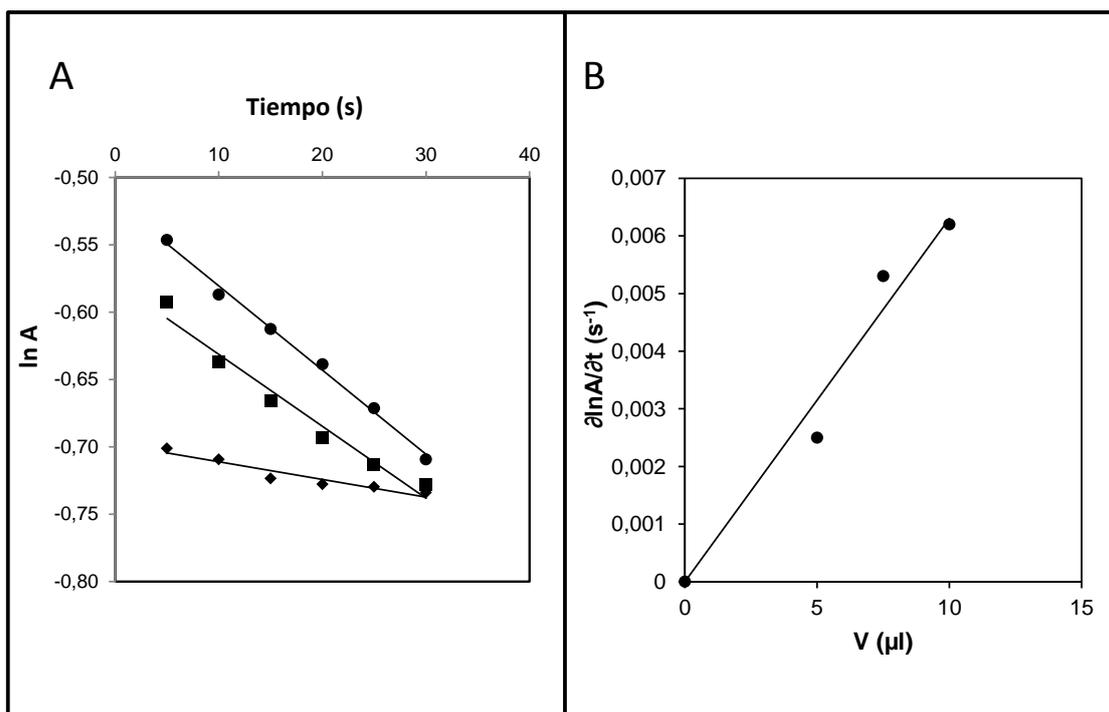


Figura 20: Actividad de CAT en cerebro de rata **A.** Gráfico de $\ln A$ en función del tiempo empleando distintos volúmenes de homogeneizado de una muestra de cerebro de rata control: (\blacklozenge) 5 μl , (\blacksquare) 7,5 μl y (\bullet) 10 μl . **B.** Gráfico de la $(\partial \ln A / \partial t)$ en función del volumen de homogeneizado empleado.

3.1.4- Caracterización de la determinación de la actividad de SOD en cerebro de rata

La actividad de SOD fue determinada a partir de 100 mg/ml de homogeneizado de cerebro de rata. Se agregó en la cubeta de medida una alícuota de 850 μl de solución amortiguadora (fosfato de potasio 50 mM pH = 7,8, con EDTA 0,1 mM), 100 μl xantina ([xantina]=50 μM), 50 μl de Cit c ([Cit c] = 20 μM) y suficiente cantidad de XO (~5 nM) para producir una variación de A de 0,025/min a 25°C. Se monitoreó el cambio de A a $\lambda=550\text{-}540$ nm durante 1 min y se determinó la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ (A). Se repitió la determinación empleando volúmenes de muestra variables (1-15 μl), con el fin de seleccionar los volúmenes adecuados para las determinaciones y se registró la pendiente nuevamente (B). Se calculó $\log B/A$ y se graficó en función del volumen de muestra (Figura 21).

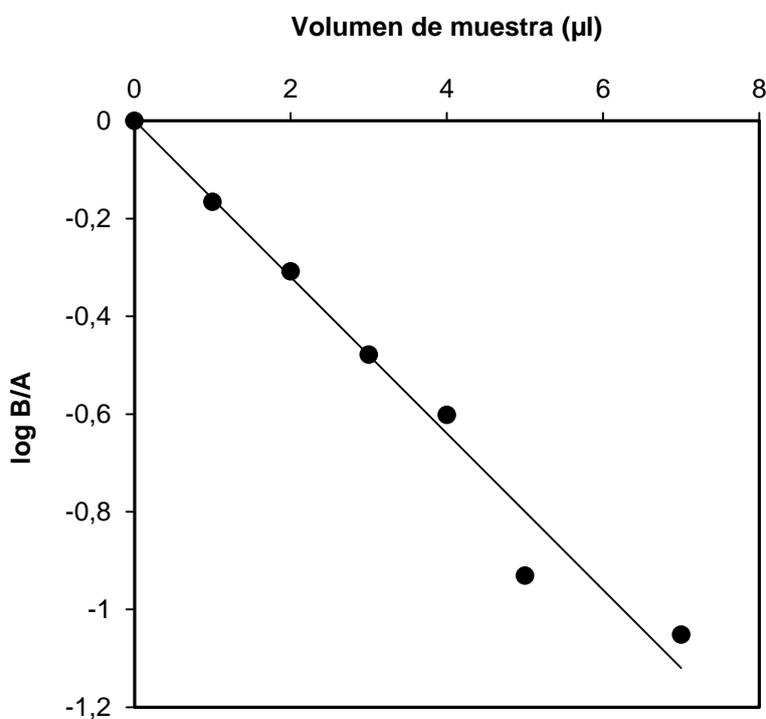


Figura 21: Determinación de la actividad de SOD. Se grafica Log B/A en función del volumen de homogeneizado de una muestra de cerebro de rata ($y=-0,16 x$, $R^2= 0,974$).

La pendiente de la curva se utilizó para calcular el volumen de muestra que contiene una unidad de SOD, es decir 0,5 B/A. Con el fin de expresar el contenido de SOD en pmol/mg proteína, se realizó la determinación enzimática agregando volúmenes diferentes de SOD comercial en lugar de muestra.

3.1.5- Caracterización de la determinación del contenido de A• en cerebro de rata

Los tejidos cerebrales se homogeneizaron en DMSO en concentraciones crecientes. En la Figura 22 A se observan las señales características de EPR de A• en muestras de cerebro de rata control.

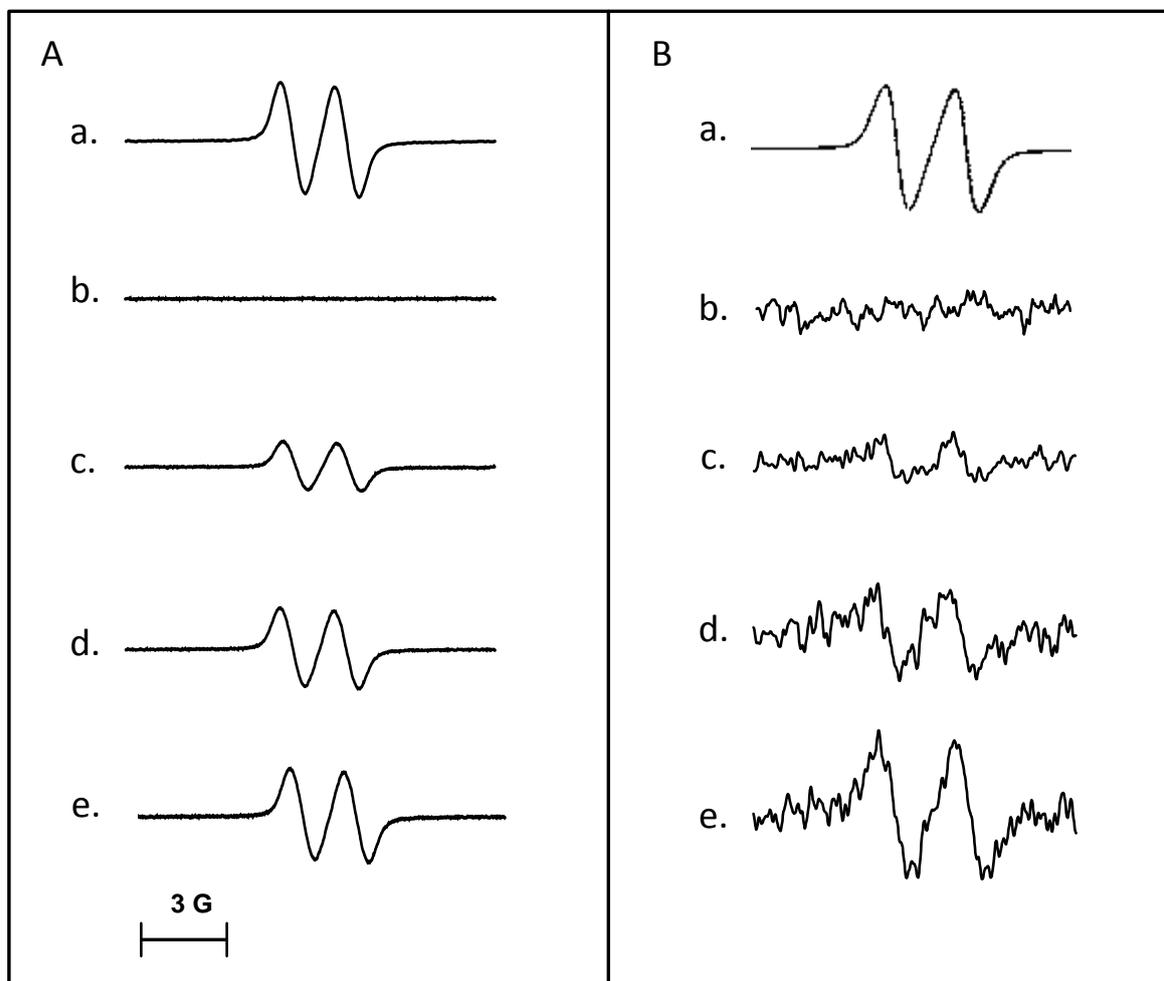


Figura 22: Señal de EPR de A• **A.** En cerebro de rata control. (a) Espectro simulado por computadora utilizando los siguientes parámetros: $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G, (b) DMSO solo, (c) en presencia de 15 mg de cerebro /ml, (d) 25 mg de cerebro /ml y (e) 30 mg de cerebro /ml. **B.** En cultivos de células irradiadas *in vitro* (a) Espectro simulado; (b) 1 mM DF en DMSO; (c) cultivo de células no irradiadas; (d) células irradiadas 1 h pi; (e) células irradiadas 2 h pi.

Con la finalidad de determinar si el contenido de A• muestra claramente los efectos tempranos de una situación de estrés oxidativo reconocido, se evaluó el contenido del mismo en cultivo de precursores neuronales obtenidos de fetos el día 17 de gestación, expuestos *in vitro* a irradiación γ . En este modelo, se observó un aumento en el contenido de A• de $0,6 \pm 0,2$ y $1,3 \pm 0,2$ pmol $(10^6 \text{células})^{-1}$ en las células irradiadas luego de 1 y 2 h post irradiación (Figura 22 B), respectivamente, con respecto al grupo control ($0,47 \pm 0,01$ pmol $(10^6 \text{células})^{-1}$). A partir de este experimento preliminar, se demuestra que el contenido cerebral de A• responde a la situación de aumento en las especies activas que caracteriza a la condición de estrés oxidativo.

El contenido de A• fue cuantificado a partir del área de los espectros presentados en la Figura 22 A. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23, expresado en función del PF de cerebro. Para calcular el contenido de A• de las muestras se eligió una concentración de 25 mg/ml.

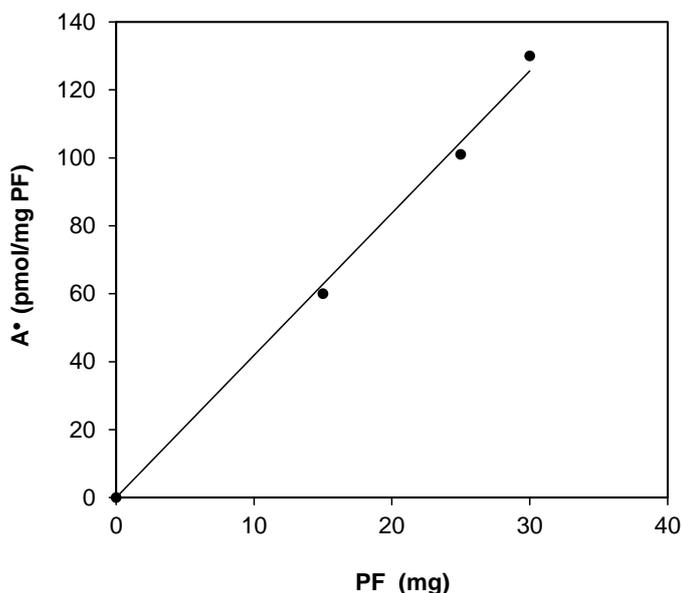


Figura 23: Determinación de la concentración de A• en función del PF de cerebro de rata contenida en 1 ml de muestra ($y=0,486 x$, $R^2= 0,9996$).

3.1.6- Caracterización de la determinación de la velocidad de generación de RL• en cerebro de rata

Los tejidos cerebrales fueron homogeneizados en PBN 40 mM en DMSO en una concentración 25 mg/ml. Se obtuvieron los espectros característicos para RL• que se observan en la Figura 24. La señal correspondiente a la muestra sin incubación indica el contenido de RL• (Figura 24, c), en este caso la señal de RL• es pequeña debido a que el contenido de estas especies es bajo. La señal correspondiente a RL• se superpone con la señal de A•, por lo que se determinaron las señales luego de distintos tiempos de incubación, que indican la velocidad de generación de los radicales mencionados, ya que durante la incubación el radical A• desaparece y se evita la interferencia.

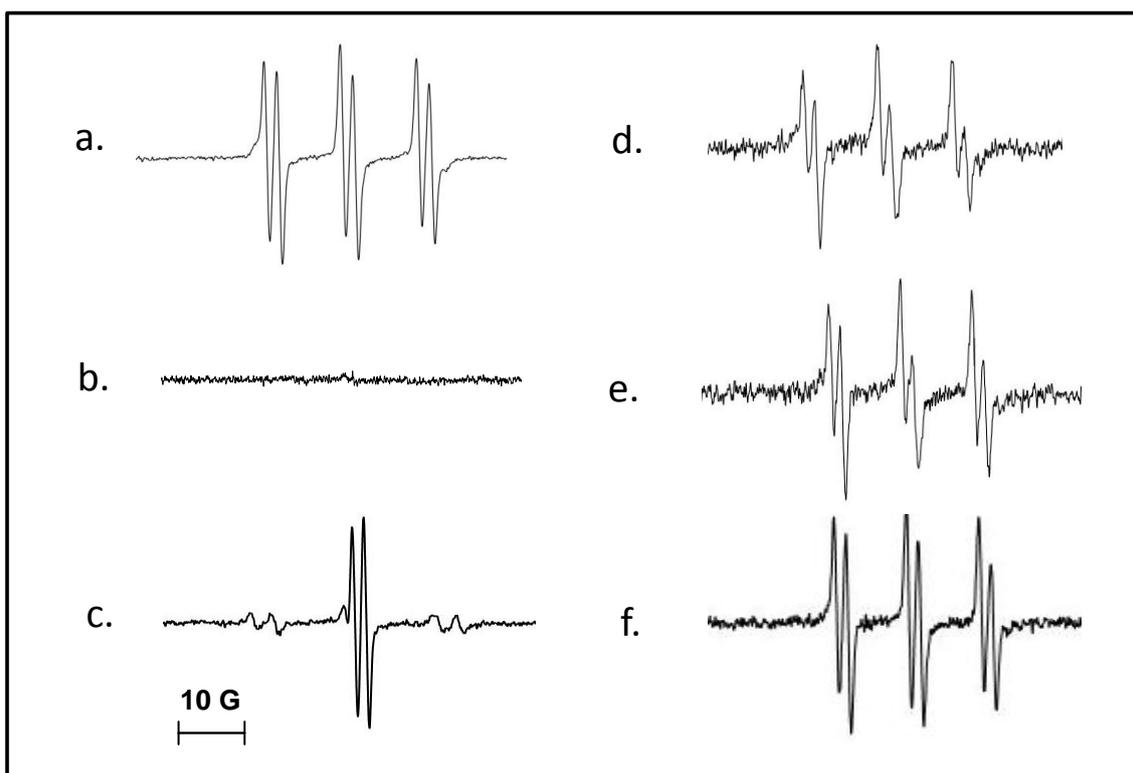


Figura 24: Generación de RL^\bullet en cerebro de rata control obtenidos utilizando los siguientes parámetros: $g=2,005$ y $a_H=1,8$ G. Señales de EPR de RL^\bullet de muestras de cerebro en concentración 25 mg/ml en presencia de PBN-DMSO (a) Espectro simulado por computadora utilizando los siguientes parámetros: $g=2,005$ y $a_H=1,8$ G, (b) PBN-DMSO solo, (c) sin incubación (d) muestra incubada 10 min a 37°C , (e) incubada 20 min a 37°C , (f) incubada 30 min a 37°C .

A partir de los espectros obtenidos se calculó el área de la señal. En la Figura 25 se grafica el área de la señal presentada en cada espectro en función del tiempo de incubación.

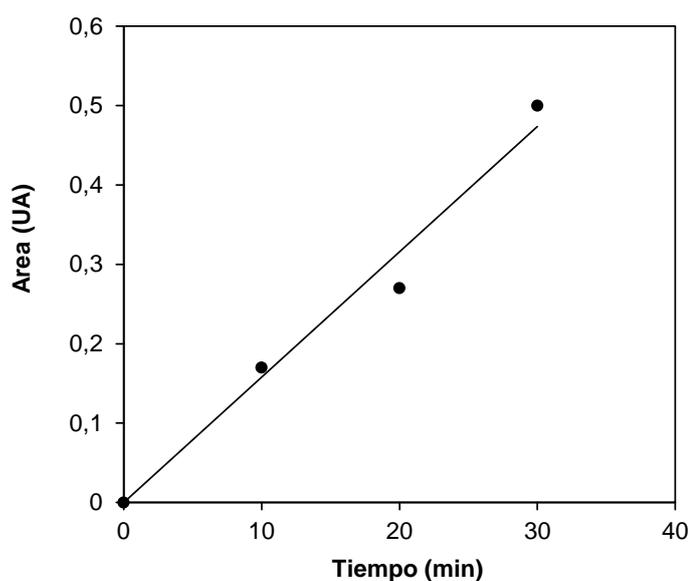


Figura 25: Área de los espectros de RL^\bullet en función del tiempo de incubación ($y=0,0158 x$, $R^2= 0,9776$).

Las determinaciones posteriores se realizaron en homogeneizados en concentración 25 mg/ml, incubados durante 30 min a 37°C.

3.1.7- Caracterización de la determinación de la velocidad de oxidación de DCFH-DA en cerebro de rata

Las muestras de cerebro se homogeneizaron en Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, en presencia de EDTA 2 mM y MgCl₂ 5mM en una concentración de 200 mg/ml. Luego se incubaron distintos volúmenes de homogeneizado durante 30 min a 37°C en presencia de HEPES y DCFH-DA como se describe en la sección 2.3.10 de Materiales y Métodos de este trabajo (Figura 26).

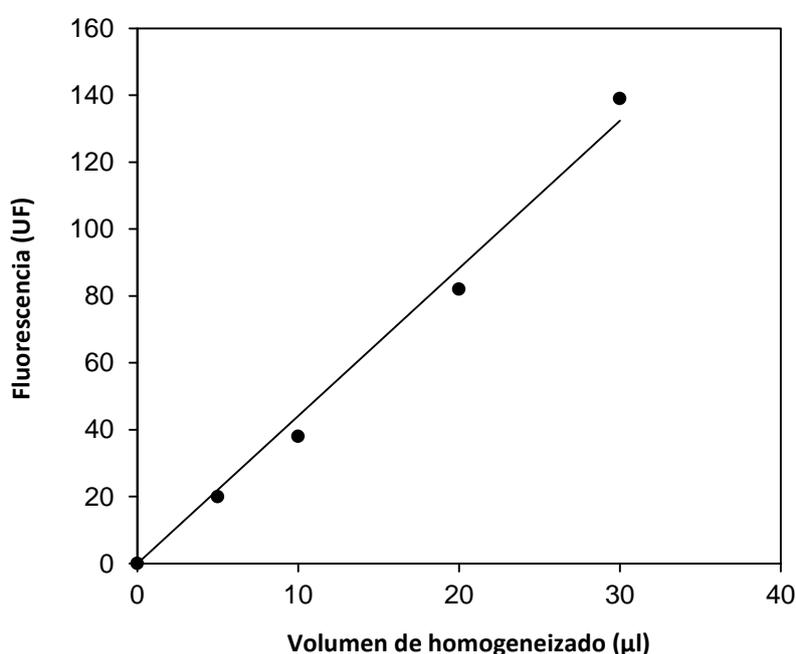


Figura 26: Fluorescencia debida a la oxidación de DCFH-DA en función del volumen de homogeneizado ($y=4,4015 x$, $R^2= 0,9878$).

Las determinaciones posteriores se realizaron utilizando entre 10 y 30 µl de homogeneizado.

3.1.8- Caracterización de la determinación del contenido de AH[•] en cerebro de rata

En la última década, la concentración de A[•] ha sido interpretada como índice de cambio transiente en el contenido de AH[•] (Pietri y col., 1994) o como el resultado del flujo de radicales libres en el sistema estudiado (Jurkiewicz y Buettner, 1994; Galleano y col., 2002). El AH[•] posee un papel metabólico importante ya que puede actuar como antioxidante y también como agente prooxidante (Sadzadeh y Eaton, 1988). Su actividad prooxidante es el resultado de su habilidad para reducir metales (especialmente el Fe) para formar especies que reaccionen con O₂ para generar

iniciadores de lipoperoxidación. La actividad antioxidante del AH⁻ es el resultado de su habilidad para reducir ROO[•], restringiendo la propagación de la lipoperoxidación (Wills, 1966), o para reducir la forma oxidada (radical α -T[•]) del antioxidante α -T (Doba y col., 1985).

Dado que por las características del equipo de HPLC utilizado, se debe inyectar un volumen de muestra fijo de 20 μ l, se realizó la siguiente curva de área de la señal en función de la concentración de la muestra (Figura 27).

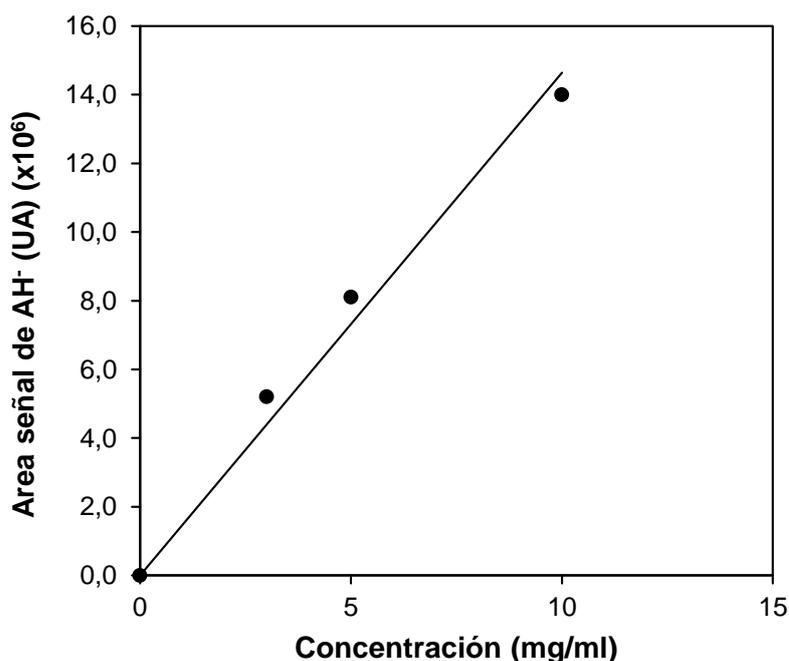


Figura 27: Gráfico del área de la señal de AH⁻ en función de la concentración de la muestra (mg/ml) ($y=1 \times 10^6$, $R^2=0,9896$).

Las determinaciones se realizaron con una concentración de 10 mg de cerebro/ml.

3.1.9- Caracterización de la determinación de daño a ADN nuclear y mitocondrial en cerebro de rata

Para la extracción del ADN del tejido cerebral, las muestras fueron incubadas en tubos eppendorf en presencia de una solución reguladora HEPES y proteinasa K durante 2 h a 56°C *vortexeando* 2 s cada 15 min. La cuantificación del ADN se realizó espectrofluorométricamente utilizando el reactivo PicoGreen (Molecular Probes, Cat. No. P-7581), el cual es eficiente para la cuantificación del ADN y de los productos de PCR; y solución reguladora TE 20X: Tris- HCl 200 mM, EDTA 20 mM, pH 7,5 diluida a 1X a temperatura ambiente.

La curva estándar se realizó con ADN Lambda (λ)/HindIII (Gibco; Cat. No.15612-013). El estándar fue diluido en solución reguladora TE 1X en concentraciones crecientes. Para realizar las determinaciones, en cada pocillo se adicionaron 90 μ l de TE 1X, 10 μ l de cada concentración de estándar en solución reguladora TE y 100 μ l de reactivo PicoGreen, la mezcla se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se determinó la fluorescencia a $\lambda=488$ y $\lambda=525$ nm (Figura 28). Las determinaciones se realizaron a partir de 5 ó 10 μ l de muestra. La concentración de ADN de la muestra original se calculó a partir de la ecuación [12]:

$$[\text{ADN}]_{\text{original}} = \frac{\text{Fluorescencia}}{\partial \text{Fluorescencia} / \partial [\text{ADN}]} \times 20 \text{ (para } 10 \mu\text{l)}, \quad [12]$$

donde $\partial \text{Fluorescencia} / \partial [\text{ADN}] = 163$

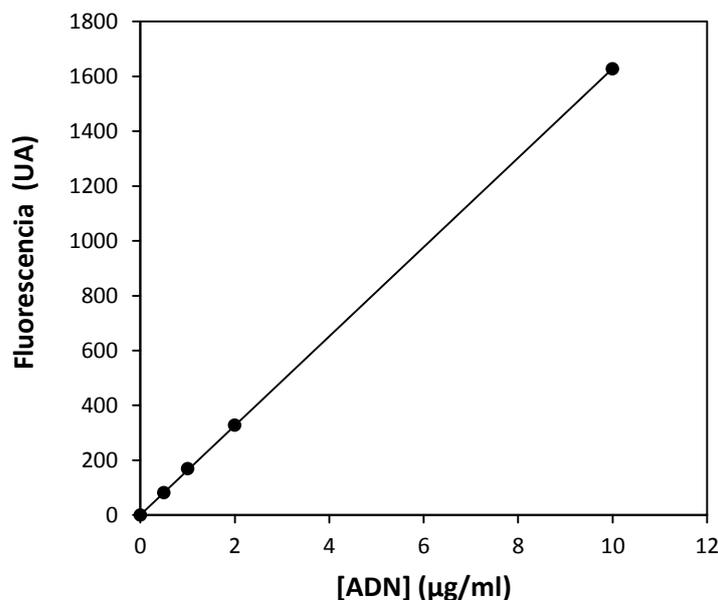


Figura 28: Gráfico de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm en función de la concentración de ADN.

Integridad nuclear del ADN: una vez seleccionados los “*primers*”, en este caso 5781/18318 para rata, se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando el kit GeneAmpXL PCR, Cat. No. 808-0192. Los parámetros utilizados fueron $T_M=65^\circ\text{C}$, número de ciclos=28 y $\text{Mg}^{2+}= 1,1$ mM, según Santos y col. (2006). Se utilizaron 20 μ l de muestra para la cuantificación (Figura 29).

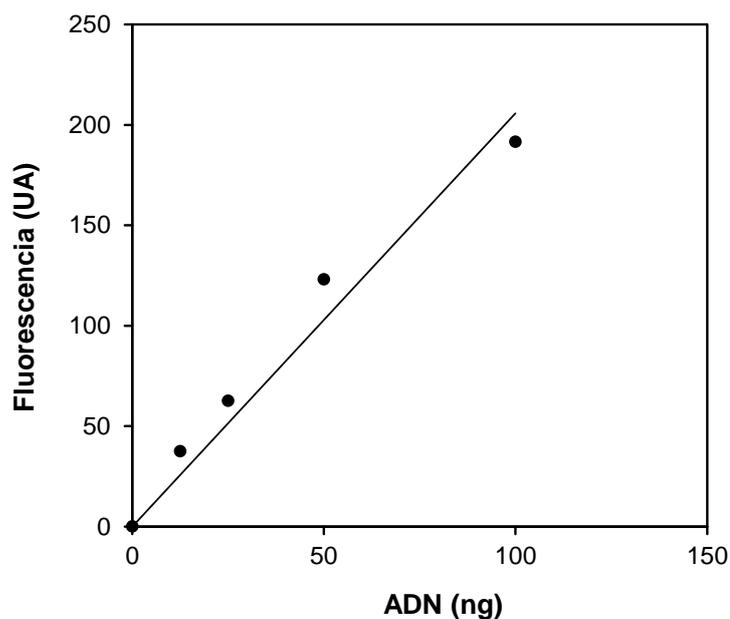


Figura 29. Gráfico de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm en función de la cantidad de ADN.

3.1.10- Caracterización de la determinación de tioles totales en cerebro de rata

Para realizar las determinaciones se homogeneizaron entre 12 y 20 mg de tejido cerebral en presencia de EDTA 20 mM en una relación 15 mg tejido/200 μ l. Las muestras se centrifugaron a 6000g por 5 min, luego 50 μ l de los sobrenadantes fueron incubados en hielo por 15 min en presencia de 10 μ l de 5,5'-dithio-bis (2 nitrobenzoic acid) (DTNB), 150 μ l de trizma base 200 mM pH 8,2 y 790 μ l de metanol. Se centrifugaron a 0,8g por 12 min y se midió la absorbancia a $\lambda=412$ nm, de acuerdo a Sedlak y Lindsay (1968). La curva estándar (Figura 30) se realizó a partir de una solución madre de GSH 1 mM. Los distintos volúmenes se incubaron en las mismas condiciones que las muestras.

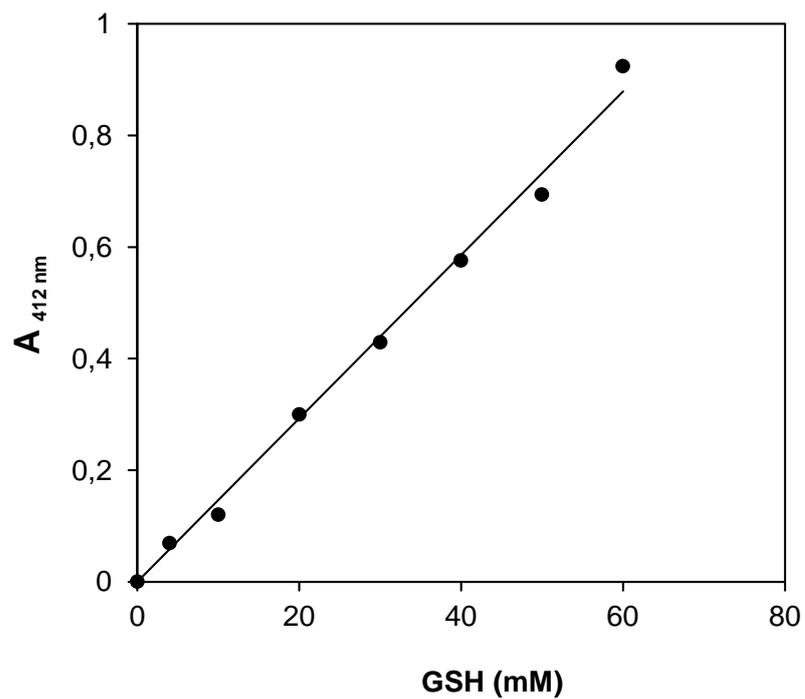
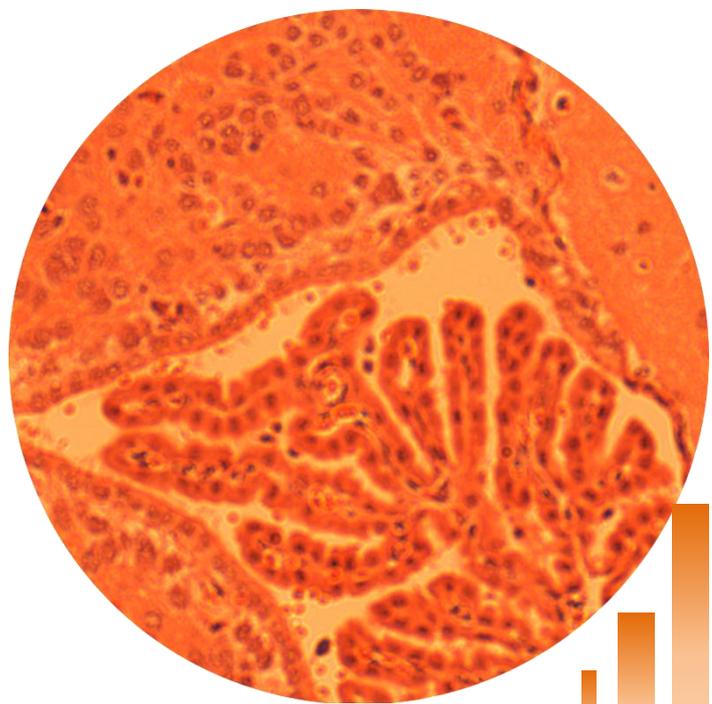


Figura 30. Gráfico de absorción a $\lambda=412$ nm en función de la concentración de GSH.



Tercer ventrículo cerebral de rata (Tinción HE)

3. 2 - *Modelo de sobrecarga aguda de Fe*

3.2.1- Determinación del contenido de Fe total

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 2.2.1 de Materiales y Métodos de este trabajo. Se analizó el efecto de la sobrecarga aguda de Fe sobre el contenido de Fe total en función del tiempo pi. Se observó un aumento significativo a las 4, 6 y 8 h pi con respecto al valor control, siendo este aumento máximo (8,5 veces con respecto al control) a las 6 h pi (Figura 31).

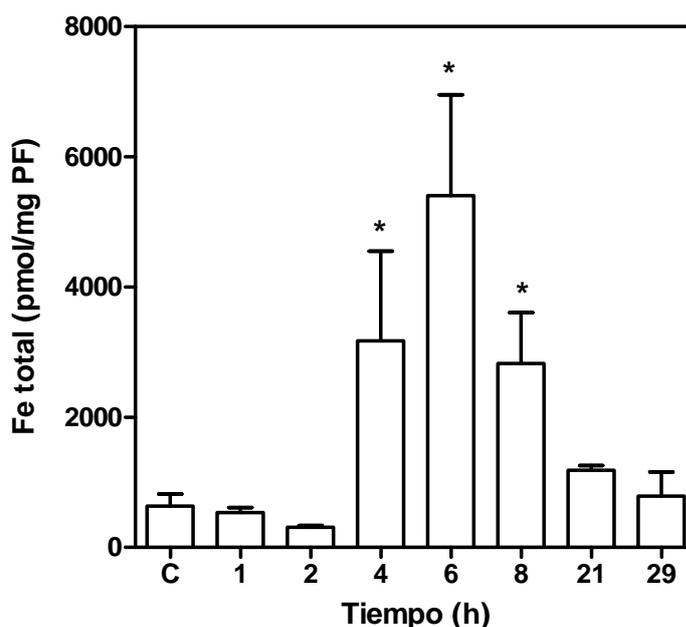


Figura 31: Cinética del contenido de Fe total en cerebro de ratas con sobrecarga aguda de Fe. *significativamente diferente de los valores control. ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.2- Determinación del contenido de LIP

El contenido de LIP fue determinado según el protocolo descrito en la sección 2.2.2 de Materiales y Métodos de este trabajo. Para ello se emplearon 200 mg de tejido cerebral. Se observó un aumento significativo de 2,5 veces el valor control a las 6 h pi, en coincidencia con el aumento en el contenido de Fe total, que posteriormente disminuyó hasta alcanzar el valor control a las 8 h pi (Figura 32).

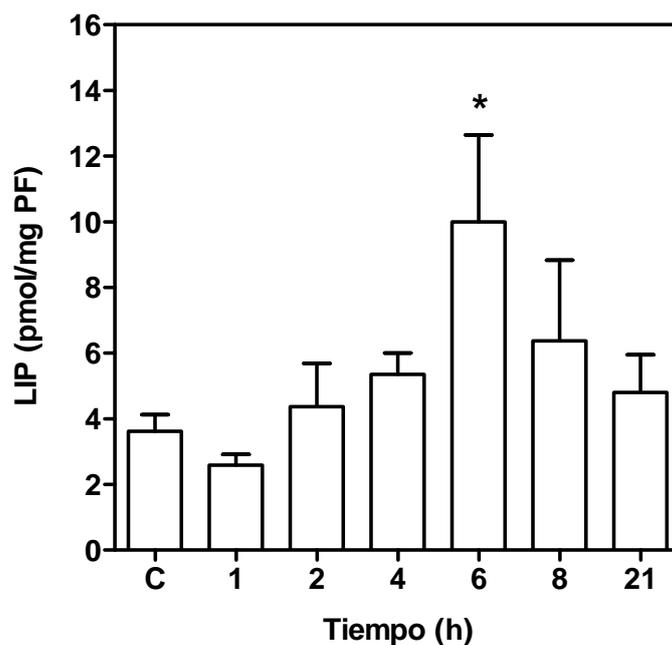


Figura 32: Cinética del contenido de LIP en cerebro de ratas con sobrecarga aguda de Fe. *significativamente diferente de los valores control. ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.3- Determinación de la velocidad de oxidación de DCFH-DA

La velocidad de oxidación del marcador fluorescente DCFH-DA, estudiada como índice de la capacidad de generación celular de especies activas, fue determinada en función del tiempo pi. Se observó una disminución significativa con respecto al valor control luego de 6 y 8 h pi (Figura 33).

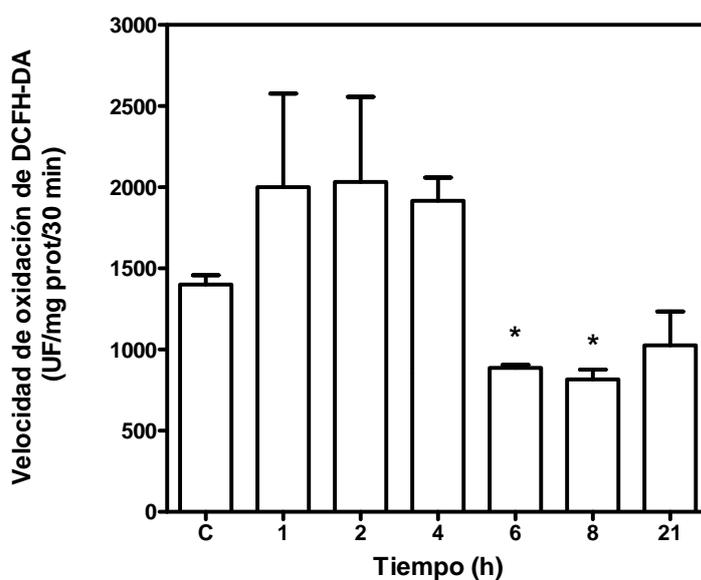


Figura 33: Velocidad de oxidación de DCFH-DA en función del tiempo pi. *significativamente diferente de los valores control. ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.4- Determinación de A^\bullet

La figura 34 A muestra los espectros típicos de EPR de cerebro de rata control, que muestra los dos picos característicos a $g = 2,005$ y $a_{H^+} = 1,8$ G. El contenido de A^\bullet en el cerebro de ratas control se vio aumentado luego de transcurridas 6 h de la administración aguda de Fe-dextrán (Figura 34 B).

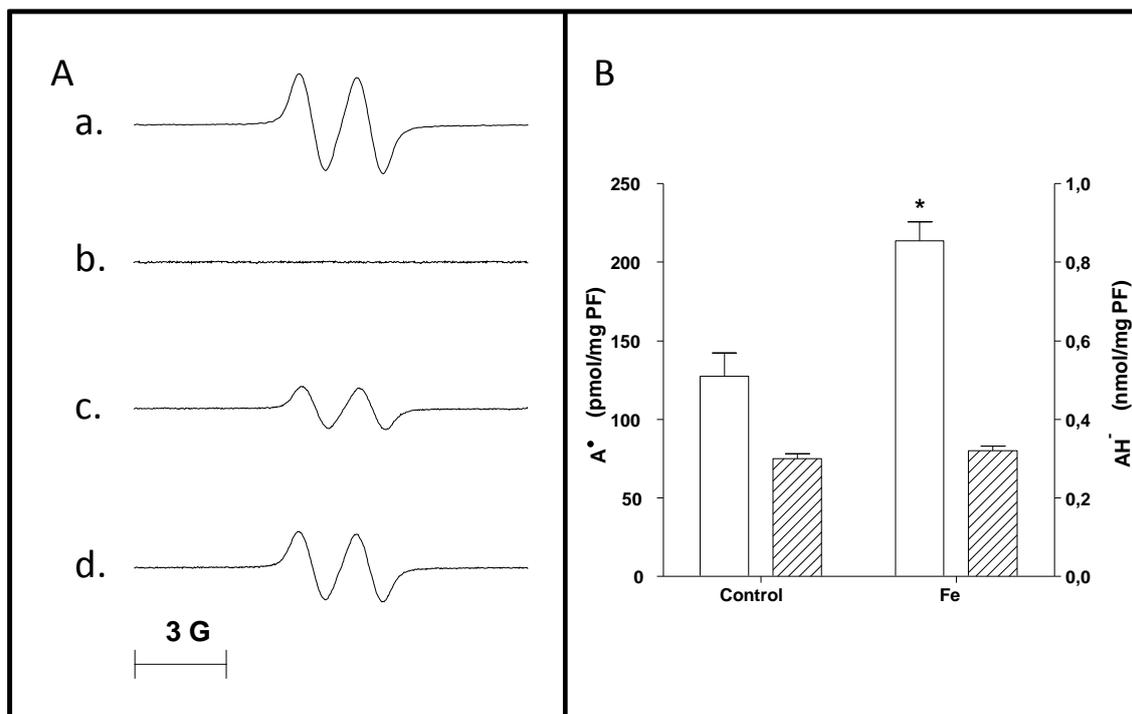


Figura 34: A. Señal de EPR de A^\bullet en cerebro de rata, (a) espectro simulado por computadora utilizando los siguientes parámetros: $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G, (b) DMSO solo, (c) muestra de cerebro de rata control, (d) muestra de cerebro de rata sobrecargada con Fe, 6 h pi. B. Cuantificación de A^\bullet (□) y AH^\bullet (▨) en muestras de cerebro de ratas controles y sobrecargadas con Fe.

*significativamente diferente de los valores control, test de Student, $p < 0,05$.

3.2.5- Determinación del contenido de AH^\bullet

El contenido de AH^\bullet no se vio modificado en las muestras de cerebro de las ratas sobrecargadas con Fe en relación a los valores controles (Figura 34 B).

3.2.6- Determinación del índice A^\bullet/AH^\bullet

La relación A^\bullet/AH^\bullet constituye uno de los métodos más adecuados para evaluar el desarrollo de situaciones de estrés oxidativo (Galleano y col., 2002). Bajo condiciones de sobrecarga aguda de Fe-dextrán *in vivo*, esta relación aumentó significativamente en las muestras de cerebro de animales tratados comparada con los valores controles (Figura 35), sugiriendo la aparición de estrés oxidativo luego del tratamiento.

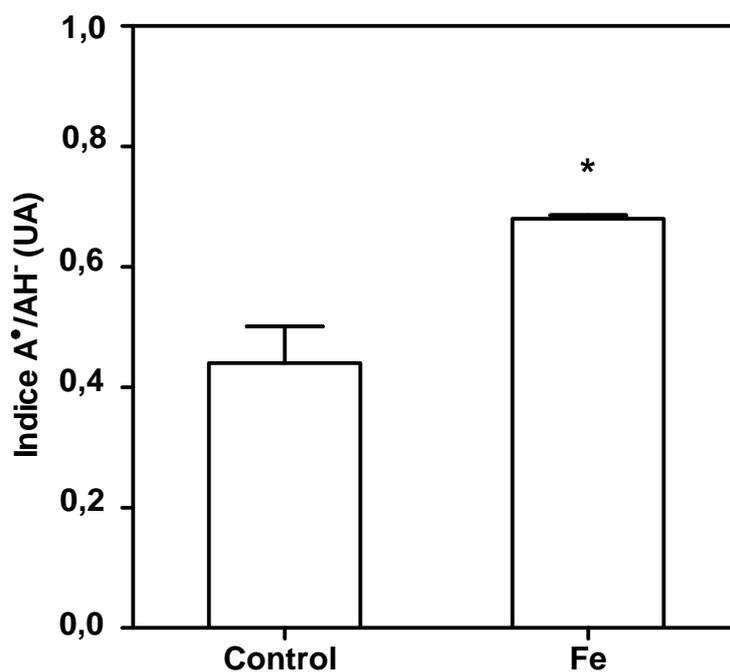


Figura 35: Índice A•/AH• en muestras de cerebro de ratas control y sobrecargadas con Fe, 6 h pi.

*significativamente diferente de los valores control, test de Student, $p < 0,05$.

3.2.7- Determinación de daño celular mediante histología

Como se muestra en la Figura 36, la utilización de la tinción con HE, descrita en la sección 2.3.13 de Materiales y Métodos de este trabajo, permitió determinar que no se produjo daño macroscópico celular debido a la sobrecarga con Fe-dextrán. Los cortes histológicos de la corteza y del hipocampo de ratas control y tratadas con sobrecarga aguda de Fe fueron observados con objetivo de 10X.

Tinción con hematoxilina y eosina

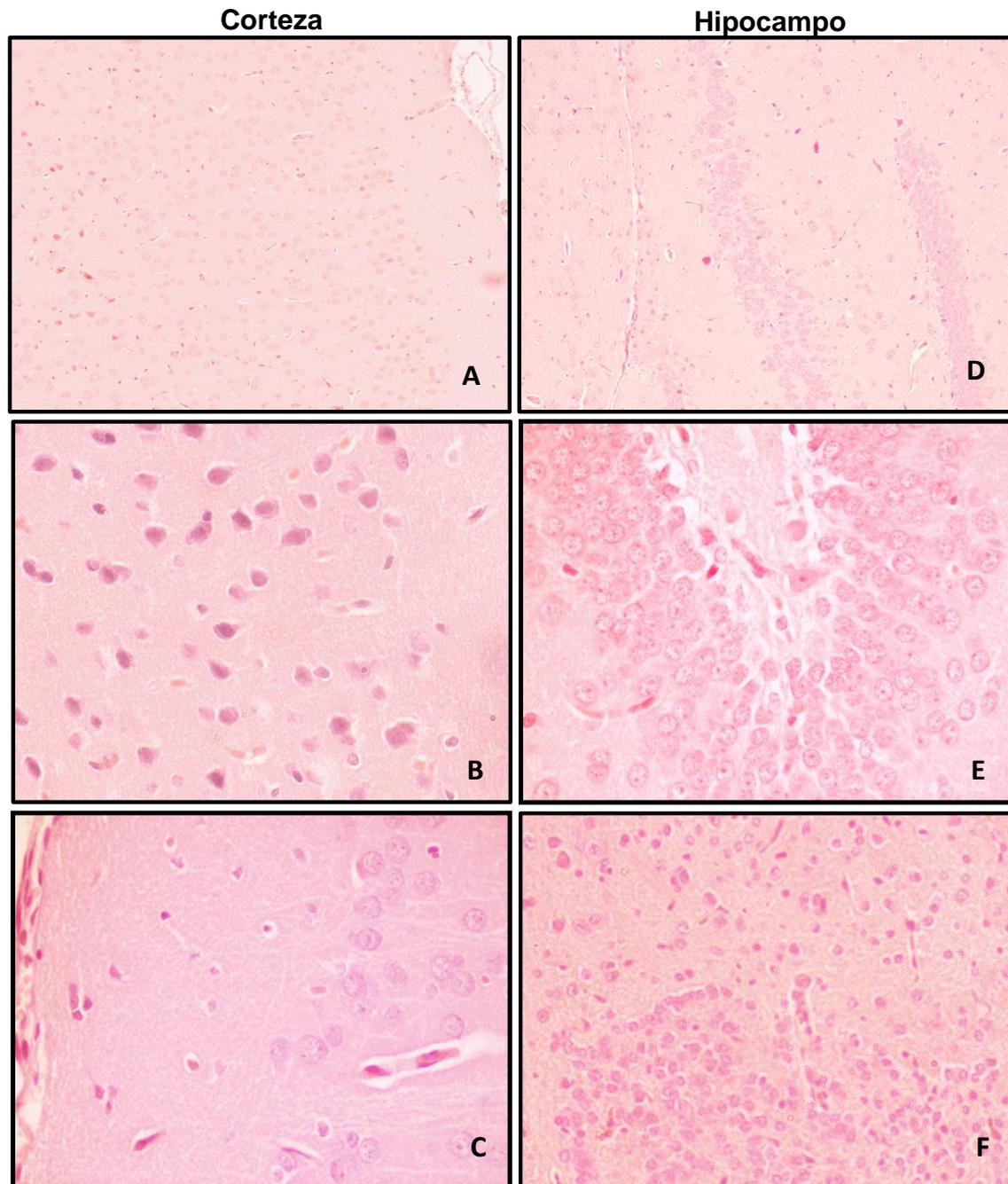


Figura 36: Cerebro de ratas control y con sobrecarga aguda de Fe-dextrán. Tinción con HE. Corteza cerebral: **A.** Control (100X); **B.** Sobrecargada con Fe, 6 h pi (400X); **C.** Sobrecargada con Fe, 8 h pi (400X). Hipocampo: **D.** Control (100X); **E.** Sobrecargada con Fe, 6 h pi (400X); **F.** Sobrecargada con Fe, 8 h pi (400X). Imágenes representativas de todas las áreas estudiadas donde se observa citoarquitectura normal.

3.2.8- Determinación de la generación de RL^\bullet por EPR

Los RL^\bullet combinados con el atrapador de spin PBN generan aductos que dan espectros de EPR que coinciden con las señales obtenidas mediante simulaciones realizadas utilizando los mismos parámetros (Figura 37). Aunque las constantes mencionadas pueden ser asignadas a RL^\bullet , los estudios realizados con atrapadores de espin no son capaces de distinguir entre los aductos que forman ROO^\bullet , RO^\bullet y R^\bullet debido a la similitud de dichas constantes (Buettner, 1987). Se observaron aductos en presencia de PBN y DMSO (Figura 37 A). Los datos de la Figura 37 B muestran la generación de los RL^\bullet en muestras de cerebro de ratas suplementadas con Fe-dextrán, al cabo de 6 y 8 h. No se observaron diferencias significativas entre animales controles y tratados cuando las muestras de homogeneizado de cerebro fueron incubadas *in vitro* durante 30 min.

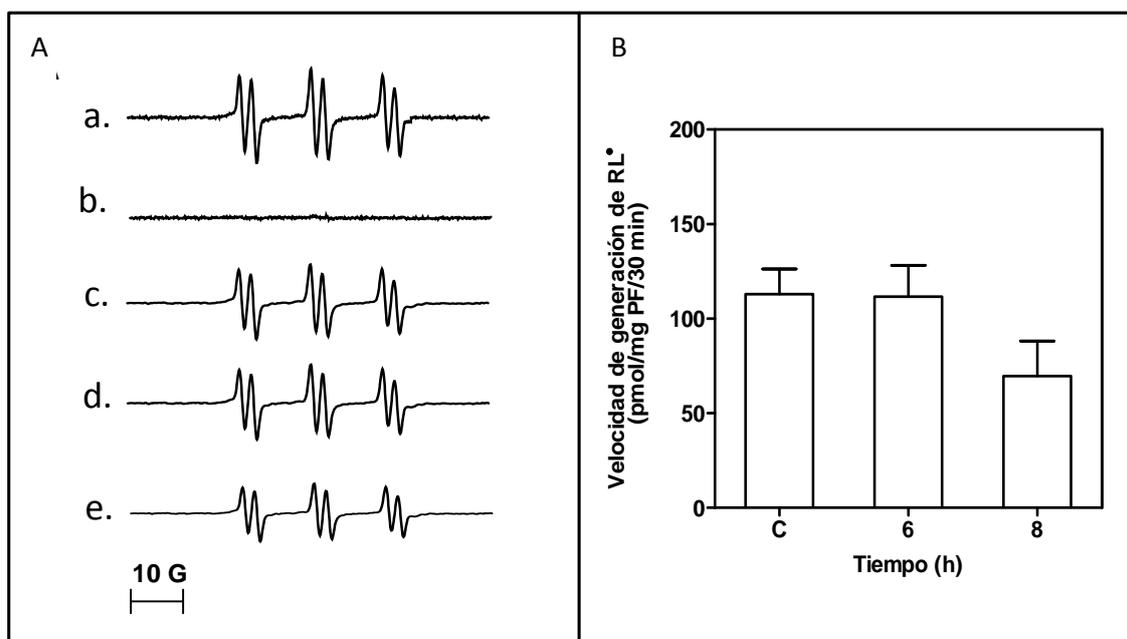


Figura 37: Generación de RL^\bullet en muestras de cerebro de rata. **A.** Señal de EPR de RL^\bullet en muestras de cerebro de ratas controles y sobrecargadas con Fe-dextrán (a) espectro simulado utilizando los siguientes parámetros: $g=2,005$ y $a_H=1,8$ G, (b) PBN-DMSO, (c) muestra de cerebro de rata control, (d) muestra de cerebro de rata sobrecargada con Fe, 6 h pi. (e) cerebro de rata sobrecargada con Fe, 8 h pi. **B.** Cuantificación de la generación de RL^\bullet en muestras de cerebro de ratas a distintos tiempos luego de la administración de Fe.

3.2.9- Determinación del contenido de TBARS

Dado que el Fe es un catalizador efectivo del daño oxidativo en lípidos, la peroxidación lipídica fue determinada como el contenido de TBARS en homogeneizados de muestras de cerebro de ratas control y luego de 6 h del tratamiento agudo con Fe-dextrán. El valor control fue de $0,13 \pm 0,01$ nmol MDA/mg

PF, mientras que, luego del tratamiento con Fe-dextrán, se observó un incremento del 30% ($0,17 \pm 0,02$ nmol MDA/mg PF).

3.2.10- Determinación de α -T

El contenido del antioxidante liposoluble α -T es una estimación relevante de la protección antioxidante a nivel lipofílico. La sobrecarga aguda de Fe en cerebro no afectó el contenido de este antioxidante liposoluble en el rango de tiempo estudiado en este trabajo ($11,30 \pm 0,05$ y $12,40 \pm 0,07$ pmol/mg PF, en animales controles y sobrecargados con Fe, respectivamente).

3.2.11- Determinación de los índices RL^{\bullet}/α -T y TBARS/ α -T

El índice RL^{\bullet}/α -T fue determinado con el fin de evaluar el estado oxidativo en el medio lipofílico. Luego de 6 h pi, esta relación ($9,0 \pm 0,7$) UA, no se vio modificada con respecto a los valores control ($10 \pm 0,9$) UA. Como se indicó previamente, el contenido de TBARS puede considerarse como un indicador de daño causado por RL^{\bullet} y el contenido de α -T podría considerarse como el antioxidante más eficiente en la fase lipofílica. De este modo, la relación TBARS/ α -T podría ser considerado como un índice de daño/protección en dicha fase (Galleano y col., 2002). Esta relación se incrementó significativamente (20%) en cerebro de ratas sobrecargadas con Fe-dextrán, comparado con los valores control ($11,60 \pm 0,03$ y $13,90 \pm 0,08$ UA, respectivamente). Si bien este incremento resulta significativo, la reacción entre el TBA y el MDA no es específica y otros componentes carbonílicos resultantes de la peroxidación lipídica pueden reaccionar con el TBA generando una sobreestimación de los resultados (Rey y col., 2005), como por ejemplo proteínas y péptidos solubles (Schmedes y Holmes, 1989; Shamberger y col., 1977), azúcares (Wang y col., 2002), aminoácidos y ácidos grasos (Hoyland y Taylor, 1991).

3.2.12- Unión de NF- κ B a ADN

El factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa, en la proliferación celular, la apoptosis y el desarrollo. Se ha propuesto su activación por H_2O_2 (Gloire y col., 2006). El porcentaje de activación de NF- κ B se evaluó con el fin de determinar si los cambios en el contenido de Fe y el daño oxidativo, descriptos previamente, están relacionados con la activación de este factor que podría participar en la consecuente protección en el cerebro evitando el desarrollo de lesiones. Los niveles de activación de NF- κ B se determinaron en extractos de proteínas nucleares de muestras de cerebro de ratas luego de 4, 6 y 8 h

de la administración del Fe-dextrán (Figura 38). Se observó un incremento significativo del 30% 8 h post-administración de Fe.

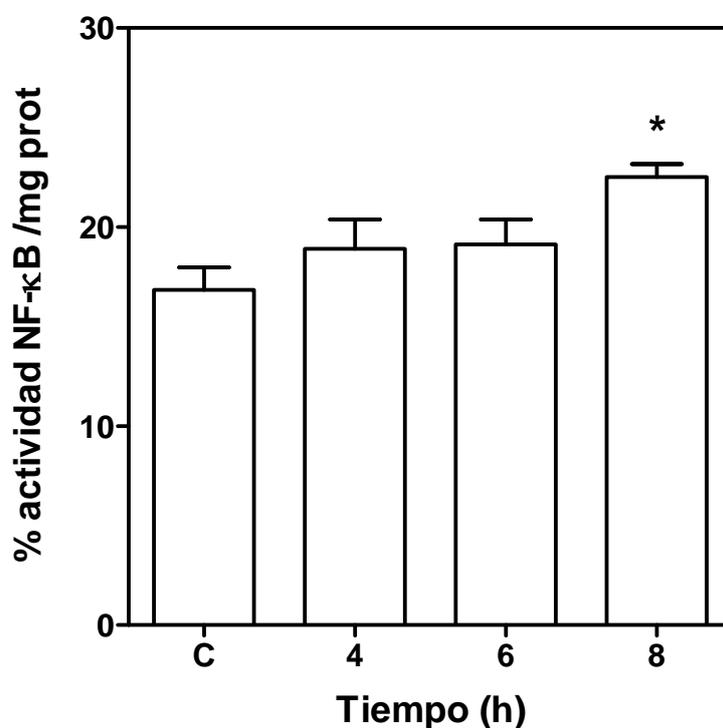


Figura 38: Porcentaje de actividad de NF-κB en función del tiempo luego de la administración aguda de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores control, ANOVA, $p < 0,05$ seguido de test de Turkey.

3.2.13- Determinación de la actividad de CAT

La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método espectrofotométrico descrito en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos de este trabajo. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido cerebral. Se observó un aumento significativo luego de 21 h de la administración de Fe-dextrán (Figura 39).

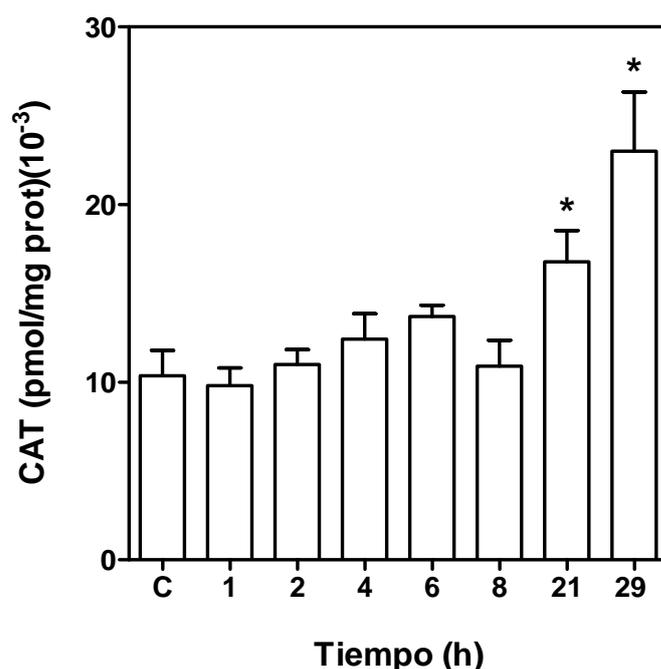


Figura 39: Actividad de CAT en muestras de cerebro de rata en función del tiempo post administración de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores control, ANOVA, $p < 0,05$ seguido del test de Turkey.

3.2.14- Determinación de la integridad de ADN nuclear y mitocondrial por PCR

La integridad del ADN nuclear y mitocondrial fue determinada por PCR en muestras de cerebro total. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de integridad del ADN nuclear y mitocondrial luego de 6 h pi con respecto a los valores observados en cerebros provenientes de animales controles (Tabla 2).

Tabla 2

Determinación del porcentaje de integridad de ADN nuclear y mitocondrial

	Integridad del ADN nuclear (%)	Integridad del ADN mitocondrial (%)
Control	100 ± 9	100 ± 10
Fe-dextrán 6 h	59 ± 4*	35 ± 11 *,**

*significativamente diferente de los valores control, $p < 0,05$.

**significativamente diferente del ADN nuclear, $p < 0,05$.

3.2.15- Contenido de Fe total en áreas cerebrales

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 2.2.1 de Materiales y Métodos de este trabajo, a partir de 100 mg de PF. Las determinaciones se realizaron en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado. Aunque el contenido de Fe puede variar en las diferentes áreas del cerebro debido a las características celulares específicas de cada una de esas áreas, luego de 6 h de administración, el contenido de Fe aumentó significativamente en las tres áreas estudiadas en relación a sus respectivos valores en animales control. Dicho aumento corresponde a 2,4 veces en la corteza, 1,6 veces en el hipocampo y 3,0 en el cuerpo estriado en relación a los valores en cerebros de animales control (Figura 40).

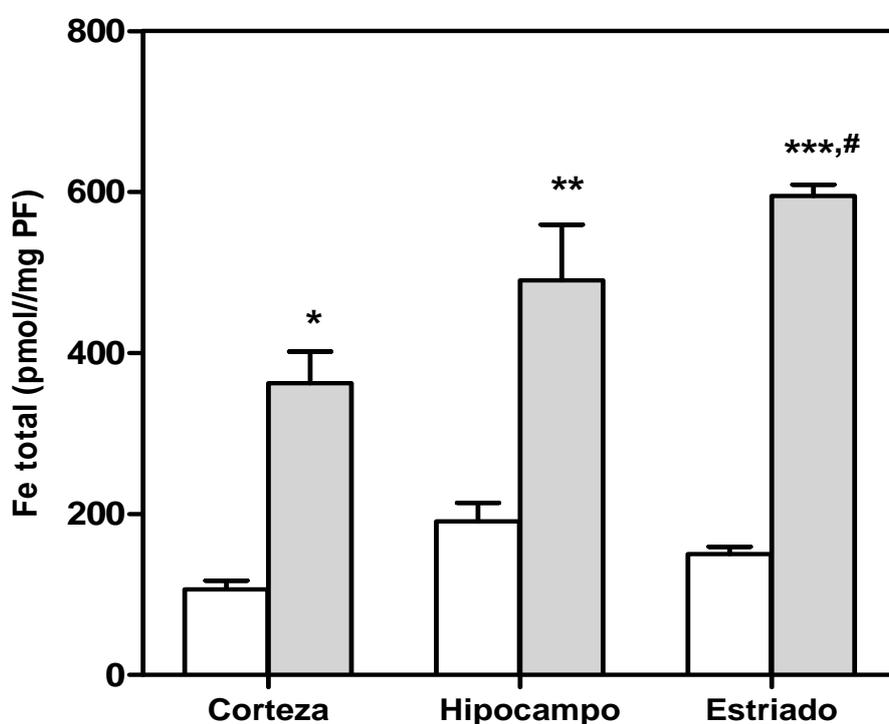


Figura 40: Contenido de Fe total en áreas cerebrales de ratas control (□), y con sobrecarga aguda de Fe-dextrán (■) luego de 6 h pi.

*significativamente diferente de los valores control de corteza. ANOVA, $p < 0,05$.

**significativamente diferente de los valores control de hipocampo. ANOVA, $p < 0,05$.

***significativamente diferente de los valores control de cuerpo estriado. ANOVA, $p < 0,05$.

#significativamente diferente de los valores de corteza, luego del tratamiento con Fe-dextrán. ANOVA, $p < 0,05$.

En coincidencia con estos resultados se observaron depósitos de Fe en el tejido cerebral (Figura 41).

Tinción con azul de Prusia de Perls

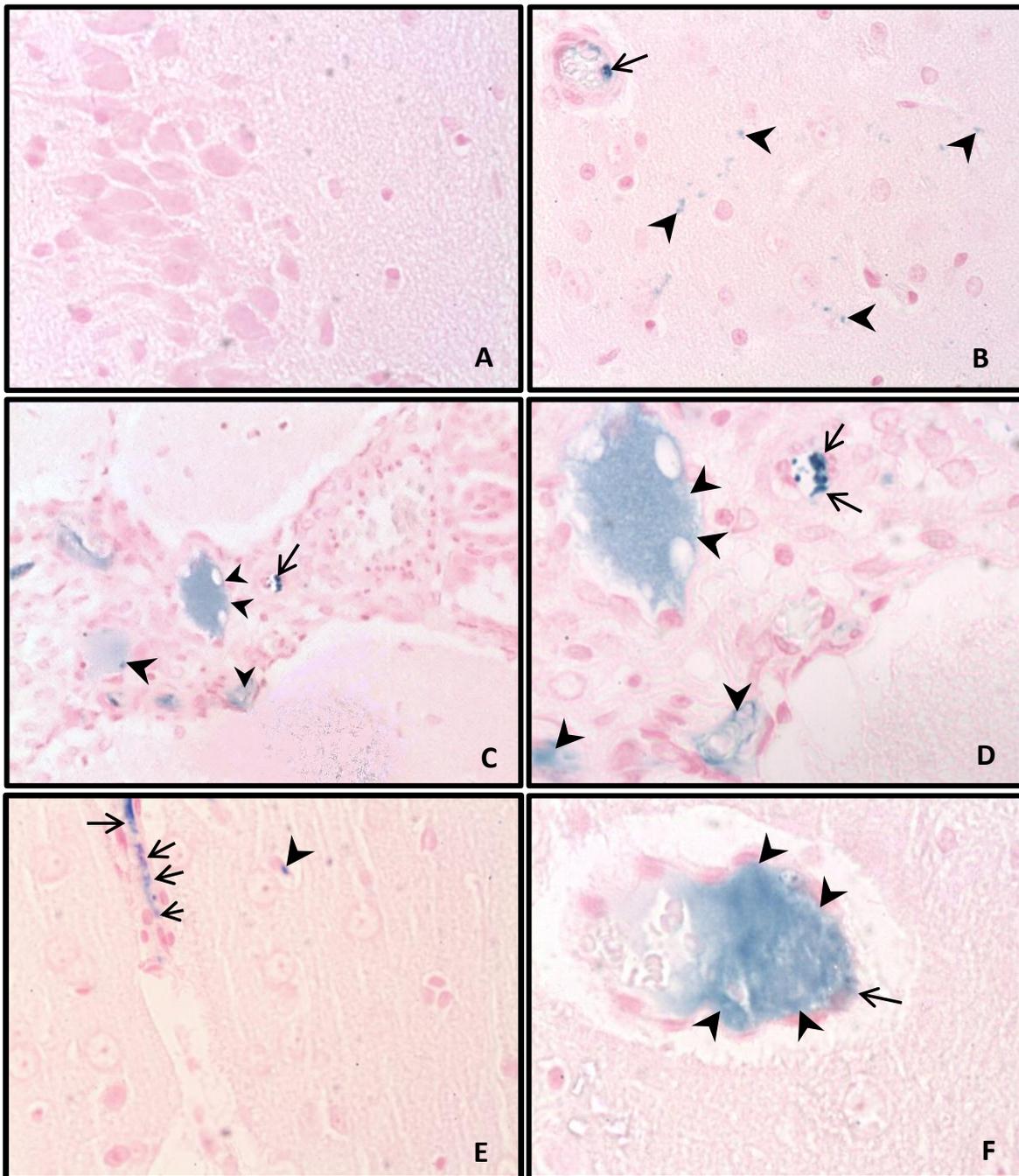


Figura 41: Cerebro de ratas control y con sobrecarga aguda de Fe-dextrán. Tinción con azul de Prusia de Perls. **A.** Hipocampo control, sin depósitos de Fe (400X). El control es representativo de todas las áreas estudiadas, mostrando citoarquitectura y vasculatura normal (sin depósitos de Fe); **B.** Depósito de Fe vascular (flecha) y tisular (cabezas de flecha), 6 h post inyección (pi) (400X); **C.** Depósito de Fe intraluminal en procesos ciliares del tercer ventrículo (cabezas de flecha) y vascular (flecha), 6 h pi (100X); **D.** A mayor aumento, depósito de Fe tisular (cabezas de flecha) y en la pared vascular en el tercer ventrículo (flechas), 6 h pi (400X), **E.** Depósito de Fe endotelial en corteza (flechas) y tisular (cabeza de flecha), 8 h pi (400X); **F.** Depósito de Fe en la pared vascular (flecha) y luminal (cabezas de flecha), 8 h pi. (1000X).

En los cerebros provenientes de animales controles se observó tanto la citoarquitectura como la vasculatura normal característica de animales sanos no tratados. En los cerebros provenientes de ratas sobrecargadas con Fe, luego de 6 h pi se observaron depósitos de Fe predominantemente tisular, mientras que luego de 8 h pi, los depósitos de Fe observados fueron en su mayoría vasculares.

3.2.16- Determinación de la generación de RL^{\bullet} en áreas cerebrales

Aunque el contenido de Fe total aumentó al cabo de 6 h pi en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, la velocidad de generación de RL^{\bullet} sólo se incrementó significativamente en la corteza al cabo de 6 h de la administración de Fe-dextrán (Figura 42).

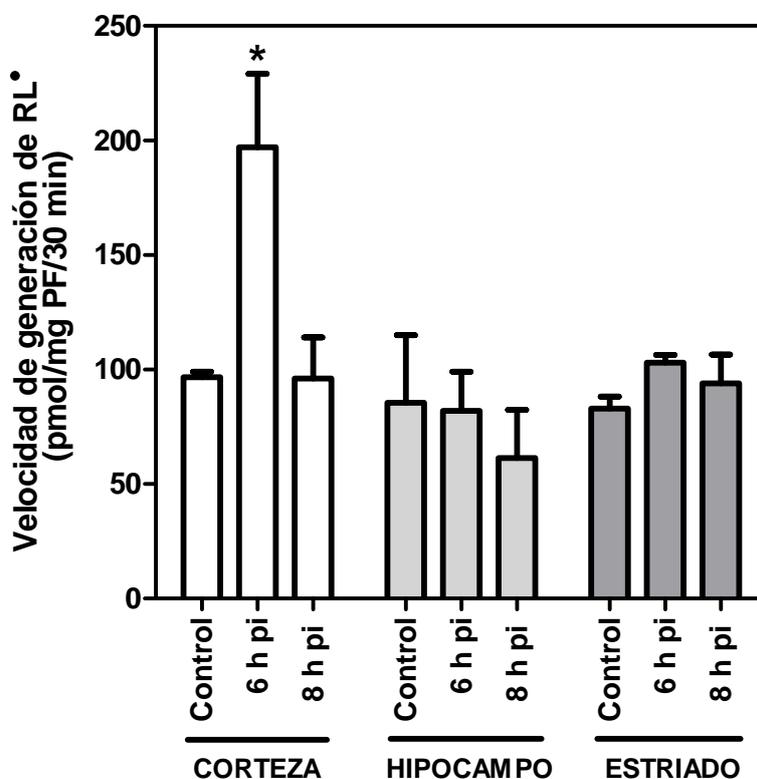


Figura 42: Efecto de la sobrecarga de Fe sobre la velocidad de generación de RL^{\bullet} en áreas cerebrales.

*significativamente diferente de los valores en la correspondiente área de cerebro proveniente de animales control, ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.17- Determinación de la actividad de CAT en áreas cerebrales

La actividad de CAT fue evaluada luego de la sobrecarga de Fe en cada una de las áreas cerebrales estudiadas. En la Tabla 3 se muestra que la actividad enzimática aumentó después de 8 h de administración de Fe en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado (2,7 veces, 85 y 46%, respectivamente).

Tabla 3
Actividad de CAT luego del tratamiento con Fe en áreas cerebrales

Actividad de CAT (pmol/mg prot) (10^{-3})	
Corteza	
control	3,3 ± 0,3
Fe-dextrán 6 h	9 ± 1*
Fe-dextrán 8 h	7,9 ± 0,7*
Hipocampo	
control	3,2 ± 0,5
Fe-dextrán 6 h	4,1 ± 0,2
Fe-dextrán 8 h	6,0 ± 0,6*
Cuerpo Estriado	
control	6,2 ± 0,3
Fe-dextrán 6 h	5,5 ± 0,2
Fe-dextrán 8 h	9 ± 1*

*significativamente diferente de los valores control ($p < 0,05$), en la respectiva área cerebral.

3.2.18- Determinación del contenido de tioles totales en áreas cerebrales

El contenido de tioles totales fue evaluado luego de transcurridas 6 y 8 h de establecida la sobrecarga de Fe en cada una de las áreas estudiadas. Se observó una disminución significativa en la corteza luego de ambos períodos pi, mientras que no se observaron diferencias en el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 43).

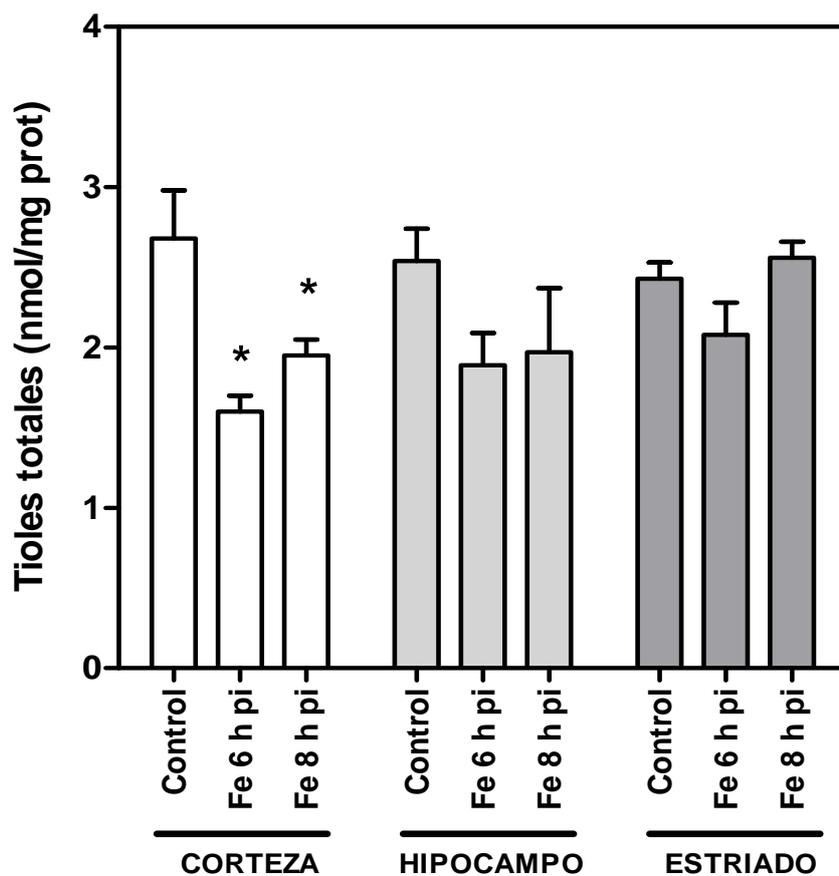


Figura 43: Efecto de la sobrecarga de Fe en el contenido de tioles totales en áreas cerebrales luego de 6 y 8 h de establecida la sobrecarga.

*significativamente diferente de los valores control de la corteza, ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.19- Determinación del contenido de α -T en áreas cerebrales

La concentración de α -T fue evaluada luego de 6 y 8 h de administración de Fe-dextrán en cada una de las áreas estudiadas (Figura 44). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las áreas estudiadas.

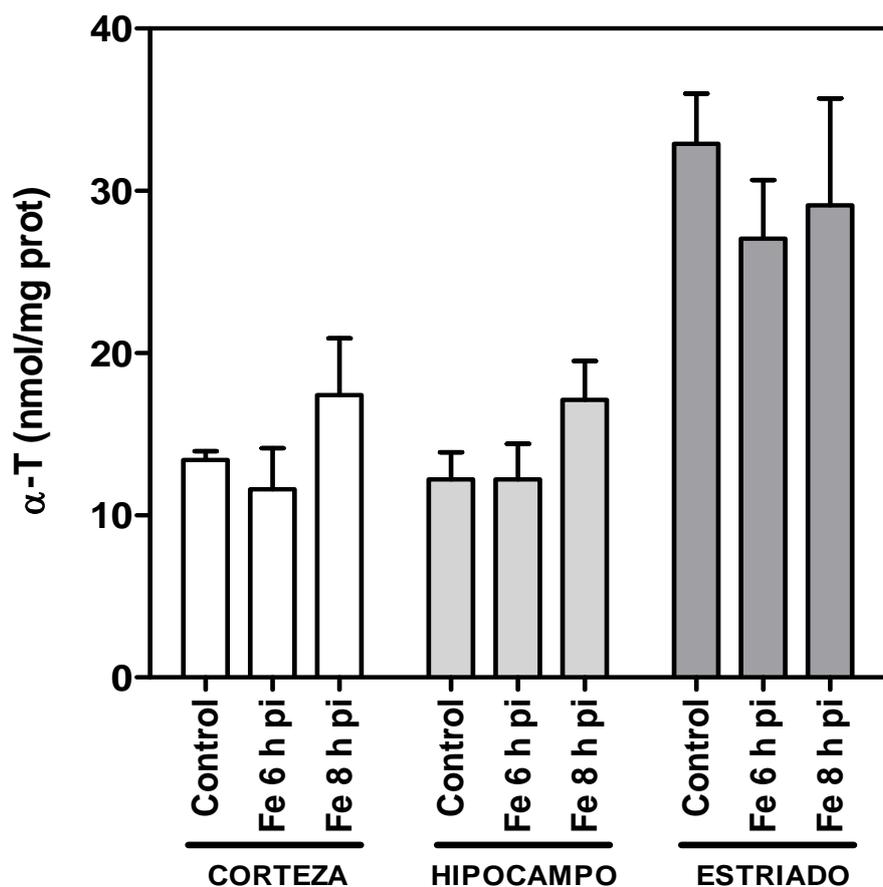


Figura 44: Efecto de la sobrecarga de Fe en el contenido de α -T en las áreas cerebrales en estudio luego de 6 y 8 h de establecida la sobrecarga.

3.2.20- Determinación del índice RL^{\bullet}/α -T en áreas cerebrales

El índice RL^{\bullet}/α -T fue determinado con el fin de evaluar el estado oxidativo en el medio lipofílico. Luego de 6 h pi, esta relación se vio incrementada únicamente en la corteza, no mostrando diferencias significativas con respecto a las áreas equivalentes en cerebros de animales no tratados (Figura 45).

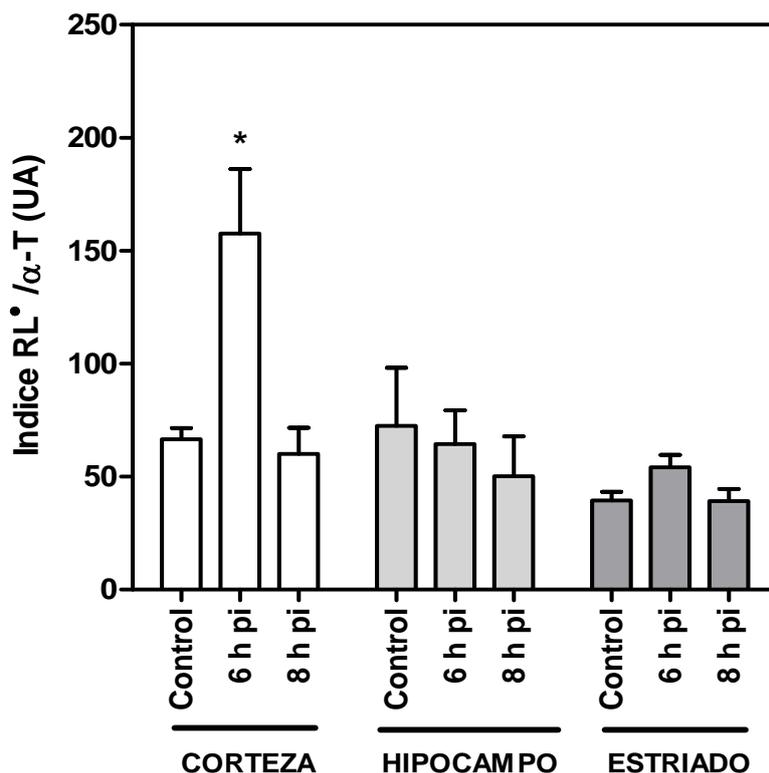


Figura 45: Índice $RL^*/\alpha-T$ en muestras de cerebro de rata en función del tiempo luego de la administración de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores control en la corteza, ANOVA, $p < 0,05$.

3.2.21- Determinación del índice A^*/AH^- en áreas cerebrales

Luego de la sobrecarga aguda de Fe-dextrán *in vivo*, el contenido de A^+ no se modificó significativamente en ninguna de las tres áreas estudiadas, mientras que el contenido de AH^- se incrementó significativamente en el cuerpo estriado luego 6 y 8 h pi con respecto a los valores control (Figura 46).

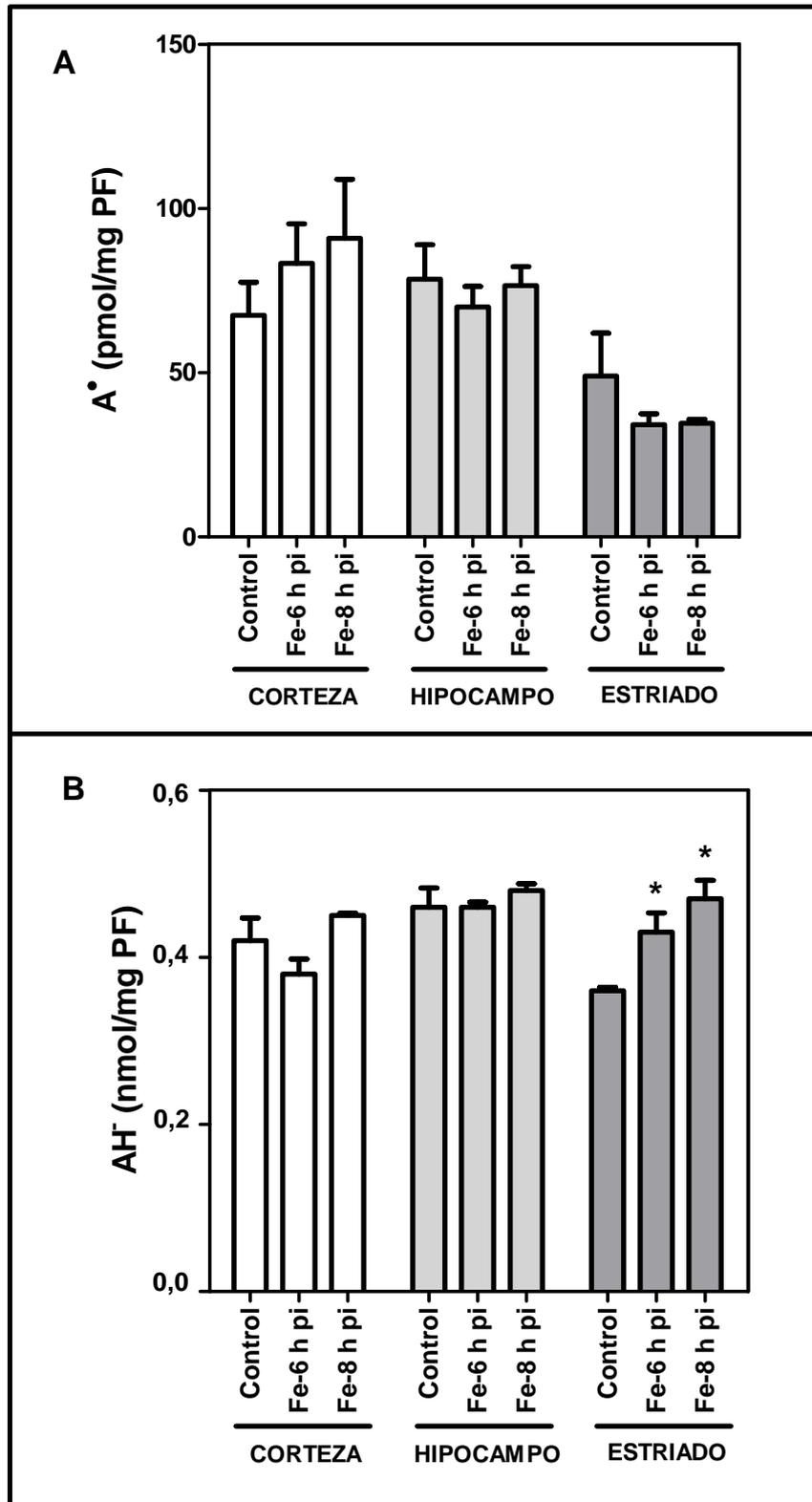


Figura 46: Efecto de la sobrecarga aguda de Fe en áreas cerebrales **A.** Contenido de A• en áreas cerebrales de animales que recibieron Fe-dextrán. **B.** Contenido de AH• en áreas cerebrales luego de 6 y 8 h de establecida la sobrecarga.

*significativamente diferente de los valores en las correspondientes áreas en cerebros provenientes de animales controles, ANOVA, $p < 0,05$, seguido de test de Turkey.

La relación A^\bullet/AH^- aumentó significativamente en las muestras de corteza de rata luego de 6 h de administración de Fe-dextrán (Figura 47), sugiriendo la aparición de estrés oxidativo luego del tratamiento en el medio hidrofílico.

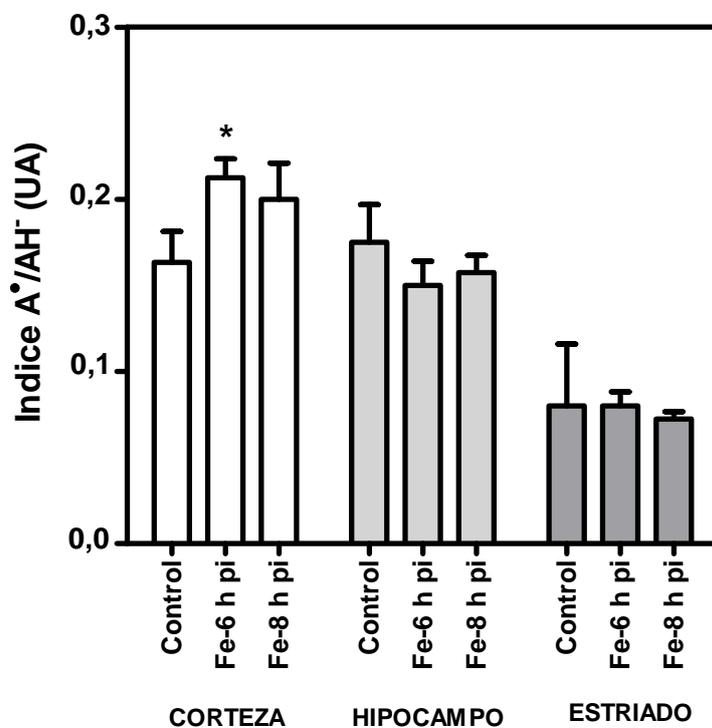
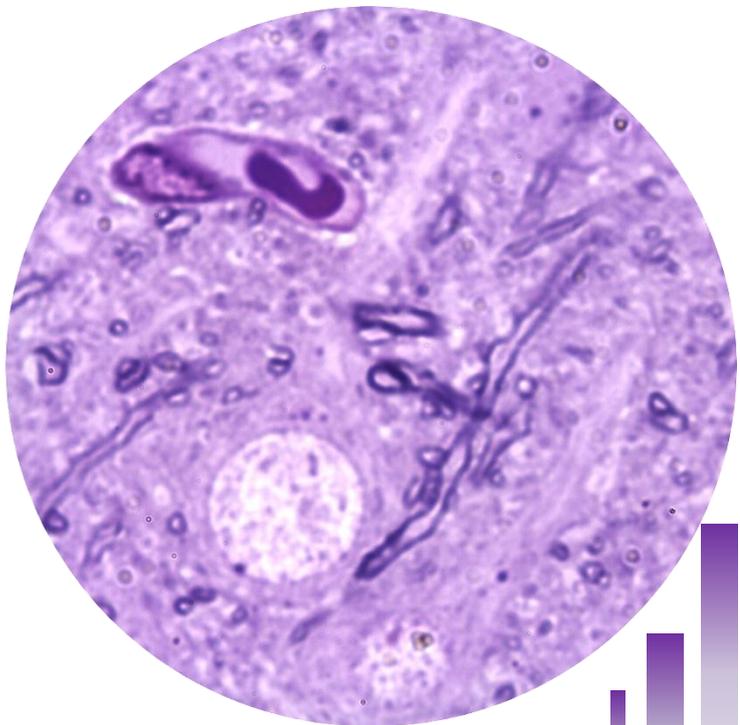


Figura 47: Efecto de la sobrecarga de Fe en el índice A^\bullet/AH^- en áreas cerebrales luego de 6 y 8 h de establecida la sobrecarga.
*significativamente diferente de los valores en las correspondientes áreas en cerebros provenientes de animales controles, ANOVA, $p < 0,05$, seguido de test de Turkey.



Astrocyto de rata (Tinción con solución de toluidina-MOAR)

3.3- Modelo de sobrecarga subcrónica de Fe

3.3.1- Determinación del contenido de Fe total en cerebro

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 2.2.1 en Materiales y Métodos de este trabajo. Se analizó el efecto de la sobrecarga subcrónica de Fe sobre el contenido de Fe total en función del tiempo posterior a la 6^{ta} dosis de Fe. Se observó un aumento significativo de 7,7 veces a las 2 h pi con respecto al valor control (Figura 48).

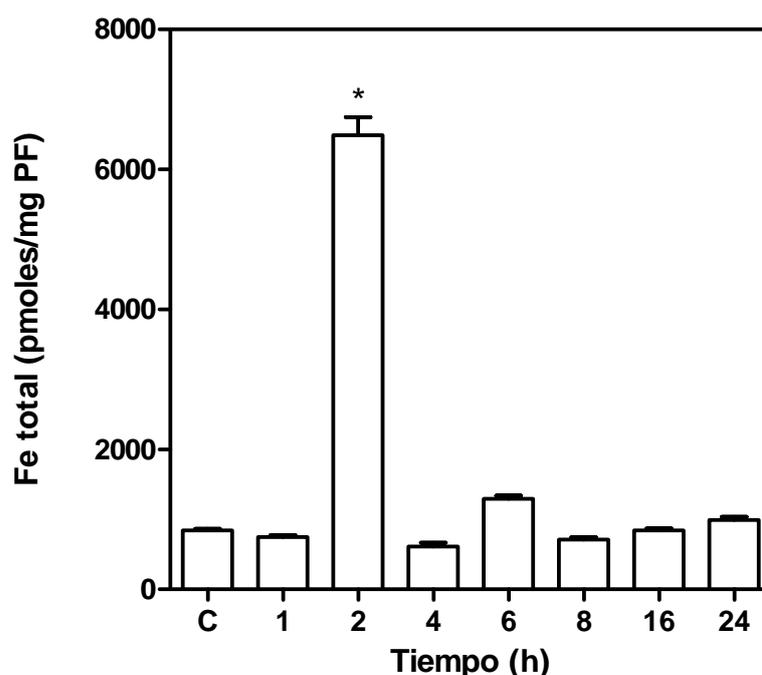


Figura 48: Contenido de Fe total en cerebro de ratas con sobrecarga subcrónica de Fe en función del tiempo post administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebro de ratas control. ANOVA, $p < 0,05$.

En la Figura 49, se muestran imágenes obtenidas de cortes cerebrales mediante MOAR, provenientes de ratas tratadas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán. En la Figura 49 A se observa la estructura normal, sin depósitos de Fe. Luego de 2 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe, se observaron depósitos de Fe en vasos subcorticales (Figura 49 B) y corticales (Figura 49 C y D). Luego de 8 h de administración de la 6^{ta} dosis de Fe, la citoarquitectura se presenta en forma normal con respecto a la observada en cerebros provenientes de animales control (Figura 49 E y F).

Microscopía Óptica de Alta Resolución

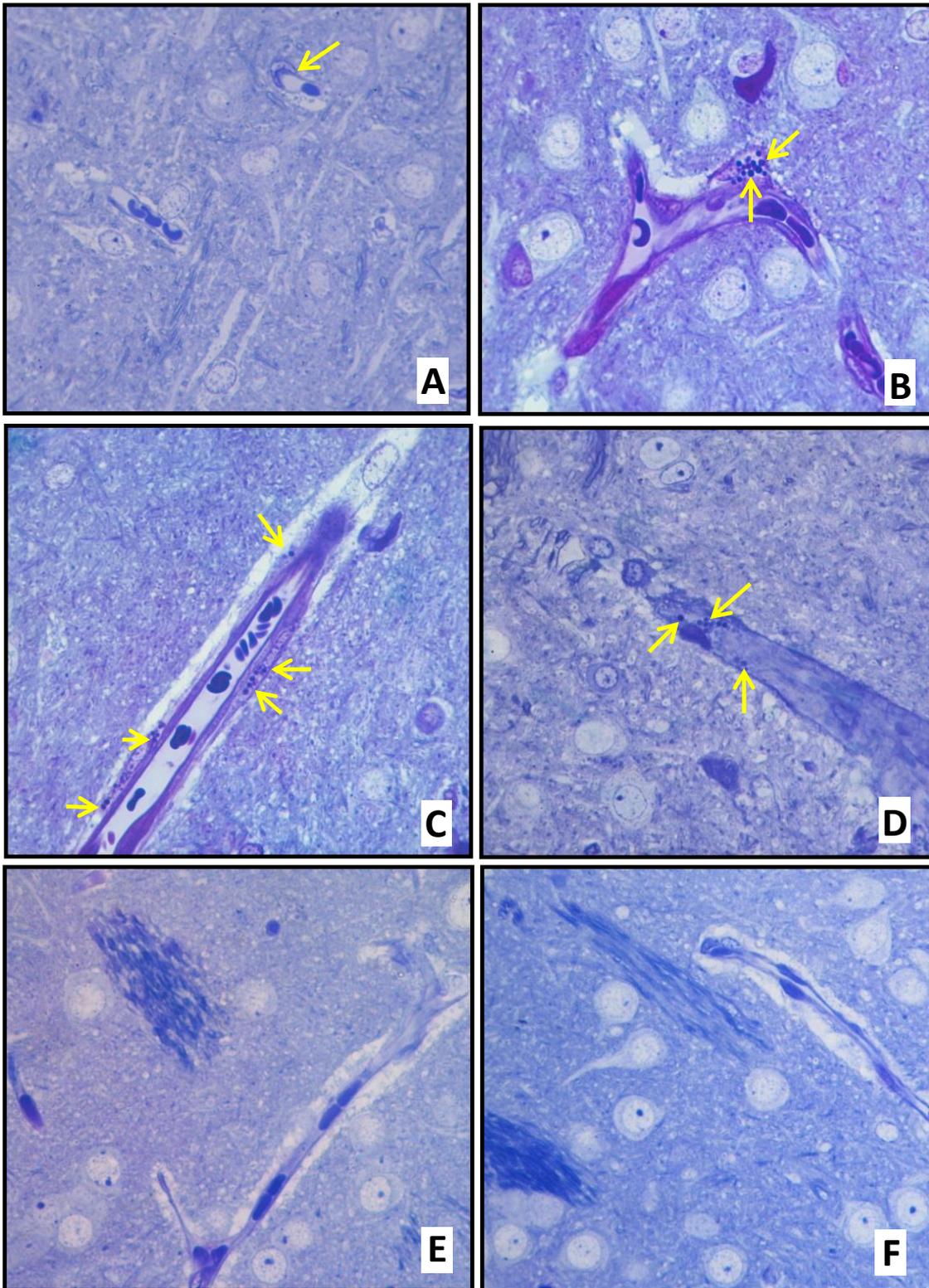


Figura 49: Cerebro de ratas control y con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán evaluada por MOAR. **A.** Cerebro control, donde se observa estructura normal (sin depósitos de Fe) y la integridad de la barrera hematoencefálica (flecha) (1000X); **B.** Astrocito con depósito de Fe (flecha) de una rata con sobrecarga subcrónica con Fe-dextrán, 2 h pi (1000X); **C.** y **D.** Depósito de Fe vascular cortical, 2 h pi (1000X); **E.** y **F.** Citoarquitectura normal, 8 h pi (1000X). Imágenes representativas de todas las áreas estudiadas.

3.3.2- Determinación del contenido de LIP

El contenido de LIP fue determinado según el protocolo descrito en la sección 2.2.4 de Materiales y Métodos de este trabajo empleando 200 mg de tejido cerebral. Se observó un aumento significativo de 2,5 veces sobre el valor control a las 2 h pi, que se mantuvo elevado durante todo el período estudiado (Figura 50).

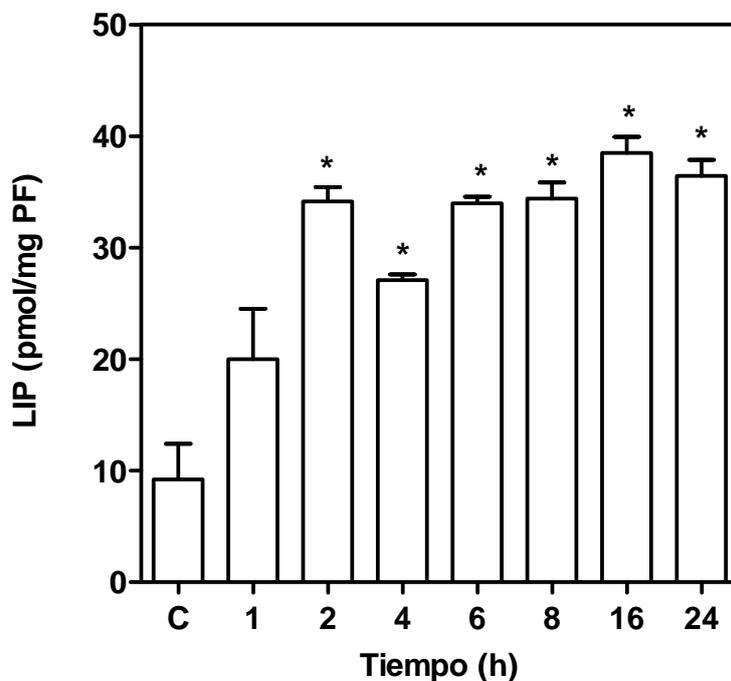


Figura 50: Contenido de LIP en cerebro de ratas con sobrecarga subcrónica de Fe en función del tiempo post administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebro de ratas control. ANOVA, $p < 0,05$.

3.3.3- Determinación de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA

La velocidad de oxidación del marcador fluorescente DCFH-DA, considerado un índice de la capacidad de generación celular de especies activas, fue determinada en función del tiempo pi. Se observó un aumento significativo luego de 4 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe (Figura 51).

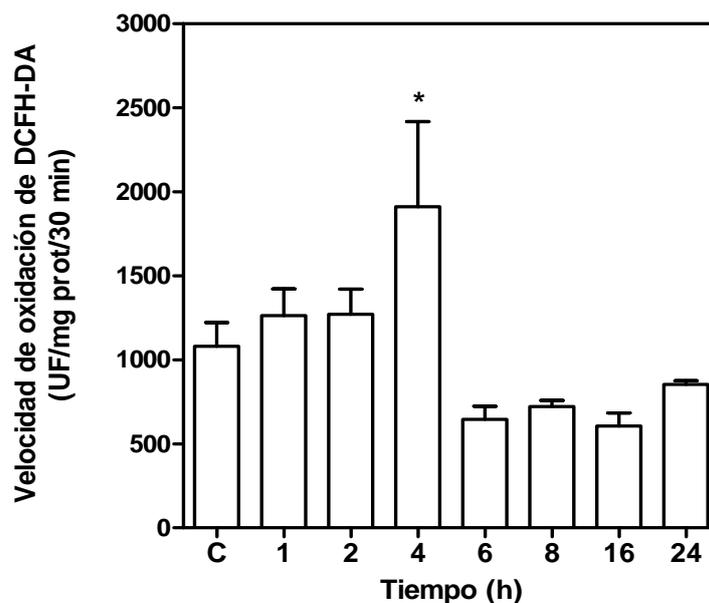


Figura 51: Velocidad de oxidación de DCFH-DA en función del tiempo post administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas controles. ANOVA, $p < 0,05$.

3.3.4- Determinación del índice A^{\bullet}/AH^{\cdot}

Luego de la sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán *in vivo*, el contenido de A^{\bullet} aumentó significativamente luego de 4 h pi, mientras que el contenido de AH^{\cdot} disminuyó a las 2, 4, 6 y 8 h pi con respecto a los valores control (Figura 52).

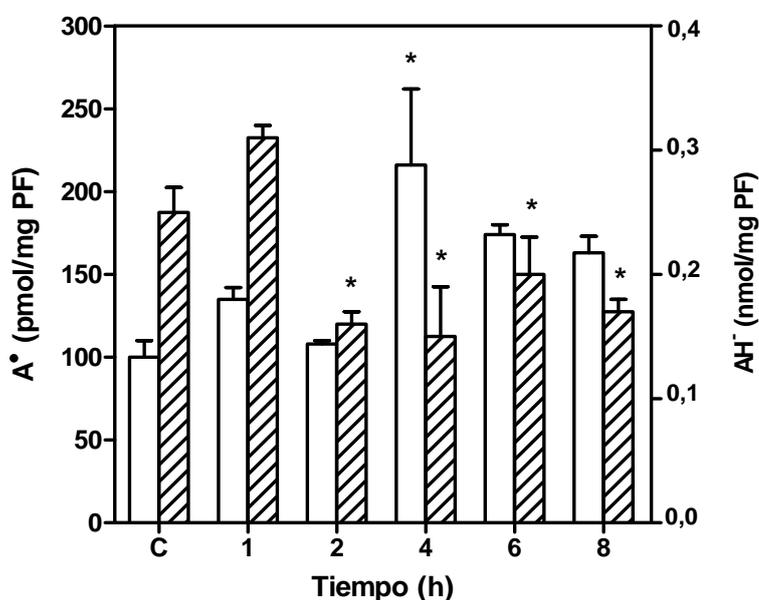


Figura 52: Cuantificación del contenido de A^{\bullet} (\square) y de AH^{\cdot} (\square) en cerebro de ratas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán en función del tiempo post tratamiento.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control. ANOVA, seguido de test de Turkey, $p < 0,05$.

La relación A^*/AH^- aumentó significativamente en las muestras de cerebro de los animales tratados luego de 4 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, comparada con los valores control (Figura 53), sugiriendo la aparición de estrés oxidativo luego del tratamiento.

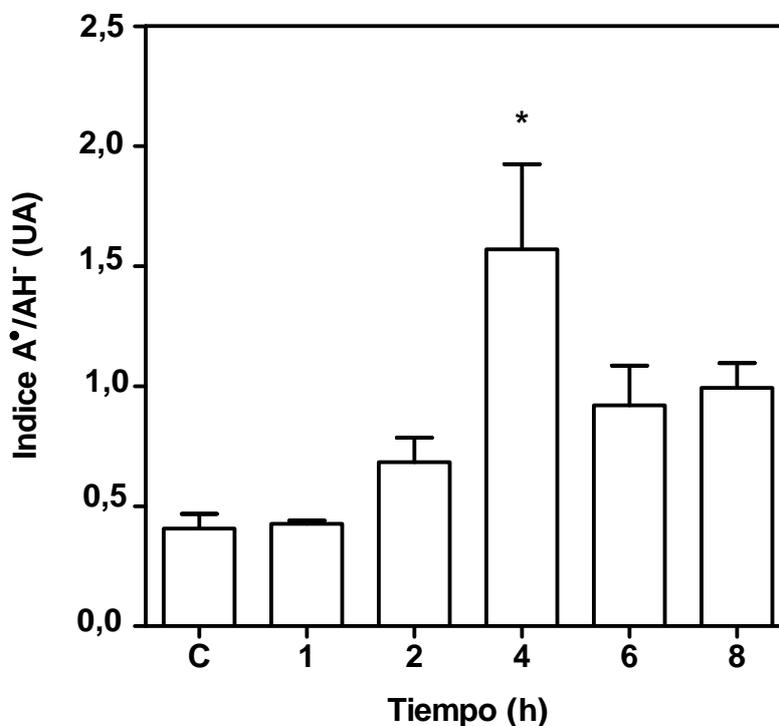


Figura 53: Índice A^*/AH^- en cerebro de ratas sobrecargadas con Fe, en función del tiempo post-administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores control. ANOVA, $p < 0,05$, seguido de test de Turkey.

3.3.5- Determinación de la generación de RL^\bullet por EPR

La generación de RL^\bullet fue determinada a distintos tiempos luego de la 6^{ta} dosis de Fe. Los espectros característicos de los aductos generados con los RL^\bullet combinados con el atrapador de espín PBN se muestran en la Figura 54 A. Los homogeneizados de muestras de cerebro fueron incubados en presencia de PBN-DMSO 40 mM por 30 min. Los datos de la Figura 54 B muestran el perfil en función del tiempo de la generación de los RL^\bullet en muestras de cerebro de ratas suplementadas con Fe-dextrán. En coincidencia con el aumento del contenido de Fe total, se observaron diferencias significativas entre animales control y tratados 2 h pi.

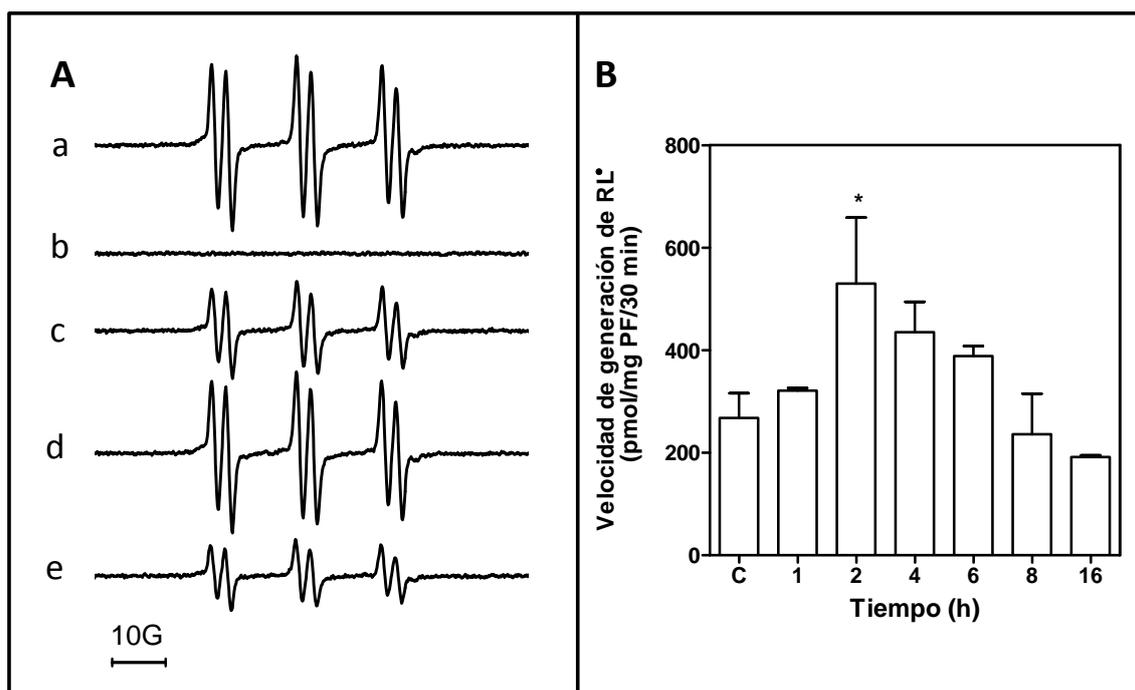


Figura 54: Velocidad de generación de RL• en muestras de cerebro de rata. **A.** Señal de EPR de RL• en muestras de cerebro de ratas control y sobrecargadas con Fe-dextrán, luego de la 6^{ta} dosis (a) espectro simulado utilizando los siguientes parámetros: $g=2,005$ y $a_H=1,8$ G, (b) PBN-DMSO, (c) muestra de cerebro de rata control, (d) muestra de cerebro de rata sobrecargada con Fe, 2 h pi, (e) muestra de cerebro de rata sobrecargada con Fe, 16 h pi. **B.** Cuantificación de la velocidad de generación de RL• en cerebros de rata luego de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe.

3.3.6- Determinación del índice RL•/ α -T

El contenido de α -T resultó significativamente disminuido con respecto al control (Figura 55, inserto). Se evaluó la relación RL•/ α -T durante el período 1 a 8 h pi, que aumentó significativamente en las muestras de cerebro de animales tratados con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán a las 2 h pi luego de la 6^{ta} dosis, comparada con los valores control (Figura 55), sugiriendo la aparición de estrés oxidativo en el medio lipofílico a consecuencia del tratamiento.

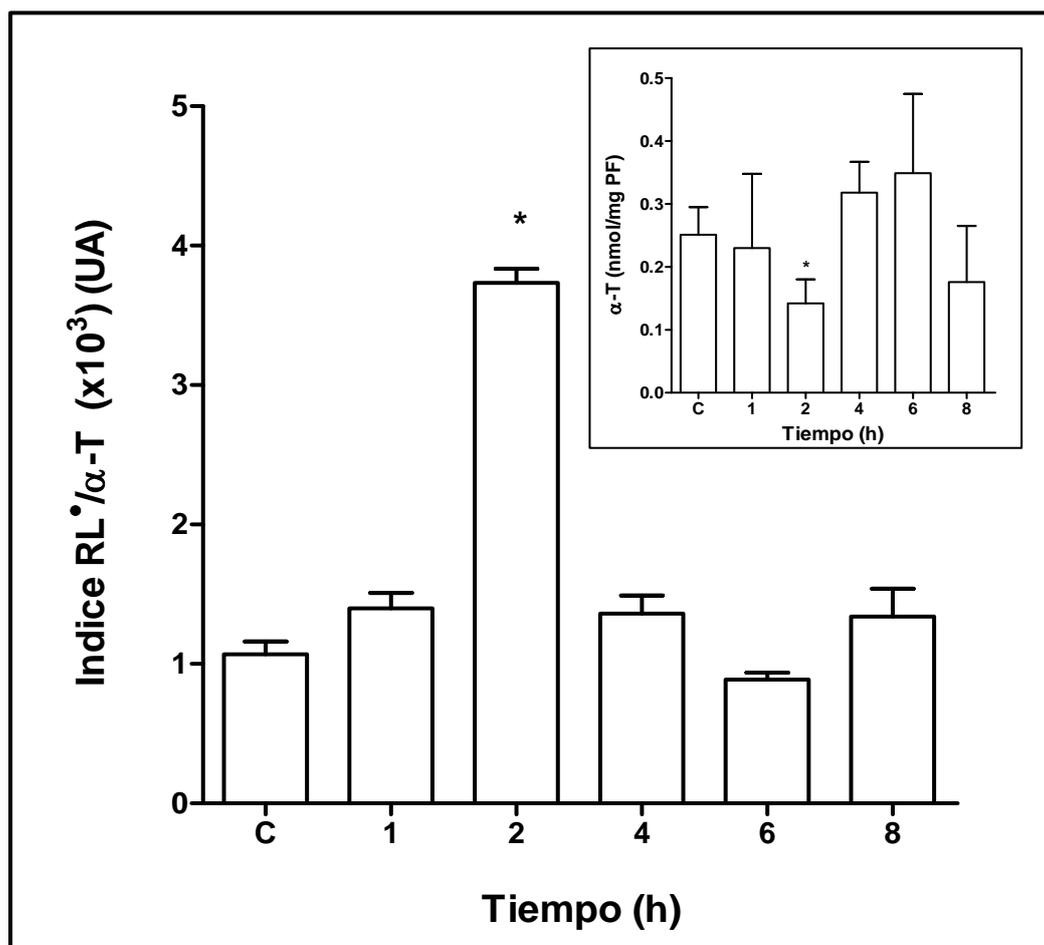


Figura 55: Índice RL^{*}/α-T en muestras de cerebro de rata en función del tiempo luego de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán. Inserto: Contenido de α-T en función del tiempo en muestras de cerebro de ratas sobrecargadas con Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control, test de Student, $p < 0,05$.

3.3.7- Determinación de la actividad de SOD

La actividad de SOD fue determinada espectrofotométricamente a partir de 100 mg de tejido cerebral, midiendo la velocidad de reducción del Cit c. El O₂^{*} fue generado enzimáticamente por el sistema xantina-XO de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.3.5 de Materiales y Métodos de este trabajo. Se observó un aumento significativo en la actividad enzimática luego de 1 y 2 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe (Figura 56).

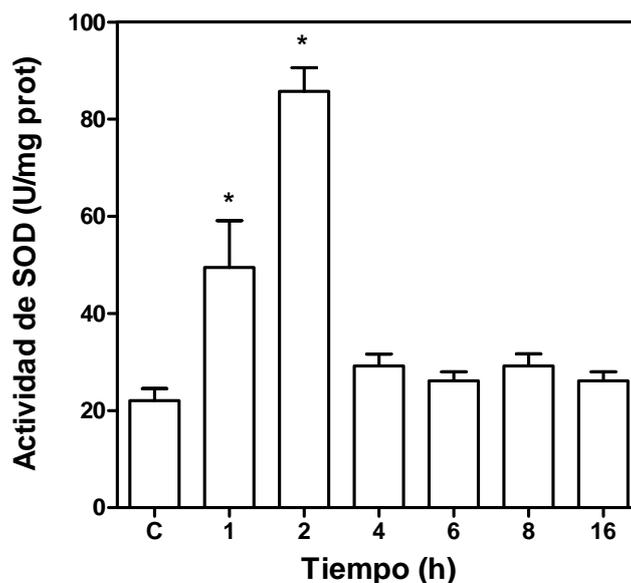


Figura 56: Estudio cinético de la actividad de SOD en muestras de cerebro de rata, luego de la sobrecarga subcrónica de Fe.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control. ANOVA, $p < 0,05$ seguido del test de Turkey.

3.3.8- Determinación de la actividad de CAT

La actividad de CAT fue determinada según el método espectrofotométrico descrito en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos de este trabajo. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido cerebral. Se observó un aumento significativo luego de 8 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán (Figura 57).

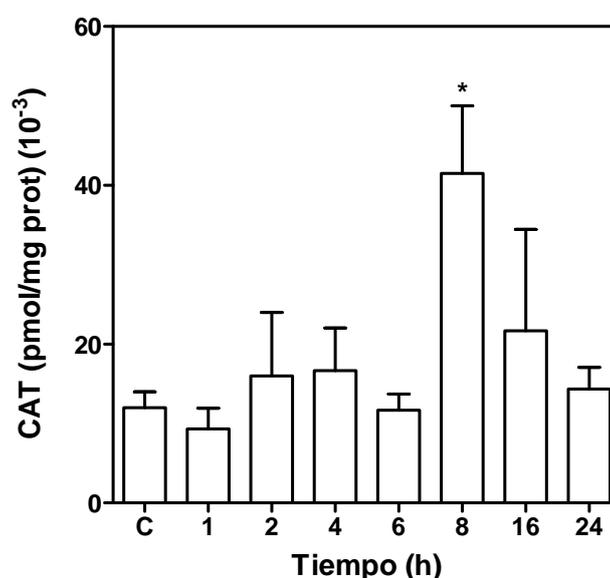


Figura 57: Actividad de CAT en muestras de cerebro de rata, en función del tiempo posterior a la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control. ANOVA, $p < 0,05$ seguido del test de Turkey.

3.3.9- Unión de NF- κ B a ADN

El porcentaje de activación de NF- κ B se evaluó en extractos de proteínas nucleares de muestras de cerebro de ratas luego de 1, 2, 4, 6 y 8 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán (Figura 58). No se observaron diferencias significativas en los tiempos estudiados.

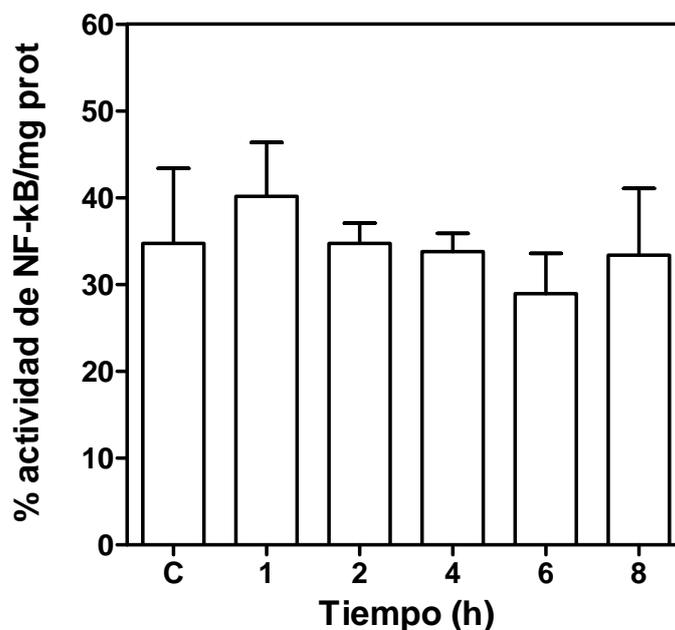


Figura 58: Porcentaje de actividad de NF- κ B en función del tiempo luego de la administración subcrónica de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control, ANOVA, $p < 0,05$ seguido de test de Turkey.

3.3.10- Determinación de la integridad de ADN nuclear y mitocondrial mediante PCR cuantitativa

La integridad del ADN nuclear y mitocondrial fue determinada por PCR en muestras de cerebro de rata a distintos tiempos pi. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de integridad de ADN nuclear con respecto a los valores control (Figura 59). En cambio, se observó una disminución significativa en el porcentaje de integridad de ADN mitocondrial luego de 2 y 8 h pi con respecto al valor control (Tabla 4).

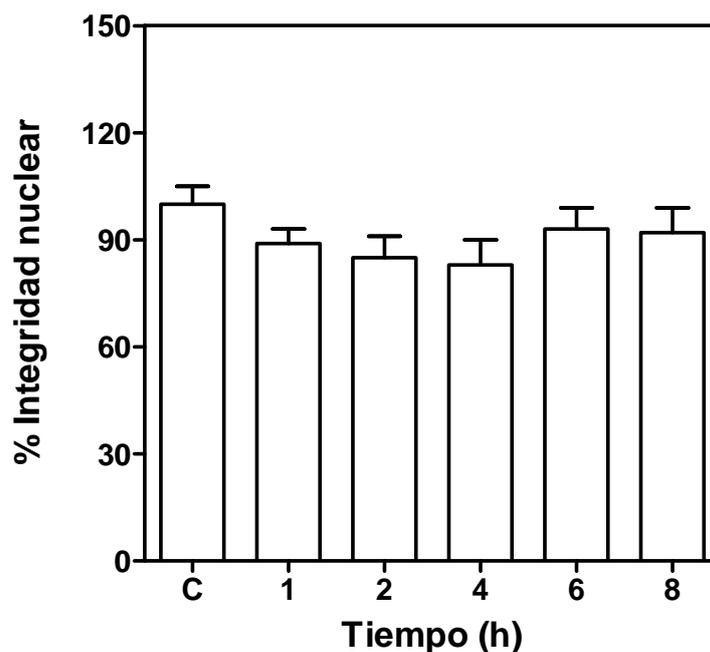


Figura 59: Porcentaje de integridad nuclear en muestras de cerebro de rata en función del tiempo luego de la administración subcrónica de Fe-dextrán.

Tabla 4

Determinación del porcentaje de integridad de ADN nuclear y mitocondrial

	Integridad del ADN nuclear (%)	Integridad del ADN mitocondrial (%)
Control	100 ± 5	100 ± 8
Fe-dextrán 2 h	85 ± 6	75 ± 5*
Fe-dextrán 8 h	92 ± 7	77 ± 6*,**

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control, $p < 0,05$.

**significativamente diferente de los valores obtenidos de integridad del ADN nuclear, luego de 8 h de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, $p < 0,05$.

3.3.11- Contenido de Fe total en áreas cerebrales

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 3.1.1 de Materiales y Métodos de este trabajo, a partir de 100 mg de PF. Las determinaciones se realizaron en muestras aisladas de la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado. Luego de 2 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, el contenido de Fe aumentó significativamente en la corteza, el cuerpo estriado y el hipocampo 2,2-; 2,6-; y 3-veces, respectivamente comparado con las mismas áreas cerebrales de animales control (Figura 60).

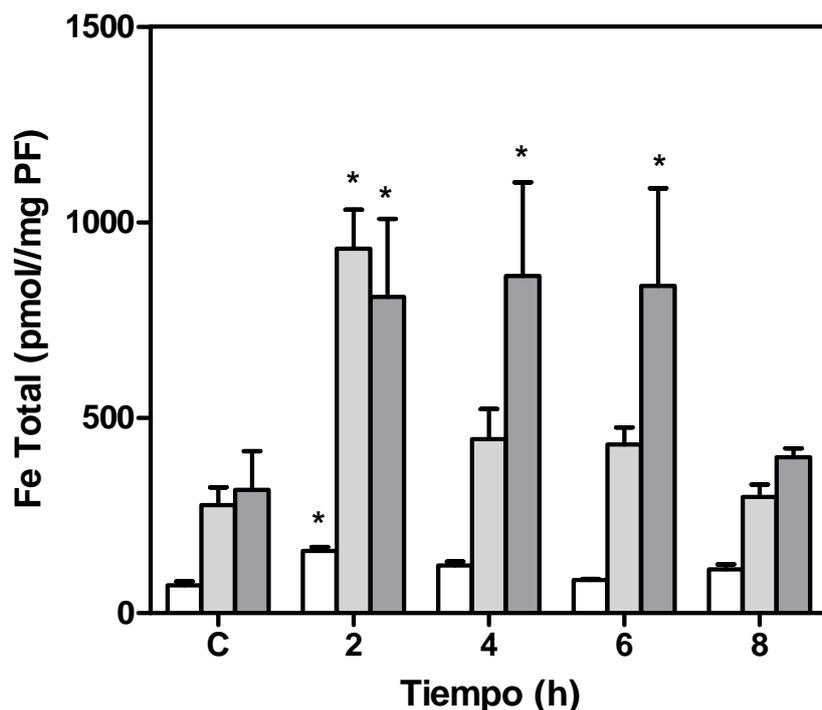


Figura 60: Contenido de Fe total en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado de ratas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán a distintos tiempos luego de la 6^{ta} dosis: corteza (□) hipocampo (▤) y cuerpo estriado (▥).

*significativamente diferente de los valores obtenidos en las áreas correspondientes de animales controles. ANOVA, $p < 0,05$.

En coincidencia con estos resultados, se observaron depósitos de Fe en el tejido cerebral luego de 2 h pi (Figura 61 A). En los cerebros control se observó citoarquitectura y vasculatura normal. En los cerebros de ratas sobrecargadas con Fe, luego de 2 h pi se observaron depósitos de Fe, mientras que luego de 8 h pi, dichos depósitos no fueron observados.

Tinción con azul de Prusia de Perls

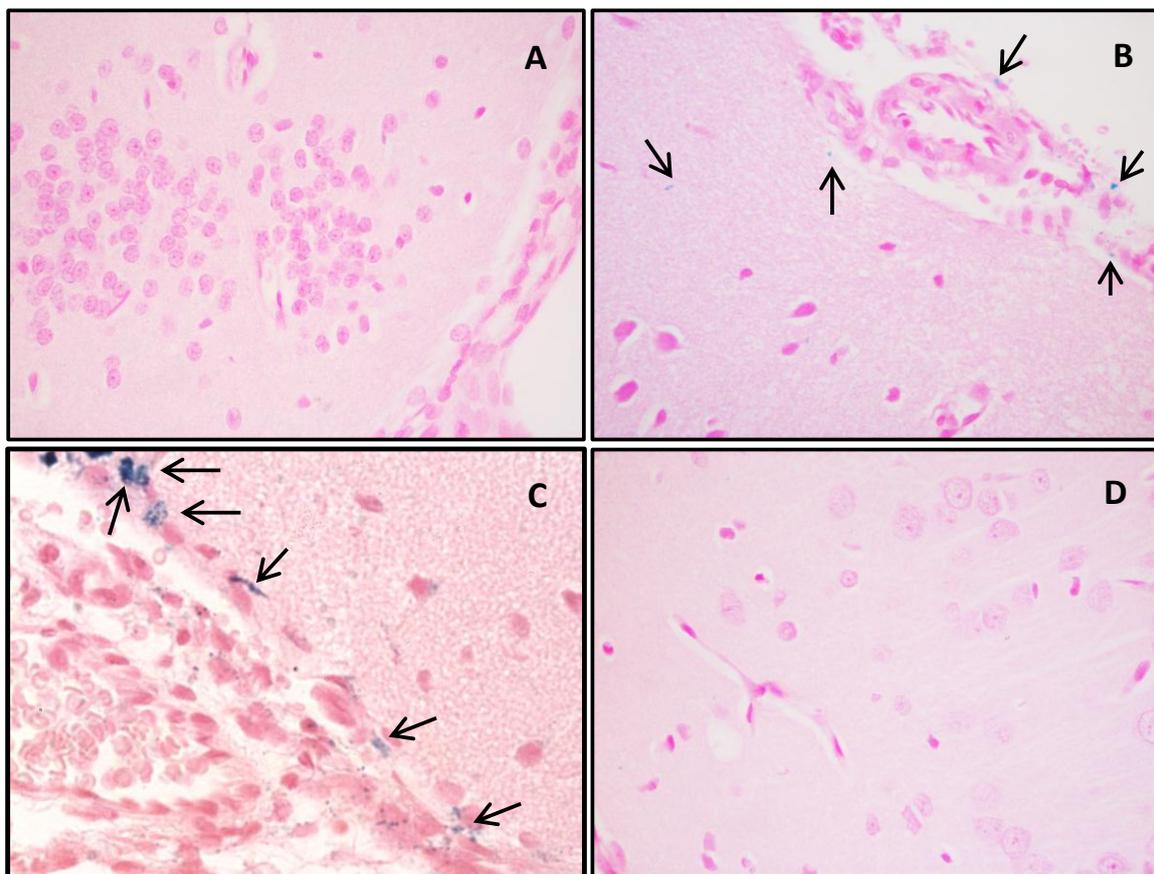


Figura 61: Corteza cerebral de ratas control y con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán. Tinción con azul de Prusia de Perls. **A.** Control, sin depósitos de Fe (400X); **B.** y **C.** Sobrecargada con Fe-dextrán, donde se observan depósitos de Fe (flechas), 2 h pi (400X); y **D.** Sobrecargada con Fe-dextrán, donde no se observan depósitos de Fe, 8 h pi (400X).

Estos resultados, obtenidos en la corteza mediante la utilización de microscopía óptica, fueron corroborados mediante MOAR, a mayor aumento, donde se observaron depósitos de Fe en la zona subcortical y vascular presentada previamente en la Figura 49.

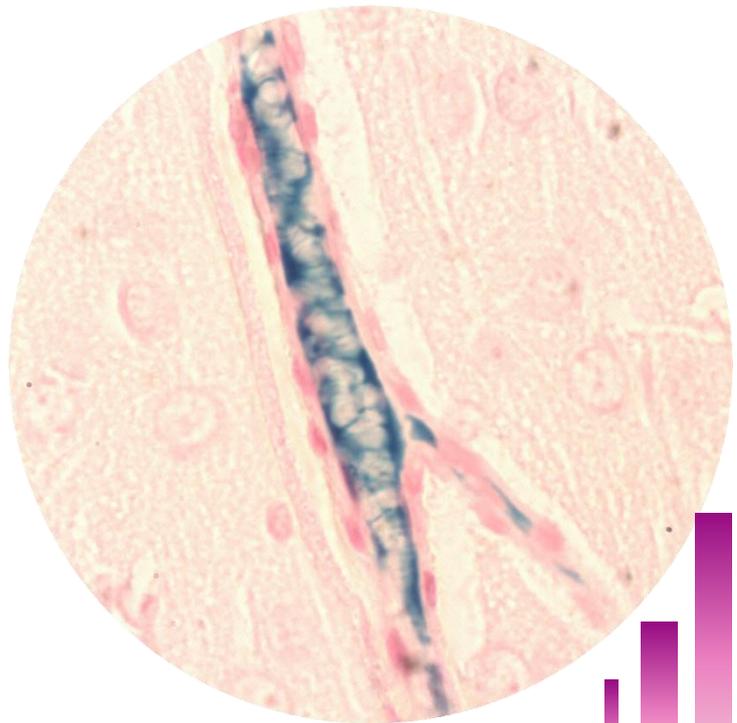
3.3.12- Determinación de la actividad de CAT en áreas cerebrales

La actividad de CAT fue determinada según el método espectrofotométrico descrito en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos de este trabajo. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido cerebral. Se observó un aumento significativo en la corteza desde las 2 hasta las 8 h luego de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán (Tabla 5).

Tabla 5
Actividad de CAT en áreas cerebrales luego del tratamiento subcrónico con Fe-dextrán

Actividad de CAT (pmol/mg prot) (10^{-3})			
	Corteza	Hipocampo	Cuerpo estriado
Control	3,6 ± 0,3	2,0 ± 0,4	4,0 ± 3,0
Fe-dextrán 2 h	7,5 ± 0,9*	1,1 ± 0,1	5,0 ± 0,6
Fe-dextrán 4 h	9,0 ± 1,0*	2,4 ± 0,9	2,2 ± 0,5
Fe-dextrán 6 h	5,4 ± 0,3*	2,4 ± 0,7	2,1 ± 0,2
Fe-dextrán 8 h	5,4 ± 0,2*	1,5 ± 0,4	2,8 ± 0,9

*significativamente diferente de los valores obtenidos en cerebros de ratas control. ANOVA, $p < 0,05$.



Hierro vascular cerebral (Tinción azul de Prusia de Perls)

3. 4- Sobrecarga de Fe como factor modificador de la respuesta a la exposición a estrés oxidativo o nitrosativo

3.4.1- Exposición a LPS de animales sometidos a sobrecarga aguda con Fe

3.4.1.1- Determinación del contenido de Fe total

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 2.2.1 de Materiales y Métodos de este trabajo. Se analizó el efecto de la administración de LPS (4 mg/kg de peso) a animales sujetos a una sobrecarga aguda de Fe (única dosis de 500 mg/kg de peso), sobre el contenido de Fe total al cabo de 6 h pi. La sobrecarga aguda de Fe llevó a un aumento significativo en el contenido total de Fe en cerebro, tanto en ausencia como en presencia de LPS, con respecto al valor en cerebro proveniente de animales control (Figura 62). El contenido de Fe en el cerebro de ratas tratadas solamente con LPS no mostró diferencia con respecto al valor observado en el cerebro proveniente de animales control en ausencia de LPS. El efecto conjunto de Fe y LPS no modificó significativamente el contenido de Fe respecto de los animales que recibieron solamente Fe.

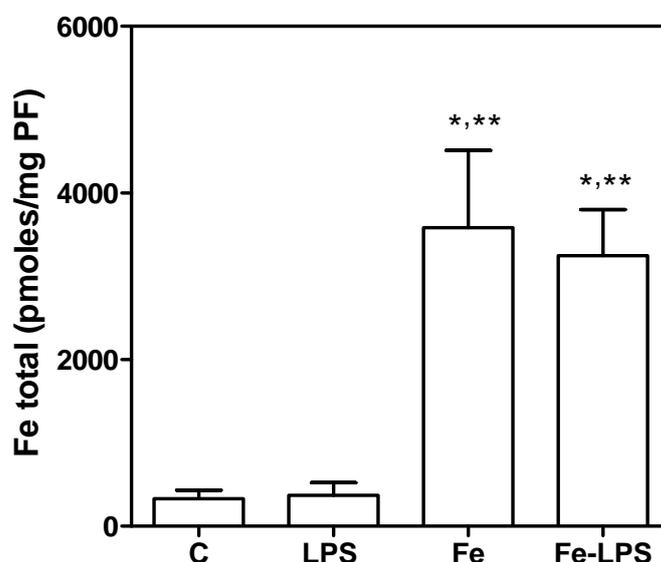


Figura 62: Contenido de Fe total en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga aguda de Fe-dextrán, LPS y la combinación de Fe-LPS al cabo de 6 h de la administración de los compuestos.

*significativamente diferente de los valores en animales control, ANOVA, $p < 0,001$.

**significativamente diferente de los valores obtenidos en ratas tratadas con LPS, ANOVA, $p < 0,001$.

3.4.1.2- Determinación del contenido de A•

Luego de 6 h de la sobrecarga aguda de Fe-dextrán, el contenido de A• aumentó significativamente en cerebros de ratas tratadas con Fe en ausencia de LPS con respecto al valor en cerebro proveniente de animales control, sin embargo en presencia de LPS, la suplementación con Fe-dextrán no modificó el contenido de A• (Figura 63). La cuantificación de los espectros obtenidos por EPR se muestran en la Figura 64.

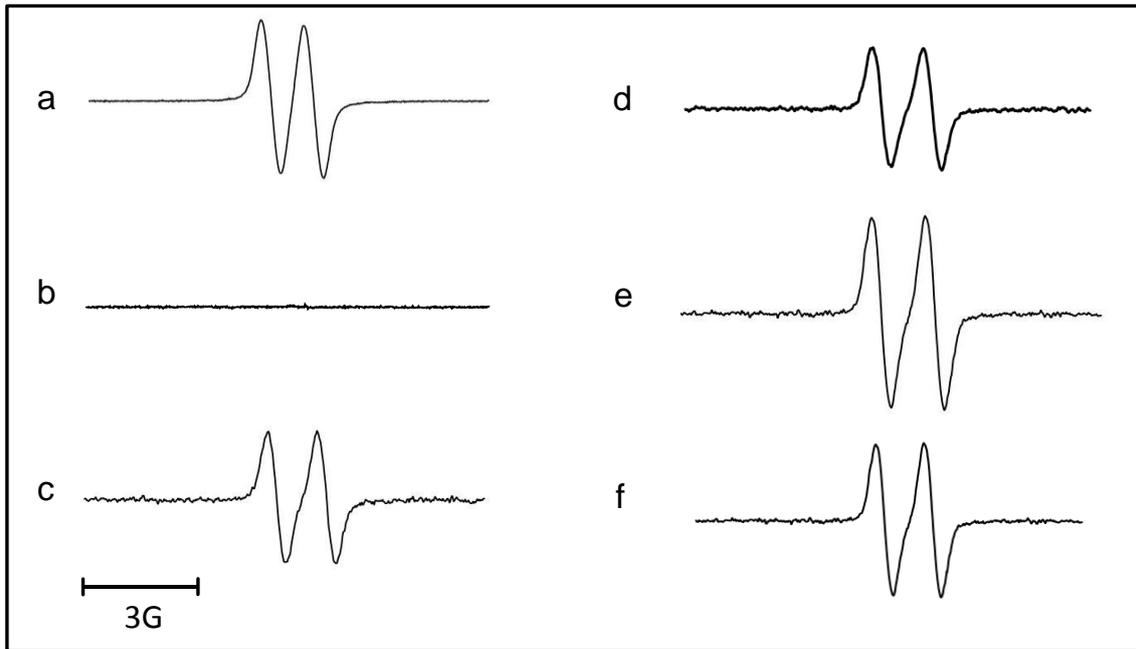


Figura 63: Señal de EPR de A^\bullet en cerebro de rata, (a) espectro simulado por computadora utilizando los siguientes parámetros: $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G; (b) DMSO solo; (c) cerebro de rata control; (d) cerebro de rata sobrecargada con LPS, 6 h pi; (e) cerebro de rata sobrecargada con Fe 6 h pi; (f) cerebro de rata sobrecargada con Fe-LPS 6 h pi.

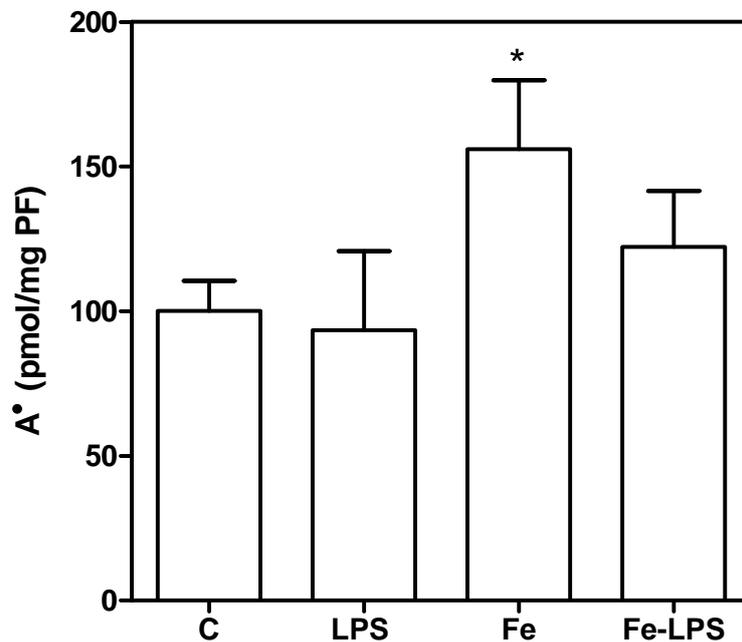


Figura 64: Contenido de A^\bullet en cerebro de rata control y sobrecargada con Fe en presencia y ausencia de LPS.

*significativamente diferente de los valores en animales control, en ausencia de LPS, ANOVA, $p < 0,05$.

3.4.2- Exposición a LPS de animales sometidos a sobrecarga subcrónica de Fe

3.4.2.1- Determinación del contenido de Fe total

El contenido de Fe total se determinó según el protocolo descrito en la sección 2.2.1 de Materiales y Métodos de este trabajo. Se analizó el efecto de la administración de LPS (4 mg/kg de peso, luego de 72 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe), luego de la generación de una sobrecarga subcrónica de Fe (6 dosis de 50 mg/kg de peso, administradas cada 48 h). Este protocolo de tratamiento fue seleccionado en base a los resultados previos mostrados en el presente trabajo, que indican que 8 h post-administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán se gatillaron actividades enzimáticas antioxidantes en el cerebro. Además, bajo el mismo tratamiento con Fe-dextrán, los parámetros de estrés oxidativo aumentados a las 24 h en el hígado, se normalizaron luego de 72 h, indicando que hubo una situación de estrés oxidativo reversible en dicho órgano (Galleano y col., 2011).

Luego de 78 h de la administración de Fe-dextrán en ausencia de LPS, no se observaron diferencias significativas en el contenido cerebral total de Fe, con respecto al valor en el cerebro de animales control. Sin embargo, 78 h post-administración de Fe-dextrán y 6 h post administración de LPS, se observó un aumento significativo del contenido de Fe total con respecto tanto al valor en cerebro de animales control como con respecto a cerebro de animales tratados con LPS (Figura 65).

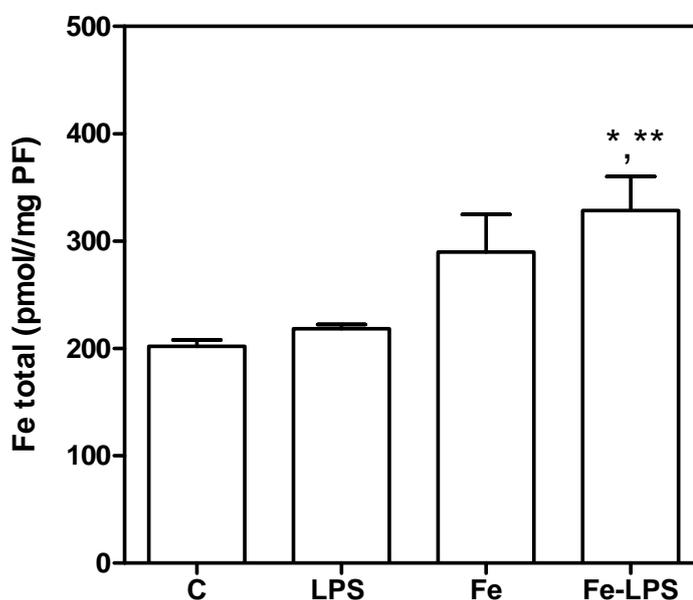


Figura 65: Contenido de Fe total en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán, LPS y la combinación de Fe-LPS. Las determinaciones fueron realizadas luego de 6 h de la administración de LPS (LPS), 78 h de la administración de Fe (Fe) y de 78 h de la administración de Fe y 6 h de la administración de LPS (Fe-LPS).

*significativamente diferente de los valores en cerebro de animales control, ANOVA, $p < 0,05$.

**significativamente diferente de los valores en presencia de LPS, ANOVA, $p < 0,05$.

3.4.2.2- Determinación del contenido de A^\bullet

La Figura 66 muestra los espectros de EPR característicos de A^\bullet en muestras de cerebro de ratas del grupo control, y en ratas sometidas a sobrecarga de Fe-dextrán, en presencia y ausencia de LPS. El contenido de A^\bullet en el cerebro de ratas no se modificó luego de 78 h de la administración subcrónica de Fe-dextrán ni en presencia ni en ausencia de LPS (Figura 67).

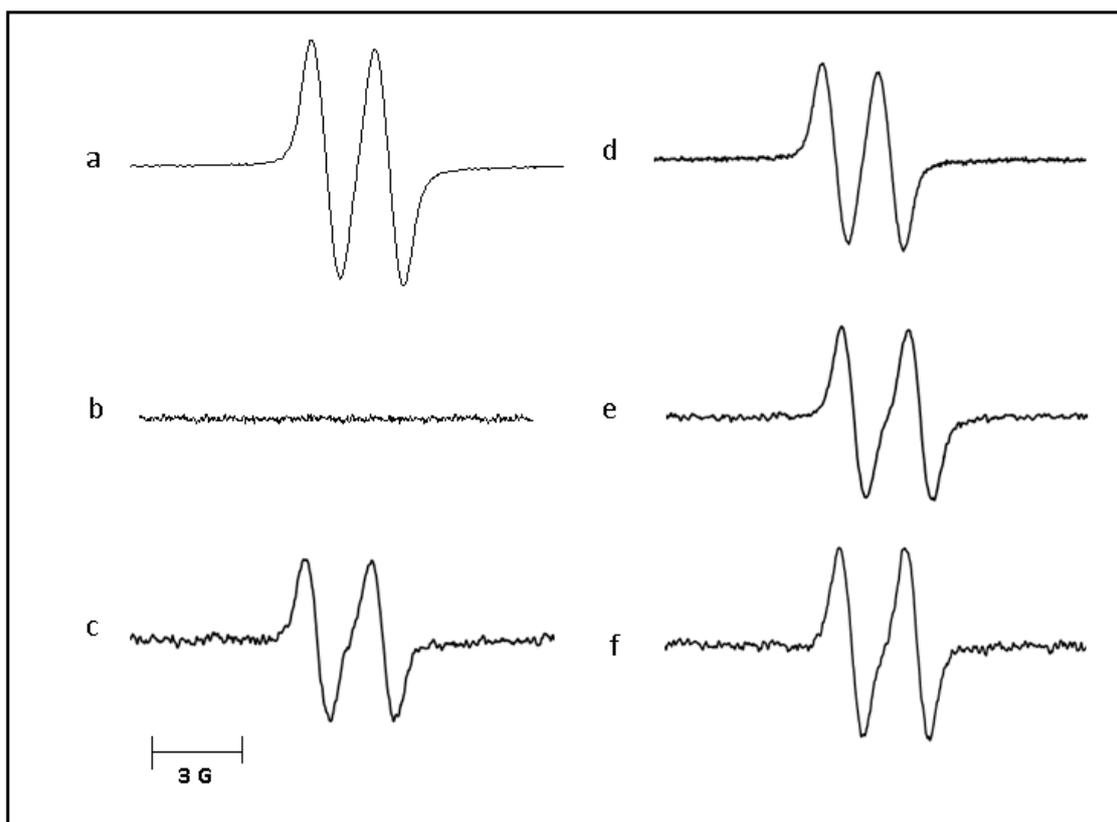


Figura 66: Señal de EPR de A^\bullet en cerebro de rata, (a) espectro simulado por computadora utilizando los siguientes parámetros: $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G; (b) DMSO solo; (c) cerebro de rata control; (d) cerebro de rata tratada con LPS, 6 h pi; (e) cerebro de rata sobrecargada con Fe 78 h pi; (f) cerebro de rata luego de 78 h de la administración de Fe y 6 h de la administración de LPS (Fe-LPS).

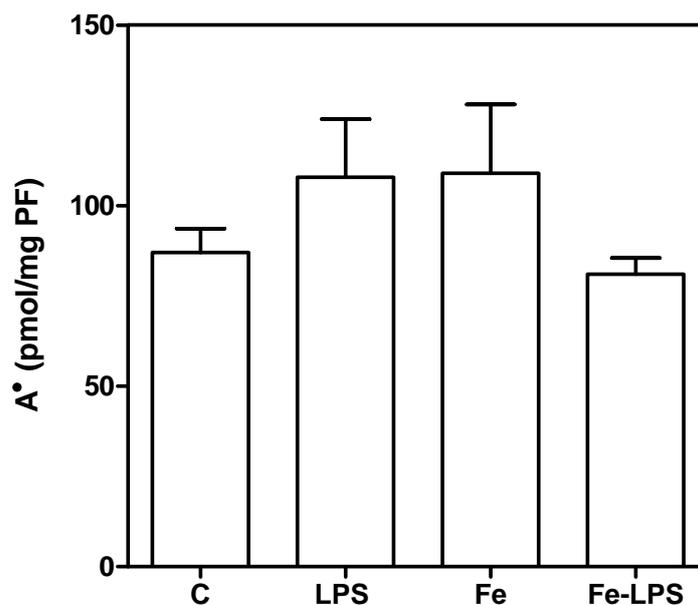


Figura 67: Contenido de A° en cerebro de ratas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán, en presencia y ausencia de LPS.

3.4.2.3- Determinación del contenido de AH⁻

El contenido de AH⁻ no se modificó al cabo de 78 h en cerebro de las ratas sobrecargadas con Fe tanto en presencia como en ausencia de LPS en relación a los valores control (Figura 68).

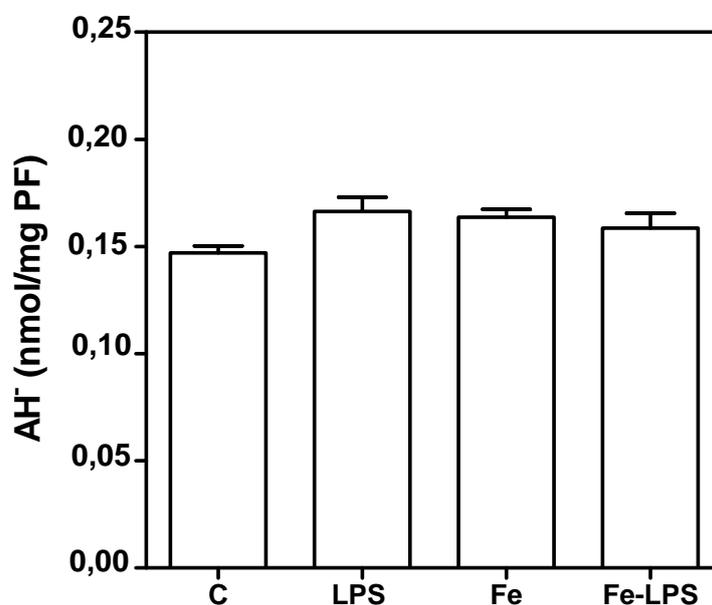


Figura 68: Contenido de AH⁻ en muestras de cerebro de ratas control y sobrecargadas con Fe, en presencia y ausencia de LPS.

3.4.2.4- Determinación del índice A^{\bullet}/AH^{\bullet}

La relación A^{\bullet}/AH^{\bullet} no se modificó significativamente en las muestras de cerebro de animales tratados con sobrecarga subcrónica de Fe ni en presencia ni ausencia de LPS con respecto a los valores control (Figura 69).

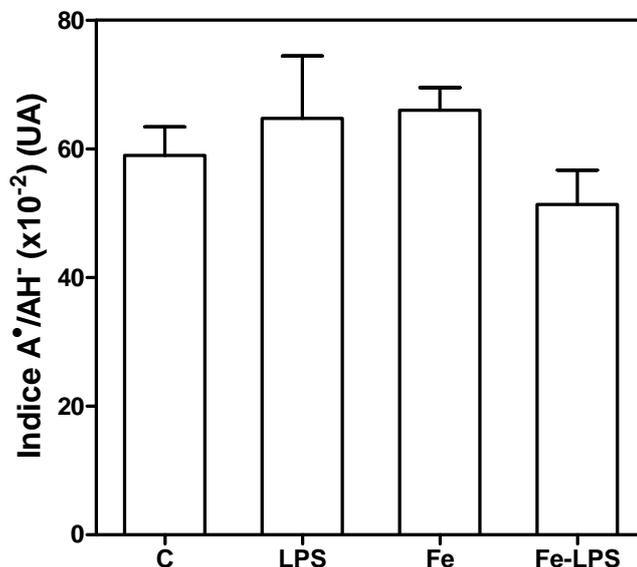


Figura 69: Índice A^{\bullet}/AH^{\bullet} en cerebro de ratas control y sobrecargadas con Fe, en presencia y ausencia de LPS.

3.4.2.5- Determinación del contenido de TBARS

El contenido de TBARS se determinó a partir de 50 mg de tejido cerebral según fue descrito en la sección 2.3.4 de Materiales y Métodos de este trabajo. No se observaron diferencias significativas entre los valores control y los tratados con Fe-dextrán tanto en presencia como ausencia de LPS (Figura 70).

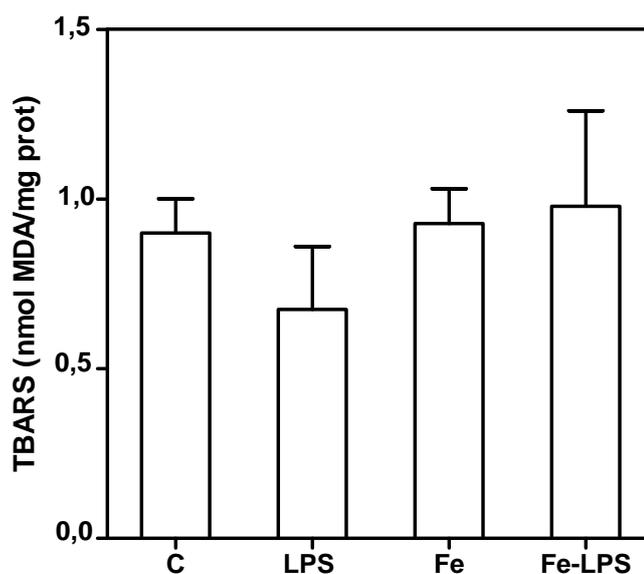


Figura 70: Contenido de TBARS en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán, en presencia y ausencia de LPS.

3.4.3- Modelo de tratamiento con CPZ en animales sometidos a una sobrecarga subcrónica con Fe

3.4.3.1-Velocidad de generación de RL[•]

Se analizó el efecto de la sobrecarga subcrónica de Fe (6 dosis de 50 mg/kg de peso, administradas cada 48 h), seguida de la administración de CPZ (10 mg/kg de peso, luego de 8 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe). Se determinó la velocidad de generación de RL[•] luego de 1, 2 y 4 h de administración de CPZ, lo que corresponde a 9, 10 y 12 h post-administración de Fe-dextrán, respectivamente. Se observó un aumento significativo de la velocidad de generación de RL[•] con respecto al grupo control al cabo de 1 y 2 h de la administración de CPZ, en las muestras de cerebro de ratas tratadas con CPZ en ausencia de Fe-dextrán (Figura 71 A). Sin embargo, en presencia del tratamiento previo con Fe-dextrán, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de generación de RL[•] entre 1 y 4 h post administración de CPZ (Figura 71 B). Los valores obtenidos para la velocidad de generación de RL[•] para el grupo control y el grupo de animales expuestos a sobrecarga de Fe sin administración de CPZ fue de 173 ± 40 y 175 ± 22 nmol/mg PF/30 min, respectivamente.

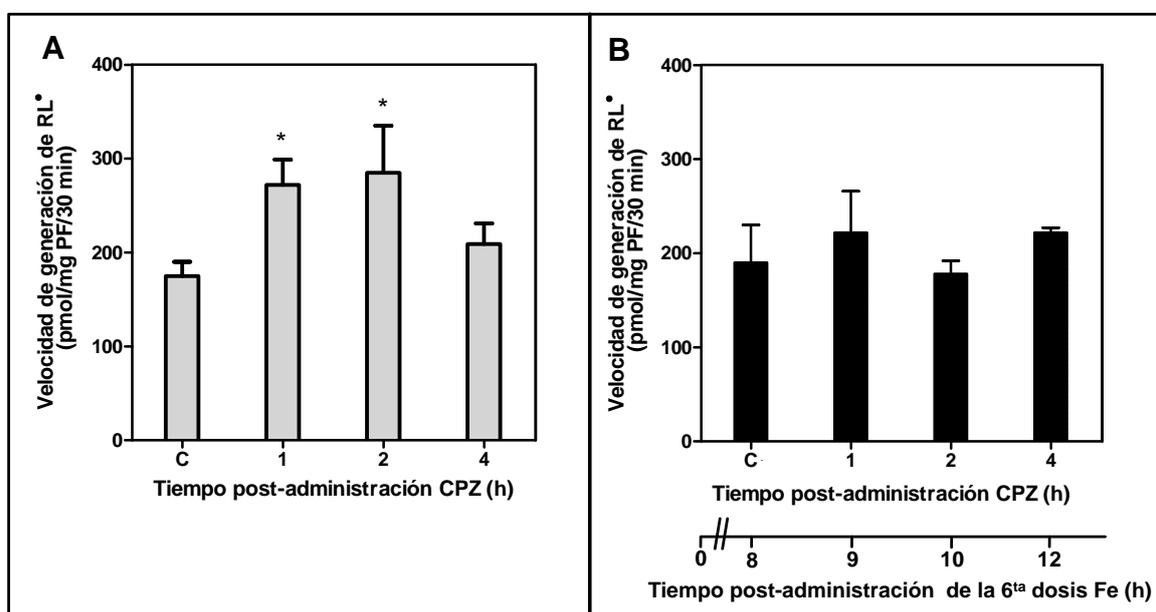


Figura 71: Velocidades de generación de RL[•] en muestras de cerebro de ratas a distintos tiempos luego de la administración de CPZ. **A.** En ausencia de sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán. **B.** En presencia de sobrecarga previa subcrónica de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores control, ANOVA, $p < 0,05$.

3.4.3.2- Determinación de la actividad de CAT

La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método espectrofotométrico descrito en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos de este trabajo. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido cerebral. En ausencia del tratamiento previo con Fe-dextrán, no se observaron diferencias significativas en la actividad de CAT entre 1 y 4 h post administración de CPZ (Figura 72 A). Los valores obtenidos para el grupo control y el grupo de animales con sobrecarga de Fe, a las 8 h luego de la 6^{ta} dosis, sin administración de CPZ fueron $(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ y $(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ pmol/mg prot, respectivamente. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la actividad de CAT al cabo de 2 y 4 h de la administración de CPZ con respecto al grupo control, en las muestras de cerebro de ratas tratadas con CPZ en presencia de sobrecarga subcrónica previa con Fe-dextrán (Figura 72 B).

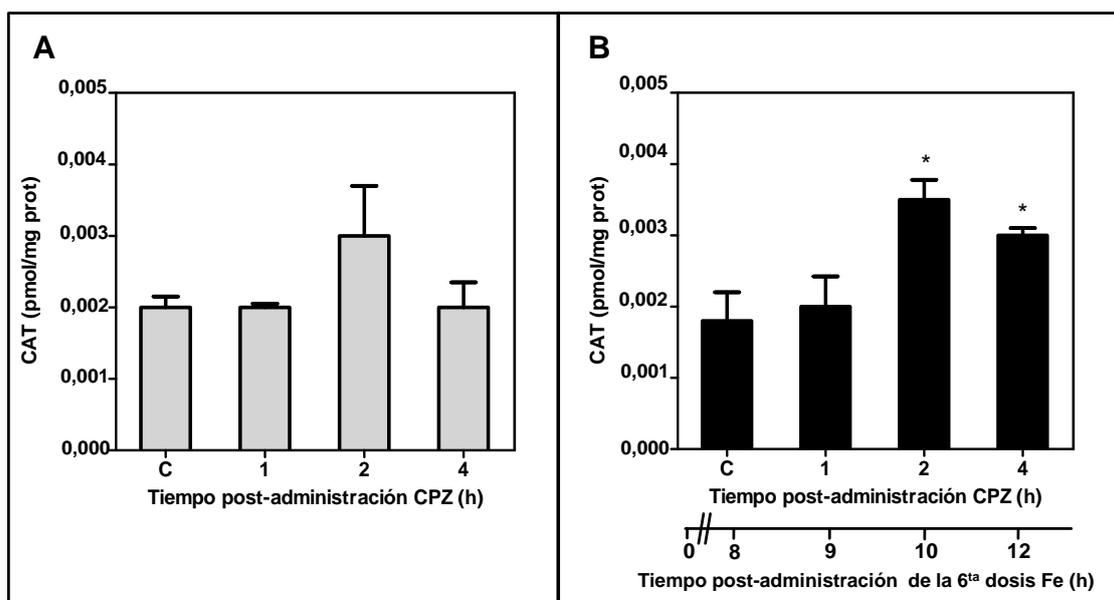
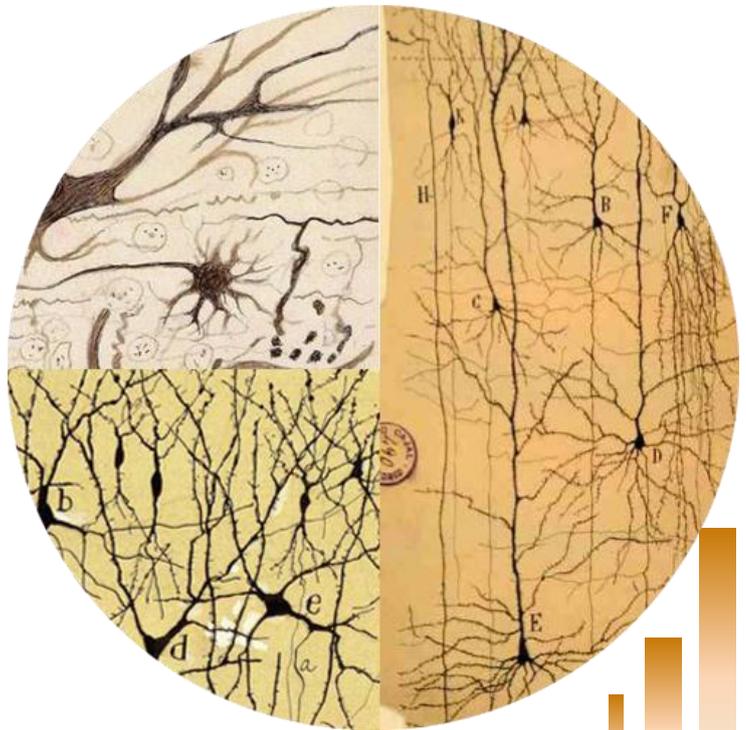


Figura 72: Estudio de la actividad de CAT en muestras de cerebro de rata, luego de la administración de CPZ. **A.** En ausencia de sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán previa. **B.** En presencia de sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán.

*significativamente diferente de los valores en animales control, ANOVA, $p < 0,05$ seguido del test de Turkey.



"Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas."
Santiago Ramón y Cajal

4. Discusión

4.1- Toxicidad del Fe

Las alteraciones en el metabolismo del Fe se han asociado a numerosas patologías. No sólo se ha vinculado a la sobrecarga de Fe con enfermedades neurodegenerativas sino también con otro tipo de patologías. Estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre los niveles altos de Fe y el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. En este sentido, se ha postulado que la formación de $\bullet\text{OH}$ catalizada por Fe también contribuye al desarrollo de la diabetes (Espinoza y col., 2014). Olkay y col. (2014) han observado que los pacientes con leucemia desarrollan altos niveles de Fe sérico, saturación de Tf y altos niveles de Ft durante la quimioterapia con o sin alteración de las pruebas de función hepática. Se han realizado estudios hematológicos que muestran la elevación de, al menos, uno entre los siguientes parámetros: Fe sérico, saturación de Tf, Ft, y los niveles de Fe unido a la Tf antes (Makeshova, 2009; Halliwell y col., 1988) durante (Bradley y col., 1997; Carmine y col., 1995; Harrison y col., 1996), cerca del final o al final de la quimioterapia (Halonen, 2003; Lutz, 2008) y después del trasplante. Además, se ha informado que la sobrecarga de Fe en la hemocromatosis hereditaria y neoplasia hematológica lleva a una mayor probabilidad de infecciones bacterianas y fúngicas, a alterar las características de los leucocitos y lleva a daño en los órganos, lo cual puede ser agravado por la quimioterapia (Olkay y col., 2014).

4.2- Metabolismo oxidativo del Fe en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga aguda de Fe-dextrán

Los datos aquí presentados indican que el contenido de Fe total en el cerebro aumenta significativamente al cabo de 6 h de la administración de Fe-dextrán para regresar a valores control luego de 8-21 h de la administración, mientras que el contenido de LIP volvió a valores control luego de 8 h desde la administración de Fe. Los niveles fisiológicos del LIP podrían estar ligados a la captación/liberación de Fe de la proteína Ft. Esta proteína tiene un doble papel en la homeostasis de Fe. Bajo condiciones en que se incrementan los depósitos de Fe, la Ft funciona como proteína de secuestro y almacenamiento del metal, protegiendo a las células de su toxicidad. En condiciones de bajo contenido de Fe, la Ft actúa como una fuente de iones Fe requeridos para la síntesis de proteínas que requieren al metal (Arosio y Levi, 2010). Así, la incorporación del Fe en exceso a la Ft, evitaría la generación de ROS a las 6 y 8 h pi, de manera que las células cerebrales sean protegidas del daño generado por el aumento de estas especies catalizadas por el Fe contenido en el LIP. De acuerdo con estas observaciones, no se observan cambios significativos a nivel morfológico ni en la

producción de RL^\bullet , aunque aumentó el contenido de TBARS luego de 6 h de la administración de Fe.

Sin embargo, otros eventos pueden estar implicados en la regulación de la protección desencadenada por los procesos de señalización dependientes de Fe, que conducen a la prevención de la injuria cerebral asociada con el exceso del metal. El incremento en el contenido de Fe en el cerebro está relacionado con la capacidad de unión de NF- κ B a ADN, que puede contribuir a limitar el daño dependiente de la acción de las ROS, desencadenando respuestas tales como un aumento en la actividad de la enzima antioxidante CAT. Es importante considerar que la oxidación de DCFH-DA se debe a la presencia de numerosos agentes oxidantes, entre ellos el H_2O_2 , pero esta especie no es la única especie oxidante generada frente a la suplementación con Fe. Además, en la última década se ha prestado gran atención al hecho que moderados niveles de ROS pueden actuar como segundos mensajeros en la transducción de señales y en los sistemas de regulación de genes, lo que ocurre en una gran variedad de tipos celulares y bajo diversas condiciones biológicas como transcripción, neuromodulación, apoptosis y tratamientos hormonales (Hensley y col., 2000; Lander, 1997). El primer factor de transcripción que se ha demostrado que es regulado en forma redox es el NF- κ B (Schreck y col., 1991; Legrand-Poels y col., 1990). De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados indican que un aumento significativo en el porcentaje de actividad de unión de NF- κ B a ADN luego de 8 h de sobrecarga aguda con Fe puede tener un efecto relevante, ya que en este modelo precedió a un aumento significativo en la actividad de CAT luego de 21 h de la administración de Fe.

En la Figura 73 se resume una posible secuencia de eventos disparados por la sobrecarga aguda con Fe. La administración aguda de Fe-dextrán ip a ratas, condujo a estrés oxidativo en el cerebro. Esta situación se vio reflejada en un aumento de los índices de estrés oxidativo A^\bullet/AH^- y TBARS/ α -T. En los humanos, el aumento del A^\bullet ha sido asociado con diversas condiciones de estrés oxidativo (Gey y col., 1987; Minakata y col., 1993; Pietri y col., 1994; Nakagawa y col., 1997; Courderot-Masuyer y col., 2000). Nuestros resultados muestran un aumento significativo en el índice A^\bullet/AH^- 6 h luego de la administración aguda de Fe, indicando que existe una condición de estrés oxidativo temporaria asociada al aumento del contenido de Fe total en el medio hidrofílico del cerebro. Este aumento en el contenido de Fe total se verifica en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado. Los estudios citológicos coinciden con estos hallazgos, dado que se observó la presencia de Fe en exceso, tanto de Fe vascular como endotelial, en las 3 áreas estudiadas, con mayor prevalencia en el cuerpo estriado. Esta situación de estrés oxidativo es congruente con nuestros

resultados señalando que no se produce daño significativo en cerebro, ya que a pesar de los cambios mencionados, en las 3 áreas estudiadas se observó la presencia de Fe acompañada de citoarquitectura normal del tejido.

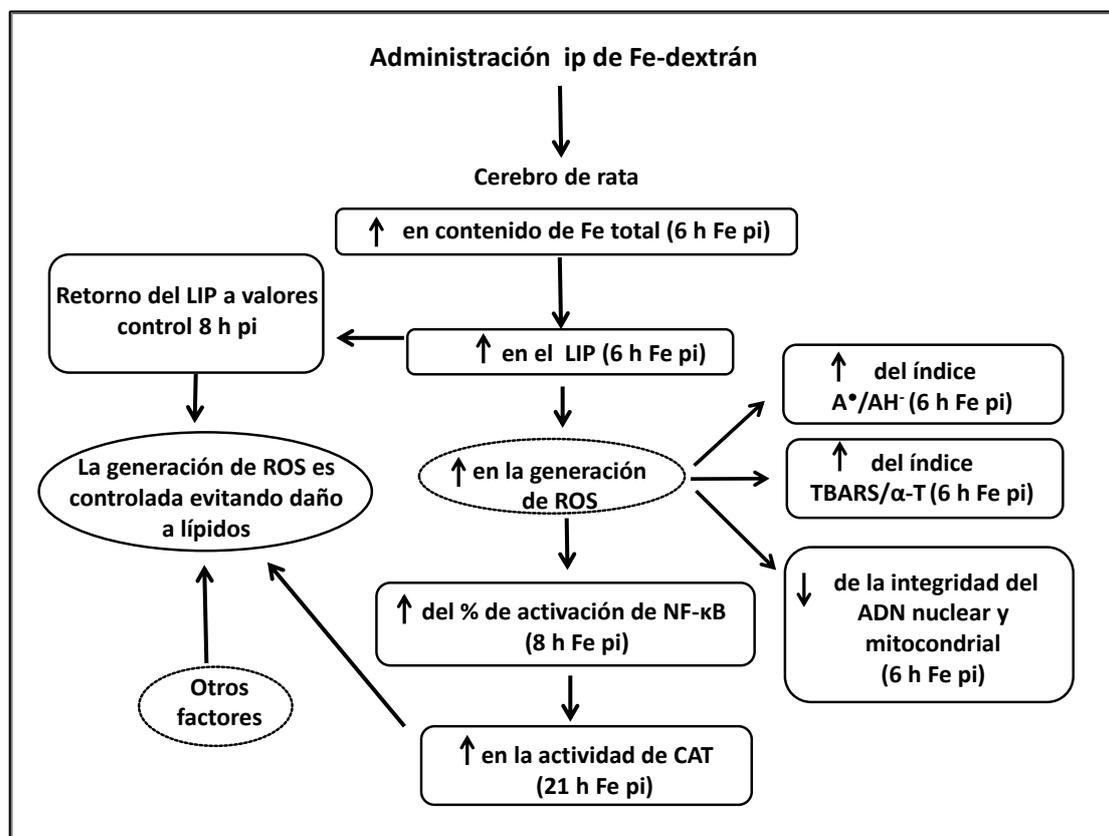


Figura 73: Diagrama mostrando la posible secuencia de eventos que ocurren en el cerebro de rata luego de la administración aguda de Fe-dextrán. Los recuadrados de líneas continuas representan los parámetros medidos.

Como el contenido de Fe incrementado lleva a un estrés oxidativo inicial, se ha postulado que la desregulación del Fe seguida de una respuesta antioxidante inadecuada podría ser la causa iniciadora de muerte neuronal en ciertas enfermedades neurodegenerativas (Ke y Qian, 2007). No sólo se incrementó el índice A^{\bullet}/AH^{\bullet} sino también se observó un leve aumento en el índice TBARS/ α -T, y además la integridad del ADN nuclear y mitocondrial se encontró disminuida en un 41 y 65%, respectivamente, en muestras de cerebro de ratas tratadas con sobrecarga aguda de Fe, luego de 6 h pi.

Lockman y col. (2012) demostraron susceptibilidad variable a la sobrecarga de Fe en endotelio, células neuronales y astrocitos en ratas, mediante el estudio de la respuesta al voltaje de los canales de calcio. Por otro lado, Jiang y col. (2007) mostraron que la sobrecarga crónica de Fe puede ser más destructiva que la sobrecarga aguda de Fe para las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en ratas. Además, el cerebro posee múltiples regiones con requerimientos metabólicos

especializados y una variedad de tipos celulares con diferentes necesidades de Fe. El cuerpo estriado y el hipocampo son estructuras importantes en el cerebro que están asociadas con el desarrollo de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Wu y col., 2013). Los resultados presentados claramente indican que aunque el contenido de Fe se incrementó en las 3 áreas estudiadas, el contenido en el cuerpo estriado aumentó mayoritariamente en comparación con la corteza y el hipocampo, ya que el contenido de Fe basal de las 3 áreas fue cuantitativamente similar. Esta observación podría llevar a la predicción de que si aparece daño dependiente de Fe, estaría más localizado en el cuerpo estriado. Sin embargo, el contenido basal de α -T es mayor en el cuerpo estriado, y el contenido de AH^{\cdot} se incrementa 6 y 8 h luego de la sobrecarga de Fe, evitando el aumento de los índices de estrés oxidativo A^{\cdot}/AH^{\cdot} y RL^{\cdot}/α -T en dicha área, mientras que en la corteza, a pesar de los mecanismos antioxidantes puestos en marcha, se produjo un aumento de ambos índices de estrés oxidativo luego de 6 h de administración de Fe.

La comparación entre el incremento neto de la velocidad de generación de RL^{\cdot} en áreas cerebrales mostró que la peroxidación lipídica se vio significativamente incrementada en la corteza, pero se mantuvo sin cambios luego de 6 h de sobrecarga de Fe en muestras de hipocampo y de cuerpo estriado. La respuesta antioxidante en corteza incluyó el consumo de tioles totales (entre ellos GSH) y un aumento significativo en la actividad de CAT luego de 6 h, sugiriendo una necesidad de controlar adecuadamente los niveles de H_2O_2 . En cambio, en el cuerpo estriado y en el hipocampo, estos parámetros no se modificaron en los períodos estudiados, aunque se observó un aumento en la actividad de CAT luego de 8 h. En función de estos resultados y desde el punto de vista clínico, estas observaciones podrían ser claves para el entendimiento del mecanismo que conduce a daño específico. La corteza cerebral es más susceptible que el hipocampo y que el cuerpo estriado a las condiciones de estrés oxidativo desencadenadas por el exceso de Fe a nivel lipofílico. Ya sea por la capacidad antioxidante, las características de la composición lipofílica o la combinación de ambos, estos aspectos podrían ser los responsables del efecto observado en la corteza en relación con las otras áreas estudiadas.

4.2.1- Fe como agente de daño oxidativo en otros órganos

El efecto del Fe en distintos órganos puede variar considerablemente. En la Tabla 6 se muestra el efecto de la sobrecarga aguda de Fe sobre el contenido del metal en distintos órganos y sobre parámetros de daño oxidativo a lípidos.

Tabla 6
Efecto de la sobrecarga aguda de Fe-dextrán sobre distintos órganos

	Control	Sobrecarga de Fe	Efecto (%)
Sobrecarga aguda de Fe			
Hígado (<i>Galleano y Puntarulo, 1992</i>)			
Contenido de Fe (mg/g PS)	257 ± 11	1837 ± 205*	+615
TBARS (pmol/min/mg prot)	40 ± 1	110 ± 30*	+175
Riñón (<i>Galleano y Puntarulo, 1994</i>)			
Contenido de Fe (mg/g PS)	14 ± 3	113 ± 15*	+707
TBARS (pmol/min/mg prot)	29 ± 2	37 ± 3*	+27
Plasma (<i>Galleano y Puntarulo, 1995</i>)			
Contenido de Fe (mg/dl)	126 ± 20	1538 ± 158*	+1220
TBARS (nmol/ml)	0,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1*	+285
Cerebro total			
Contenido de Fe (mg/g PS)	0,20 ± 0,03	1,7 ± 0,4*	+757
TBARS (nmol MDA/mg PF)	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	+0
Velocidad de generación de RL [•] (pmol/mg PF/30 min)	113 ± 13	112 ± 16	+0

*significativamente diferente de los valores control, p < 0,05

Mientras la sobrecarga aguda de Fe-dextrán es capaz de producir un aumento en el contenido de Fe total en el hígado, el riñón y el plasma de rata, el daño lipídico en cada órgano, representado como contenido de TBARS, no es proporcional a la cantidad de Fe acumulada. En condiciones basales, el hígado presenta el mayor contenido de Fe en comparación con el plasma, el riñón y el cerebro, y sigue el mismo orden frente a la suplementación con la misma dosis de Fe, sugiriendo que la incorporación de Fe a cada órgano está específicamente controlada. El riñón, a pesar de haber sufrido un aumento de 7 veces (+707 %) en el contenido de Fe, muestra un leve aumento (27%) en la velocidad de producción de TBARS, sugiriendo que los controles antioxidantes limitan adecuadamente el daño.

El estudio realizado en el cerebro total, si bien es orientativo con respecto a la respuesta del órgano frente a la administración del metal, no refleja exactamente lo que ocurre en cada una de las áreas estudiadas. Por ejemplo, la velocidad de generación de RL[•] mostró un aumento significativo en la corteza no detectado en cerebro total. Así, la evaluación de los efectos dependientes de Fe deben ser considerados con mucha precaución para evitar la desestimación de los complejos

mecanismos gatillados en un órgano heterogéneo como el cerebro frente a la sobrecarga aguda de Fe.

4.2.2- Modelo del estado estacionario para el A^\bullet en sobrecarga aguda de Fe

Los niveles de A^\bullet presentes en los tejidos cerebrales, representan la concentración de A^\bullet en estado estacionario ($[A^\bullet]_{ee}$). Este valor está determinado por la relación entre las velocidades de generación y desaparición de este radical y reflejan el balance entre la producción de A^\bullet , que incluye la combinación de las velocidades de reducción de la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDAR) localizada en las mitocondrias, la membrana plasmática y el aparato de Golgi (Pietronigro y col., 1985; Nishino y Ito, 1986), la dismutación espontánea del A^\bullet a AH^- y DHA, y la velocidad de oxidación univalente del AH^- (Figura 74). Esta oxidación, en células del sistema nervioso, puede ser catalizada por ascorbato oxidasa (AO), cuya presencia ha sido detectada en la membrana plasmática de los terminales sinápticos de cerebro de rata (Martín-Romero y col., 2002), por Fe^{2+} , Fe^{3+} , O_2 , $O_2^{\bullet-}$, Cu^{2+} , $\bullet OH$, ROO^\bullet , $\alpha-T^\bullet$ y otros radicales.

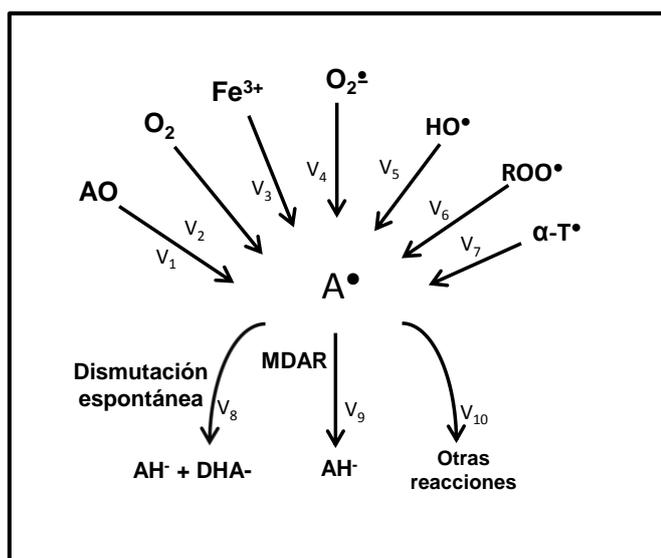


Figura 74: Diagrama mostrando la producción de A^\bullet y regeneración de AH^- en tejido cerebral. AO, ascorbato oxidasa; MDAR, monodehidroascorbato reductasa; DHA, dehidroascorbato.

Cuando se produce un incremento en la $[A^\bullet]_{ee}$, sin cambios en las velocidades de regeneración a AH^- , esta situación representa una condición de estrés oxidativo. Además, cuando se produce una disminución en la velocidad de regeneración de AH^- , la producción de A^\bullet es constante y puede ocasionar un aumento en la $[A^\bullet]_{ee}$. En otras situaciones en las cuales el contenido de AH^- se ve afectado, es necesario considerar la determinación de la relación A^\bullet/AH^- , debido a que un incremento en la producción

de A^\bullet podría estar acompañado de un incremento en la regeneración de AH^\cdot , evitando la condición de estrés. La regeneración de AH^\cdot también puede ocurrir lentamente a través de la reducción de DHA (producido por la dismutación del A^\bullet) catalizada por la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) utilizando GSH como dador de e^- (Heber y col., 1996).

Bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo, la determinación de A^\bullet se realizó en homogeneizados de tejido cerebral en presencia de DMSO. La concentración de A^\bullet determinada por EPR en los tejidos cerebrales controles fue de 127 ± 15 pmol/mg PF, es decir $3,2 \times 10^{-6}$ M. La concentración de A^\bullet determinada luego de 6 h de administración de Fe-dextrán fue de 213 ± 12 pmol/mg PF o $5,3 \times 10^{-6}$ M, siendo significativamente diferentes entre sí.

$$[A^\bullet]_c = \frac{127 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg}} \times \frac{25 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml homog}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[A^\bullet]_c = 3,2 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[A^\bullet]_{Fe} = \frac{213 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg}} \times \frac{25 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml homog}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[A^\bullet]_{Fe} = 5,3 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Datos previos de Matsuo y col. (1995) muestran que la concentración de A^\bullet en la corteza cerebral de ratas adultas es de $0,8 \pm 0,1$ μM . Además, en estudios realizados en plasma de ratas y en plasma humano, la concentración de A^\bullet determinada fue de 17 ± 4 nM y 41 ± 8 nM, respectivamente (Galleano y col., 2002; Gruber y col., 2005), valores inferiores a las concentraciones observadas en cerebro.

Para analizar el metabolismo del A^\bullet en los tejidos cerebrales, es necesario analizar las reacciones involucradas en la generación de este radical. Un análisis cinético permite escribir la expresión de velocidad para la generación de A^\bullet (ecuaciones 13 y 14), según el diagrama presentado en la Figura 74.

$$V_{\text{aparición de } A^\bullet} = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 + V_6 + V_7 + V_8 \quad [13]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[A^\bullet]}{dt} = & \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{AO} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{O_2} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{Fe^{3+}} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{O_2^\bullet} + \\ & + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{\bullet OH} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{ROO^\bullet} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{\alpha-T^\bullet + \text{otros radicales}} \end{aligned} \quad [14]$$

Según Martín-Romero y col. (2002) la actividad de la AO en la membrana plasmática de los terminales sinápticos de cerebro de rata es de 40 nmol de A[•] min⁻¹ mg⁻¹ prot. Considerando que los tejidos cerebrales contienen 72 mg de prot g⁻¹ PF de células y un 82% de agua por mg PF en el cerebro de rata (1 g PF = 0,82 ml de H₂O), la velocidad de consumo de A[•] por esta vía fue 58,5 × 10⁻⁶ M s⁻¹.

$$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{AO} = \frac{40 \times 10^{-9} \text{ mol}}{\text{min mg prot}} \times \frac{72 \text{ mg prot}}{1 \text{ g PF}} \times \frac{1 \text{ g PF}}{0,82 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}$$

$$\boxed{\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{AO} = 58,5 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}}$$

El AH⁻ puede autooxidarse y generar A[•] de manera no enzimática (Heber y col., 1996). Sin embargo, esta reacción no será considerada debido a que a pH fisiológicos ocurre muy lentamente con una k = 6 × 10⁻⁷ s⁻¹ (Buettner y Jurkiewicz, 1993). En soluciones acuosas, el AH⁻ reacciona rápidamente con el ¹O₂ (Bodannes y Chan, 1979; Kramarenko y col., 2006; Buettner y Jurkiewicz, 1993), con el O₂[•] y el [•]OH (Halliwell y Gutteridge, 1989; Buettner y Jurkiewicz, 1993) u otros radicales oxidantes como el radical α-T[•], radicales centrados en carbono y radicales amonilos, ROO[•], fenoxilos y tiilos (Bielski, 1982) a través de reacciones de segundo orden, según la ecuación 15, donde k es la constante aparente de segundo orden de la reacción.

$$v = k [AH^-] [\text{radical}] \quad [15]$$

La concentración de AH⁻ determinada en este trabajo para tejidos cerebrales control fue 0,293 ± 0,020 nmol/mg PF y teniendo en cuenta las aproximaciones de contenido proteico y de agua ya indicados en el tejido cerebral, la concentración de AH⁻ resultante es de 2,93 × 10⁻⁶ M.

$$[AH^-] = \frac{0,293 \times 10^{-9} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{10 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[AH^{\cdot-}] = 2,93 \times 10^{-6} \text{ M}$$

En la Tabla 7 se indican las concentraciones en estado estacionario para las especies activas más relevantes en células animales, las constantes aparentes de velocidad y las velocidades calculadas en base a la ecuación 15 para las reacciones de estas especies con $AH^{\cdot-}$, considerando la concentración de $AH^{\cdot-}$ en homogeneizado de cerebro de rata control.

Tabla 7

Concentraciones, constantes de velocidad de reacción de especies activas con $AH^{\cdot-}$ y velocidad de generación de A^{\cdot} .

Especie	Concentración en estado estacionario (M)	Reacción redox	k ($M^{-1} s^{-1}$)	$\left(\frac{d[A^{\cdot}]}{dt}\right)$ ($M s^{-1}$)
1O_2	Hepatocitos: 1×10^{-15} (1)	$AH^{\cdot-} + ^1O_2 \rightarrow A^{\cdot} + O_2^{\cdot-}$	1×10^7 (3)	$2,93 \times 10^{-14}$
$O_2^{\cdot-}$	Mitocondria-hígado de rata: $0,2 \times 10^{-9}$ (2)	$AH^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow A^{\cdot} + H_2O_2$	$2,7 \times 10^5$ (4)	$1,58 \times 10^{-10}$
$\cdot OH$	Mitocondria-hígado de rata: 6×10^{-18} (2)	$AH^{\cdot-} + \cdot OH \rightarrow A^{\cdot} + H_2O$	$7,2 \times 10^9$ (5)	$1,27 \times 10^{-13}$
ROO^{\cdot}	Mitocondria-hígado de rata: 2×10^{-9} (2)	$AH^{\cdot-} + ROO^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + ROOH$	$1-2 \times 10^6$ (6)	$1,17 \times 10^{-8}$
R^{\cdot}	Mitocondria-hígado de rata: 6×10^{-16} (2)	$AH^{\cdot-} + R^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + ROH$	$1,55 \times 10^6$ (7)	$2,72 \times 10^{-15}$

(1) Boveris y Cadenas (2000); (2) Boveris (1998); (3) Rooney (1983); (4) Nishikimi (1975); (5) Simic (1991); (6) Sharma y Buettner (1993); (7) Packer y col. (1979).

Teniendo en cuenta la concentración de $AH^{\cdot-}$ determinada en este sistema, las constantes de velocidad y las concentraciones indicadas para las especies activas (Tabla 7), sólo la generación de A^{\cdot} dependiente de ROO^{\cdot} tiene una velocidad relativamente comparable ($0,01 \times 10^{-6} M s^{-1}$) a la velocidad de generación de A^{\cdot} por la AO en cerebros de animales control. Para las otras especies activas, la baja concentración de estas especies determina que la velocidad de generación de A^{\cdot} dependiente de ellas sea más de dos órdenes de magnitud inferior a la generada enzimáticamente, razón por la cual no serán tenidas en cuenta para el análisis.

En condiciones fisiológicas, el Fe suele encontrarse asociado a una proteína ya que su presencia en forma aislada puede producir daños graves en los tejidos, aunque

existe una fracción celular de Fe catalíticamente activo que necesita ser estrictamente controlada tanto a nivel de la incorporación como del almacenamiento de Fe.

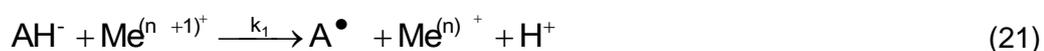
La técnica fluorométrica que se utiliza para la determinación de LIP mediante la sonda CA incluye la detección de ambas formas redox de Fe (Fe^{2+} y Fe^{3+}). La concentración de $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ (LIP) determinada en este sistema por fluorescencia de CA en cerebro de ratas control fue $3,6 \pm 0,9$ pmol/mg PF. Realizando las consideraciones adecuadas ya mencionadas para el cálculo de la concentración de AH^- , se obtiene una concentración de LIP de $1,8 \times 10^{-6}$ M en homogeneizado de cerebro control.

$$[\text{LIP}] = \frac{3,6 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{500 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[\text{LIP}] = 1,8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Dado que en la determinación de LIP por la técnica de CA se emplea TGA con el fin de reducir el Fe presente en el tejido, la concentración de LIP estimada en cerebro de rata en este trabajo representa la suma de la concentración de Fe^{2+} y de Fe^{3+} . Robello y col. (2012) determinaron el contenido de Fe en precursores neuronales de rata. Considerando que en cerebro no hubo diferencias significativas entre el contenido de Fe^{3+} ($0,42 \pm 0,03$ pmol (10^6 células) $^{-1}$) determinado por fluorescencia de CA y el de $\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+}$ ($0,6 \pm 0,1$ pmol (10^6 células) $^{-1}$) determinada por EPR, la concentración de LIP en precursores neuronales es $1,4 \times 10^{-6}$ M. De este modo, podemos suponer que en el tejido cerebral, el LIP se encuentra mayoritariamente como Fe^{3+} .

La reacción 21 y la ecuación 16 (Frei y Lawson, 2008; Martell, 1982) describen la generación de A^\bullet catalizada por metales, donde $\text{Me}^{(n+1)+}$ puede ser Fe^{3+} o Cu^{2+}



$$\left(\frac{d[\text{A}^\bullet]}{dt} \right)_{\text{Me}^{(n+1)+}} = k_1 [\text{AH}^-] [\text{Me}^{(n+1)+}] \quad [16]$$

En la ecuación 16 el valor estimado de constante de velocidad (k_1) para Fe^{3+} es $30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Roginsky y Stegmann, 1994; Buettner, 1988). Por lo tanto, la generación de A^\bullet en cerebro de ratas control debida a Fe^{3+} es de $1,58 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$

$$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{Fe}^{3+}} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 2,93 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1,8 \times 10^{-6} \text{ M} = \boxed{1,58 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}}$$

En base a las consideraciones realizadas, en la Tabla 8 se resumen las velocidades utilizadas en el análisis descripto a continuación. La velocidad de generación de A^\bullet dependiente de Fe, es dos órdenes de magnitud menor que la velocidad dependiente de AO. Sin embargo, y dado que el tratamiento en estudio se basa en la modificación celular del contenido de Fe, este dato es considerado para los cálculos posteriores a pesar de su bajo peso relativo.

Tabla 8

Resumen de los valores de velocidad de consumo y generación A^\bullet empleados en cerebro control

Ecuación de velocidad	Valor
$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{AO}}$	$58,5 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$
$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{ROO}^\bullet}$	$0,01 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$
$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{Fe}^{3+}}$	$0,01 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$

Finalmente, la generación de A^\bullet en cerebro control para este sistema resulta de la ecuación 17.

$$\frac{d[A^\bullet]}{dt} = \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{AO}} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{ROO}^\bullet} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{Fe}^{3+}} \quad [17]$$

$$\frac{d[A^\bullet]}{dt} = 58,5 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1} + 0,01 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1} + 0,01 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1} = \boxed{58,51 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}}$$

Además de las reacciones que generan A^\bullet , deben ser consideradas para el análisis, aquellas reacciones involucradas en la desaparición del radical. De acuerdo con las vías indicadas en la Figura 74, las expresiones de velocidad que engloban las reacciones de consumo de A^\bullet están representadas por las ecuaciones 18 y 19.

$$V_{\text{desaparición de } A^\bullet} = V_8 + V_9 + V_{10} \quad [18]$$

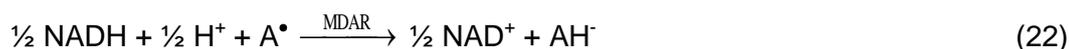
$$V_{\text{desaparición de } A^\bullet} = -\frac{d[A^\bullet]}{dt} = \left(-\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{dismutación}} + \left(-\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{MDAR}} + \left(-\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{otras reacciones}} \quad [19]$$

El consumo de A^\bullet puede ocurrir a través de la reacción de dismutación, para la cual se puede plantear la siguiente ecuación (ecuación 20):

$$-\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{dismutación}} = 2k [A^\bullet]^2 \quad [20]$$

donde $2k = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Sharma y Buettner, 1993; Roginsky y Stegmann, 1994; Arroyo y col., 2000).

El A^\bullet puede ser reducido a AH^\cdot por NADH, a través de una reacción catalizada por la enzima MDAR (reacción 22), como fue mencionado previamente (Figura 74).



En cerebro, la actividad de esta enzima es de $13 \times 10^{-3} \text{ U NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, donde 1 U es la cantidad de la enzima que consume $1 \mu\text{mol}$ de sustrato min^{-1} (Nishino y Ito, 1986). Por lo tanto, la velocidad de desaparición de A^\bullet en este sistema sería $26 \times 10^{-9} \text{ moles } A^\bullet \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$. Considerando el contenido de proteínas y de H_2O indicado previamente y la no compartimentalización de la molécula, la velocidad de degradación de A^\bullet dependiente de la MDAR resulta de $38 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$.

$$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{MDAR}} = \frac{26 \times 10^{-9} \text{ mol}}{\text{min mg prot}} \times \frac{72 \times \text{mg prot}}{1 \text{ g PF}} \times \frac{1 \text{ g PF}}{0,82 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}$$

$$-\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{MDAR}} = \boxed{38 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}}$$

La desaparición de A^\bullet por otras reacciones de menor importancia se resume en la expresión $\left(-\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{otras reacciones}}$ las cuales pueden incluir reacciones de terminación de RI^\bullet o la reducción de A^\bullet que se da a nivel de la membrana plasmática probablemente mediada por el sistema del Cit *b* (Horemans y col., 1994; Smirnoff, 2000).

De este modo, se pudo calcular una $[A^\bullet]_{ee}$ de acuerdo a las ecuaciones 21 y 22 en cerebros control.

$$\frac{d[A^\bullet]}{dt} = - \frac{d[A^\bullet]}{dt} \quad [21]$$

$$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{AO} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{ROO^\bullet} = \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{\text{dismutación}} + \left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right)_{MDAR} \quad [22]$$

$$58,51 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1} = 2 k [A^\bullet]^2 + 38 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$$

$$58,51 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [A^\bullet]^2 + 38 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$$

Despejando, resulta,

$$[A^\bullet]^2 = 2,61 \mu\text{M}$$

De esta forma, la concentración experimentalmente determinada de A^\bullet en estado estacionario en cerebros control ($3,2 \mu\text{M}$) resultó del mismo orden de magnitud que la concentración determinada por EPR en los tejidos cerebrales empleando el modelo simple de la aproximación del estado estacionario ($2,61 \mu\text{M}$). Si bien es importante considerar que pueden existir diversas reacciones que no fueron tenidas en cuenta para el análisis, esta observación sugiere que las aproximaciones y suposiciones realizadas, llevan a la descripción de un mecanismo celular de generación y consumo de A^\bullet mayoritariamente coincidente con los procesos fisiológicos que sucederían en el cerebro de rata *in vivo*.

Como fue mencionado previamente, la concentración estimada de A^\bullet determinada por EPR en los tejidos cerebrales de animales sometidos al tratamiento agudo de Fe-dextrán, al cabo de 6 h de administración del Fe fue $213 \pm 12 \text{ pmol/mg PF}$ o $5,3 \times 10^{-6} \text{ M}$, siendo significativamente diferente al valor control experimentalmente determinado.

De acuerdo con la ecuación 15, en cerebro de ratas sobrecargadas con Fe-dextrán durante 6 h, la concentración de AH^\cdot determinada fue $0,315 \pm 0,020 \text{ nmol/mg PF}$, o $3,15 \times 10^{-6} \text{ M}$.

$$[AH^\cdot] = \frac{0,315 \times 10^{-9} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{10 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[AH^-] = 3,15 \times 10^{-6} \text{ M}$$

En la Tabla 9 se indican las velocidades calculadas en base a la ecuación 15 para las reacciones de las especies activas más relevantes en células animales con AH^- , considerando la concentración de AH^- en homogeneizado de cerebro de rata al cabo de 6 h de administración de Fe-dextrán, y teniendo en cuenta los datos que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 9

Velocidad de generación de A^\bullet dependientes de la reacción de especies activas con AH^- luego del tratamiento agudo con Fe-dextrán*

Especie	$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt}\right) (\text{M s}^{-1})$
1O_2	$3,15 \times 10^{-14}$
$O_2^{\bullet-}$	$1,70 \times 10^{-10}$
$^{\bullet}OH$	$1,36 \times 10^{-13}$
ROO^\bullet	$1,26 \times 10^{-8}$
R^\bullet	$2,93 \times 10^{-15}$

*Considerando concentración de AH^- 6 h luego de la administración de Fe

La concentración de LIP determinada en cerebro de ratas sobrecargadas con Fe-dextrán, luego de 6 h, fue $10 \pm 2,5$ pmol/mg PF. Realizando las consideraciones ya mencionadas para el cálculo de la concentración de AH^- se obtiene una concentración de LIP de $5,0 \times 10^{-6}$ M en homogeneizados de cerebro con sobrecarga aguda de Fe al cabo de 6 h.

$$[LIP] = \frac{10 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{500 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[LIP] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Por lo tanto, con la concentración de AH^- y de LIP calculadas, la generación de A^\bullet en ratas con sobrecarga aguda de Fe-dextrán, a partir de la ecuación 16, resulta de $4,72 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$.

$$\left(\frac{d[A^\bullet]}{dt} \right)_{\text{Fe}^{3+}} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 3,15 \times 10^{-6} \text{ M} \times 5,0 \times 10^{-6} \text{ M} = \boxed{4,72 \times 10^{-10} \text{ Ms}^{-1}}$$

La velocidad de generación de A^\bullet debida a Fe^{3+} se incrementó 2,9 veces con respecto al valor control. Sin embargo, para completar el análisis cinético que permite estimar la $[A^\bullet]$ en condiciones de sobrecarga de Fe se requiere conocer el efecto de dicho tratamiento sobre la actividad de las enzimas AO (involucrada en la generación de A^\bullet) y MDAR (involucrada en la desaparición de A^\bullet). Considerando que no se determinó el efecto de la sobrecarga con Fe sobre estas actividades en particular ni sobre las proteínas en general, no es posible avanzar con el cálculo de la $[A^\bullet]_{\text{ee}}$ en estas condiciones. Sin embargo, el buen ajuste del modelo cinético observado en el caso de los animales control y el incremento en el valor de LIP, con un contenido constante de AH^\cdot , permite asumir que estudios futuros que caractericen los efectos del tratamiento en el medio proteico celular (no contemplado en este trabajo) permitirán progresar en el estudio cinético planteado.

4.3- Metabolismo oxidativo del Fe en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga subcrónica de Fe

El contenido de Fe total en cerebro de rata, aumentó significativamente 2 h luego de la 6^{ta} administración de Fe-dextrán. Aunque nuestros resultados indican que el contenido de Fe total volvió a valores control posteriormente, el contenido de LIP aumentado 2 h pi, no retornó a valores control en el período estudiado. El comportamiento del LIP podría estar relacionado con la acción de la Ft, ya que al incrementarse paulatinamente el contenido de Fe total, habría un reacondicionamiento constante de Fe celular que podría ser responsable del mantenimiento de los altos valores de LIP, que estaría relacionado con esta movilización desde y hacia la Ft.

La sobrecarga subcrónica con Fe-dextrán presentada en este trabajo conduce a estrés oxidativo transiente con una cinética que difiere del efecto observado en el tratamiento agudo. Se verificó un aumento significativo en la velocidad de generación de RL^\bullet y del índice de estrés oxidativo en el medio lipofílico celular ($\text{RL}^\bullet/\alpha\text{-T}$) luego de 2 h de la aplicación de la 6^{ta} dosis que retornan rápidamente a los valores control. En este caso, el aumento del índice se debe a un aumento en la velocidad de generación de RL^\bullet , y del consumo del antioxidante $\alpha\text{-T}$, efecto que puede deberse a la constante y elevada concentración de LIP. Tanto la velocidad de oxidación de DCFH-DA como el índice $A^\bullet/\text{AH}^\cdot$, se incrementaron con respecto a los valores control, luego de 4 h de la aplicación de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, sugiriendo que existe una condición de estrés oxidativo temporaria en el medio hidrofílico asociada al aumento del contenido de Fe

total en el cerebro. La actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT se vieron aumentadas luego de 2 y 8 h de la 6^{ta} dosis de Fe, respectivamente. Luego de las 8 h pi no se observaron alteraciones en ningún parámetro de estrés ni de daño oxidativo. El porcentaje de unión del factor NF-κB no se vio modificado en el período estudiado y además la integridad del ADN nuclear no sufrió modificaciones significativas, sin embargo, la integridad del ADN mitocondrial disminuyó significativamente, sugiriendo una mayor sensibilidad frente al daño oxidativo del ADN mitocondrial en comparación con el nuclear. En este sentido, el hecho de que los estadios finales de la síntesis del hemo ocurran en la mitocondria (Fujiwara y Harigae, 2015) podría ser un factor importante en este sentido ya que funcionalmente se requiere una alta disponibilidad de Fe en la matriz mitocondrial. Así, el ADN mitocondrial estaría más expuesto al efecto de la sobrecarga con Fe.

La capacidad de unión de NF-κB a ADN no es la única vía de señalización que puede desencadenar un aumento en la actividad antioxidante (ej. actividad de CAT). Cantidades intermedias de ROS, podrían disparar la respuesta inflamatoria a través de la activación de NF-κB y/o de AP-1 (Halliwell y Gutteridge, 1989), lo que también podría aumentar la actividad de enzimas antioxidantes. Si bien el estrés oxidativo es un fenómeno redox que estaría vinculado con el fenómeno de hormesis, con efectos biológicos beneficiosos a bajos niveles y perjudiciales a altos niveles (Videla, 2010), tales niveles no están claramente delimitados y podría considerarse la sobrecarga subcrónica de Fe como factor desencadenante de una forma de hormesis en la cual se observan efectos beneficiosos debidos al exceso de Fe, produciendo un aumento de la respuesta antioxidante que limitaría el daño frente a la exposición a un estrés oxidativo posterior.

El tejido cerebral es más susceptible al daño dependiente de ROS que otros órganos debido a las siguientes características (i) las neuronas están enriquecidas en mitocondrias y poseen un metabolismo aeróbico relativamente elevado; (ii) los bajos niveles de algunas enzimas antioxidantes; (iii) el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas cerebrales; y (iv) el alto contenido de Fe, que puede combinar sus efectos para hacer del cerebro un órgano susceptible para la degeneración mediada por estrés oxidativo (Halliwell, 2006). A pesar de que se observó alteración lipídica en el cerebro en muchos casos después de la sobrecarga de Fe (Piloni y Puntarulo, 2010), los cambios en la capacidad antioxidante pueden jugar un papel crucial en el control de los mecanismos de deterioro. Los mecanismos subyacentes de daño tisular inducido por Fe son complejos y dependen probablemente del protocolo de administración de Fe empleado. De hecho, los

resultados presentados muestran que con la administración subcrónica de Fe se alcanzaron niveles máximos de Fe en el cerebro 2 h después del tratamiento, mientras que el aumento provocado por una dosis aguda de 500 mg Fe/kg se alcanza 6 h después del tratamiento, lo que sugiere diferentes procesos metabólicos, o al menos con diversas velocidades, y de transporte frente a ambos tratamientos.

Como se comentó previamente, el aumento en los niveles de Fe total en el cerebro inducidos por la administración subcrónica de Fe después de 2 h, regresaron a los valores control después de 4 h, sin embargo, el contenido de LIP se mantuvo elevado en el período de 2 a 24 h después del tratamiento. El perfil cinético diferente en el cerebro observado entre el contenido de Fe total y LIP podría reflejar la situación en que se encuentran los depósitos de Fe después de la absorción lenta del metal frente a las dosis anteriores de Fe recibidas, donde la Ft probablemente fue secuestrando paulatinamente Fe. Al cabo de 4 h de la administración de Fe, a pesar de que el contenido total de Fe recuperó los valores control, la distribución de Fe celular interna es sustancialmente diferente. Temporalmente asociado al contenido de Fe en el cerebro observado a las 2 h después de la administración de Fe, la producción de RL^\bullet se incrementó significativamente y el contenido de α -T se redujo de forma concomitante, con un aumento significativo en la relación RL^\bullet/α -T, lo que sugiere un aumento del daño en el medio lipofílico celular que podría conducir a un deterioro de las membranas celulares.

Considerando el efecto de este mismo tratamiento de sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán sobre otros órganos en la rata, queda en evidencia que el modelo de protocolo de administración de Fe es clave para considerar el daño que cada protocolo de administración es capaz de generar en distintos órganos de interés. Un aumento del Fe total en cerebro, producido por la sobrecarga subcrónica presentada en este trabajo, es comparable en magnitud al aumento producido por la sobrecarga aguda, y genera un daño a lípidos sustancialmente elevado comparado con el daño determinado en el tratamiento agudo (sin cambio significativo en la velocidad de generación de RL^\bullet y un aumento discreto en el contenido de TBARS), lo cual podría deberse al aumento del LIP que se mantuvo elevado durante las 24 h en el tratamiento subcrónico (Tabla 10). En este sentido, la administración paulatina de Fe mediante la suministración crónica de una dieta suplementada con 2,5% (P/P) de Fe-carbonilo durante 6 semanas (Galleano y Puntarulo, 1997) no generó modificación en el contenido de TBARS en plasma. Sin embargo, en el hígado, se generó un aumento de más de 10 veces en el contenido de Fe total, aunque el daño determinado como contenido de TBARS fue sustancialmente menor (Tabla 10), indicando que el

mecanismo activado para la protección de este órgano diferiría del activado cuando se administra una sobrecarga aguda de Fe.

Tabla 10

Efecto de la sobrecarga crónica y subcrónica de Fe-dextrán sobre distintos órganos

	Control	Sobrecarga de Fe	Efecto (%)
Sobrecarga crónica de Fe en hígado con Fe-carbonilo (<i>Galleano y Puntarulo, 1997</i>)			
Contenido de Fe ($\mu\text{g/g PF}$)	69 ± 16	$1091 \pm 178^*$	+1481
TBARS (nmol/mg prot)	$0,45 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,01^*$	+28
Sobrecarga crónica de Fe en plasma con Fe-carbonilo (<i>Galleano y Puntarulo, 1997</i>)			
Contenido de Fe (mg/dl)	179 ± 43	$336 \pm 57^*$	+88
TBARS (nmol/ml)	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$	+0
Sobrecarga subcrónica de Fe en cerebro total con Fe-dextrán			
Contenido de Fe (mg/g PF)	$0,050 \pm 0,001$	$0,360 \pm 0,014^*$	+674
Velocidad de generación de RL [•] (pmol/mg PF/30 min)	267 ± 48	$529 \pm 128^*$	+98

*significativamente diferente de los valores control, $p < 0,05$.

Los cerebros de ratas sometidas a la administración subcrónica de Fe mostraron cambios sustanciales en la oxidación de AH^\cdot . Los datos presentados indican un aumento significativo en la relación $\text{A}^\cdot/\text{AH}^\cdot$ a las 4 h después de la administración subcrónica de Fe, lo que sugiere el desarrollo de una condición de estrés oxidativo asociado con el aumento previamente registrado (2 h) en la concentración de Fe total del cerebro. La actividad antioxidante del AH^\cdot es el resultado de su capacidad para reducir los radicales ROO^\cdot , la propagación de la peroxidación lipídica, o para reducir la forma oxidada (radical $\alpha\text{-T}^\cdot$) del antioxidante natural $\alpha\text{-T}$ (Doba y col., 1985). El contenido de AH^\cdot comenzó a disminuir a las 2 h de la administración de Fe coincidentemente con la disminución en el contenido $\alpha\text{-T}$ y el contenido máximo de Fe en el cerebro. Probablemente debido a la vía de regeneración de $\alpha\text{-T}$, el contenido de A^\cdot fue significativamente mayor 4 h después de la administración de Fe en el cerebro, lo que indica un aumento de la condición pro-oxidante en el medio hidrofílico celular. Para explorar más esta disociación cinética entre el contenido máximo de Fe y el aumento en la relación $\text{A}^\cdot/\text{AH}^\cdot$, se evaluó otro índice de estrés oxidativo. Los resultados presentados aquí indican que la oxidación de DCFH-DA también se vio

aumentada significativamente 4 h después del tratamiento con Fe, corroborando la observación previa en el entorno hidrofílico. Sin embargo, todos los índices analizados, tanto las relaciones $RL^{\bullet}/\alpha\text{-T}$ y A^{\bullet}/AH^{\bullet} como la oxidación de DCFH-DA volvieron a los valores control 6 h después de la administración de Fe, lo que sugiere que pueden ocurrir otros eventos en relación con el disparo de efectos reguladores y protectores de los procesos de señalización dependientes de Fe, que conducen a la prevención significativa de la lesión cerebral asociada con el aumento de LIP. En la Figura 75 se muestra una posible secuencia de eventos disparados en el cerebro de rata por la sobrecarga subcrónica con Fe-dextrán. Esta secuencia propuesta interpreta que las vías de señalización activadas por Fe bajo este protocolo de administración de Fe, difieren de aquellas activadas por la sobrecarga aguda descrita previamente.

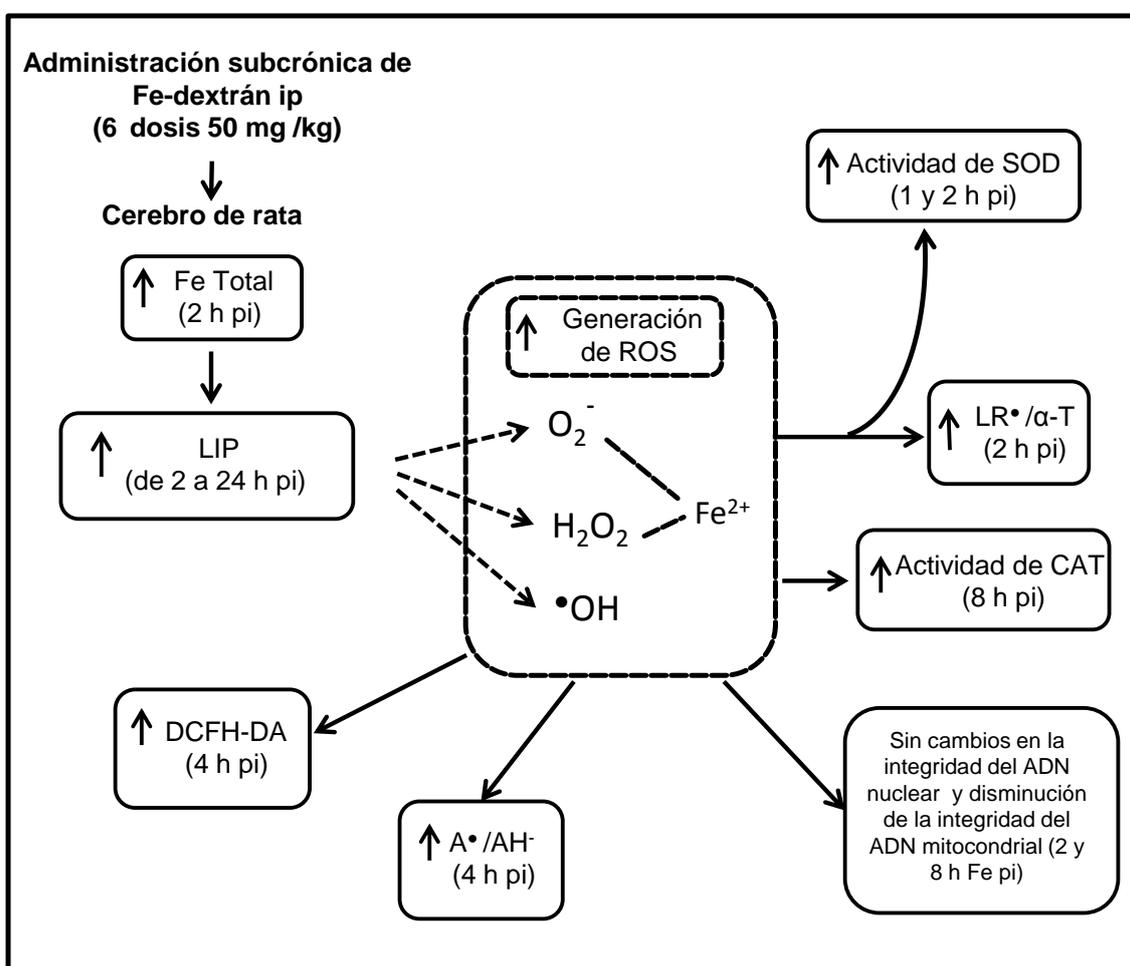


Figura 75: Diagrama mostrando la posible secuencia de eventos que ocurren en el cerebro de rata luego de la administración subcrónica de Fe-dextrán. Los cuadrados de líneas continuas representan los parámetros medidos.

Como se indicó previamente, dependiendo de los niveles de ROS, diferentes factores de transcripción redox sensibles se activan (Halliwell y Gutteridge, 1989). Por ejemplo, se ha mostrado un aumento significativo en el porcentaje de unión del factor

de transcripción NF-kB a ADN después de 8 h de sobrecarga aguda Fe en el cerebro (500 mg/kg), efecto seguido de un aumento significativo de la actividad de CAT después de 21 h de la administración de Fe, de acuerdo con otras observaciones previas (Moon y col., 2012; Gloire y col., 2006). Sin embargo, los resultados que se muestran aquí con un aumento en la concentración de Fe en el caso de administración subcrónica en el cerebro no parecen estar relacionados con la capacidad de unión de NF-kB a ADN. Se ha propuesto a la activación del factor Nrf2 debida a la administración subcrónica de Fe (Morales y col., 2014; Kensler y col., 2007), que controla la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo SOD y CAT. Es importante señalar que la actividad de la enzima SOD aumentó rápidamente, 1 y 2 h después de la administración de Fe, y la actividad de la enzima CAT se incrementó 8 h después de la 6^{ta} dosis ip de Fe-dextrán. El aumento diferido en la actividad de CAT con respecto al verificado en la actividad de SOD podría responder al aumento en la concentración de H₂O₂ producido por el aumento en la actividad de SOD, en un patrón secuencial. Actualmente está bien establecido que la concentración de H₂O₂ es un posible candidato para regular la señalización celular debido a su capacidad para inhibir la tirosina fosfatasa a través de la oxidación de residuos de cisteína en su dominio catalítico, que a su vez activa a las tirosina quinasas y activa una cascada de señalización (Aslan y Özben, 2003; Tonks, 2005; Forman y col., 2010). Para identificar plenamente a los eventos que llevan a una protección antioxidante en el cerebro de ratas en estas condiciones experimentales, se requieren más estudios en esta dirección. La situación planteada está de acuerdo con la hipótesis de hormesis, que señala la falta de daño significativo en el cerebro, y observaciones que conducen a otras vías que podrían ser gatilladas para aumentar la protección y evitar daños frente a otros posibles cambios oxidativos posteriores. Es importante destacar que la concentración aumentada de Fe lleva a un estrés oxidativo inicial, tanto en los medios hidrofílico como lipofílico. Mas aún, si por cualquier motivo funcional hubiese una regulación deficiente de Fe seguido por una respuesta de señalización antioxidante inadecuada, se desencadenarían episodios de muerte neuronal o lesiones.

Por otra parte, el cerebro tiene múltiples regiones con requisitos metabólicos especializados y una variedad de tipos de células con diferentes requerimientos de Fe. Sin embargo, en este caso, aunque el análisis histológico reveló depósitos de Fe, tanto vascular como tisular, no se observó daño a los tejidos y la barrera hematoencefálica se observó intacta. Nuestros resultados indican claramente que, aunque la concentración de Fe aumentó más de dos veces en todas las áreas del cerebro estudiadas, la concentración de Fe en el hipocampo aumentó mayoritariamente con

respecto a la corteza y al cuerpo estriado. Por otra parte, la actividad de CAT se incrementó significativamente en la corteza sin cambios detectables en la actividad en el cuerpo estriado y en el hipocampo. Esta observación podría conducir a la hipótesis de que, si aparece daño dependiente de Fe, éste se encontraría principalmente en el hipocampo, aunque es necesaria la evaluación de la capacidad antioxidante de cada área. Por lo tanto, la evaluación de los efectos dependientes de Fe en el cerebro se debe analizar con cautela para evitar la subestimación de los complejos mecanismos que tienen lugar cuando la sobrecarga de Fe se desarrolla, tanto en forma aguda como subcrónica. Tomados en su conjunto, estos resultados mostraron que incluso el aumento lento y controlado en el contenido de Fe es capaz de causar estrés oxidativo en el cerebro y que las vías de defensa se activan en función del protocolo de administración de Fe.

4.3.1- Modelo de estado estacionario para el A• en sobrecarga subcrónica de Fe

Como se mencionó previamente, los niveles de A• presentes en los tejidos cerebrales representan la $[A•]_{ee}$, y los niveles de A• reflejan el balance entre la producción de AH•, y la velocidad de oxidación univalente del mismo. La $[A•]$ estimada determinada por EPR en los tejidos cerebrales control promedio del grupo de animales sometidos al tratamiento agudo y subcrónico con Fe-dextrán fue de 114 ± 15 pmol/mg PF, o sea, $2,9 \times 10^{-6}$ M. Como la velocidad de generación de RL• puede influir en la velocidad de generación de A•, el análisis de esta velocidad se realizará a ambos tiempos. La $[A•]$ fue 108 ± 13 pmol/mg PF, es decir, $2,7 \times 10^{-6}$ M, y 216 ± 46 pmol/mg PF, o sea, $5,4 \times 10^{-6}$ M luego de 2 y 4 h pi, respectivamente, siendo esta última significativamente diferente con respecto al grupo control.

$$[A•]_c = \frac{114 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{25 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml homog}} \times \frac{1000 \text{ ml homog}}{1 \text{ l}}$$

$$[A•]_c = 2,9 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[A•]_{2\text{hpi}} = \frac{108 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{25 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml homog}} \times \frac{1000 \text{ ml homog}}{1 \text{ l}}$$

$$[A•]_{2\text{hpi}} = 2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[A^\bullet]_{4\text{hpi}} = \frac{216 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{25 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml homog}} \times \frac{1000 \text{ ml homog}}{1 \text{ l}}$$

$$[A^\bullet]_{4\text{hpi}} = 5,4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Teniendo en cuenta las aproximaciones de contenido proteico y agua para el tejido cerebral, ya indicadas, la concentración de AH^- resultante es de $2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$.

$$[AH^-]_C = \frac{272 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{10 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[AH^-]_C = 2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Luego del tratamiento subcrónico con Fe-dextrán, se observó una disminución significativa en la concentración de AH^- luego de 2 y 4 h de administración de la 6^{ta} dosis de Fe, con respecto al valor control. Al cabo de 2 h la concentración determinada fue $0,160 \pm 0,010 \text{ nmol/mg PF}$ ó $1,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ mientras que al cabo de 4 h la concentración fue $0,150 \pm 0,040 \text{ nmol/mg PF}$ ó $1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

$$[AH^-]_{2\text{hpi}} = \frac{160 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{10 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[AH^-]_{2\text{hpi}} = 1,6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[AH^-]_{4\text{hpi}} = \frac{150 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{10 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[AH^-]_{4\text{hpi}} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Esta situación es compatible con el hecho de que luego de la sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán, a diferencia del tratamiento agudo, en el cerebro de rata, se produce un consumo de AH^- en los tiempos estudiados que estaría contribuyendo a prevenir la generación de A^\bullet mediada por ROO^\bullet generados por la sobrecarga de Fe.

La concentración de $Fe^{2+} + Fe^{3+}$ (LIP) determinada en este sistema por fluorescencia de CA en cerebros de ratas control fue $9,22 \pm 4,9 \text{ pmol/mg PF}$ ó $4,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ en homogeneizado de cerebros control.

$$[\text{LIP}]_C = \frac{9,22 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{500 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[\text{LIP}]_C = 4,6 \times 10^{-6} \text{ M}$$

La concentración de LIP en cerebros de ratas sobrecargadas con Fe-dextrán, luego de 2 h y 4 h de la 6^{ta} dosis, fue $34,1 \pm 1,3$ pmol/mg PF y $27,1 \pm 0,5$ pmol/mg PF, respectivamente. Realizando las consideraciones ya mencionadas para el cálculo de la concentración de A[•] se obtiene una concentración de LIP de $17,1 \times 10^{-6}$ M en homogeneizado de cerebros con sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán, al cabo de 2 h de la 6^{ta} dosis y una concentración de LIP de $13,5 \times 10^{-6}$ M, al cabo de 4 h pi.

$$[\text{LIP}]_{2\text{hpi}} = \frac{34,1 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{500 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[\text{LIP}]_{2\text{hpi}} = 17,1 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$[\text{LIP}]_{4\text{hpi}} = \frac{27,1 \times 10^{-12} \text{ mol}}{1 \text{ mg PF}} \times \frac{500 \text{ mg PF}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}}$$

$$[\text{LIP}]_{4\text{hpi}} = 13,5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Considerando que todo el LIP se encuentra como Fe³⁺, la generación de A[•] debida a Fe³⁺ en cerebros de ratas control y luego de la sobrecarga subcrónica de Fe descrita en la reacción 15 al cabo de 2 y 4 h de la administración de la 6^{ta} dosis, se indica a continuación:

$$\left(\frac{d[\text{A}^\bullet]}{dt} \right)_{\text{Fe}^{3+}(\text{C})} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 2,7 \times 10^{-6} \text{ M} \times 4,6 \times 10^{-6} \text{ M} = 0,37 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$$

$$\left(\frac{d[\text{A}^\bullet]}{dt} \right)_{\text{Fe}^{3+}(2\text{hpi})} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 1,5 \times 10^{-6} \text{ M} \times 17,1 \times 10^{-6} \text{ M} = 0,77 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$$

$$\left(\frac{d[\text{A}^\bullet]}{dt} \right)_{\text{Fe}^{3+}(4\text{hpi})} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \times 1,6 \times 10^{-6} \text{ M} \times 13,5 \times 10^{-6} \text{ M} = 0,65 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$$

La comparación de los valores obtenidos en forma teórica con los valores experimentales de la concentración de $[A^\bullet]_{ee}$ en animales control y al cabo de 2 y 4 h de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán (2,9, 2,7 y 5,4 μM , respectivamente), sugiere que factores tales como el efecto del tratamiento sobre la actividad de las enzimas AO y MDAR, deben jugar un papel crítico en el complejo escenario de la bioquímica oxidativa celular. Sin embargo, el aumento a las 4 h de la concentración de $[A^\bullet]_{ee}$ calculado en forma teórica (Tabla 11), predicho por un aumento en el LIP en un 75%, resulta coincidente con el 86% de aumento en la $[A^\bullet]_{ee}$ determinado experimentalmente. Por lo tanto, sería de esperar que, otros mecanismos no evaluados en el presente trabajo, jueguen un papel crítico a las 2 h post-administración de Fe, donde asociado al aumento del LIP existe un fuerte incremento del Fe total pero que no se refleja en una variación del contenido de la $[A^\bullet]_{ee}$ (Tabla 11).

Tabla 11

Concentraciones de las especies relevantes consideradas para el cálculo de la velocidad de generación de A^\bullet

Especie	Fe-dextrán subcrónico		
	Control	2 h	4 h
Valores calculados en forma teórica			
A^\bullet (M)	$2,6 \times 10^{-6}$	$3,13 \times 10^{-6}$	$4,41 \times 10^{-6}$ ($\uparrow 70\%$)
Valores experimentales			
A^\bullet (M)	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-6}$ ($\uparrow 86\%$)
AH^\cdot (M)	$2,7 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
LIP (M)	$4,6 \times 10^{-6}$	$17,1 \times 10^{-6}$	$13,5 \times 10^{-6}$
$\left(\frac{d[A^\cdot]}{dt}\right)_{Fe^{3+}}$	$0,37 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$	$0,77 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$	$0,65 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ ($\uparrow 75\%$)

Como se indicó previamente, estudios posteriores sobre los efectos de la sobrecarga subcrónica con Fe-dextrán son necesarios para completar el análisis cinético sobre la actividad de las proteínas. Cabe mencionarse, sin embargo, que un enfoque analítico de esta naturaleza no ha sido realizado hasta el presente en cerebro

en estas condiciones experimentales y constituye un escalón inicial que podría contribuir a dilucidar como se afectarían los numerosos estados estacionarios en los que intervienen las especies activas en el hasta ahora inexplorado entramado de la bioquímica celular.

4.4- Efecto de situaciones de estrés oxidativo en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga de Fe

4.4.1- Administración aguda de Fe y LPS

La sepsis es una situación asociada a estrés oxidativo, y el Fe podría agravar tal condición. Se ha propuesto que hay una variedad de mecanismos que explican la creciente susceptibilidad a la infección en pacientes con hemocromatosis (Khan y col., 2007), y la propensión de los pacientes con sobrecarga de Fe a desarrollar una enfermedad fulminante al recibir un trasplante hepático, como también al alto riesgo de estar expuestos a grandes oportunistas infecciosos (Singh y Sun, 2008). En el presente trabajo se utilizó un modelo experimental de sepsis que incluye una única dosis simultánea de Fe (500 mg/kg) y LPS (4 mg/kg) para estudiar el efecto sobre el cerebro. Este protocolo es importante para el análisis del efecto de una infección y sepsis en un paciente con una condición patológica de sobrecarga aguda de Fe. Según el modelo mencionado, Rousseau y col. (2011) sugirieron que, en el hígado, al cabo de las primeras 6 h, la estrategia de defensa contra los patógenos fue menos operativa en presencia de sobrecarga aguda de Fe, en comparación con la respuesta en los animales con un contenido de Fe fisiológico. Sin embargo, la condición oxidativa del hígado no parece verse afectada, ya que mecanismos endógenos regularían el contenido de LIP aún en presencia de LPS, luego de 6 h de administración de LPS (Rousseau y col., 2011). Nuestros resultados en cerebro indican que la administración de LPS no modifica el contenido de Fe con respecto al valor control ya que un aumento significativo del contenido de Fe total fue observado en las muestras de cerebro de ratas tratadas con Fe, tanto en presencia como en ausencia de LPS. El contenido de A[•] aumentó un 41% en el grupo de animales con sobrecarga aguda de Fe en ausencia de LPS con respecto al control. Sin embargo, la administración de LPS en presencia de Fe no alteró el contenido de A[•] con respecto a los valores en animales control. Esta situación puede deberse a que el LPS, como estímulo inflamatorio, genere NO y que el exceso circulante del mismo haya quelado al Fe que se incorpora en el cerebro en forma drástica. Esto explicaría que aunque se produce un aumento de Fe total en el cerebro de ratas tratadas con sobrecarga aguda de Fe, en presencia y en ausencia de LPS; cuando la sobrecarga se administra en presencia de LPS, la posibilidad del metal de actuar como catalizador se modifique. Esta

alteración sería responsable de que no se observen modificaciones en la generación de A[•], debido a que, probablemente, se produce la formación de mononitrosil (MNIC) y dinitrosil complejos de Fe (DNIC).

Las células de la microglía participan en la inmunidad innata en el cerebro, y también se conocen como el mayor tipo celular responsable de la inflamación celular mediada por la neurotoxicidad (Skaper y col., 2012). Tras una lesión neuronal o estímulos inflamatorios tales como la administración de LPS, el interferón (IFN) - γ o β -amiloide, la microglia es sobre-activada y se liberan varios tipos de mediadores pro-inflamatorios y citoquinas tales como el NO, prostaglandina E2 (PGE2), ROS, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleuquina-1 beta (IL-1 β) (Block y col., 2007; Park y col., 2012). Estos mediadores pro-inflamatorios y citoquinas pueden regular la supervivencia neuronal, aunque están involucrados posteriormente en los procesos de neurodegeneración (Santos y col., 2012; Montgomery y Bowers, 2012; Thameen Dheen y col., 2007).

El NO es capaz de unirse a Fe²⁺ para formar complejos Fe-nitrosilo. Se ha informado sobre la presencia de MNICs y DNICs, dependiendo de la naturaleza del ligando unido (Simontacchi y col., 2011). Entre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los complejos de Fe-nitrosilo, se postuló que estos compuestos pueden funcionar en el transporte de NO en animales y humanos, en calidad de formas de estabilización de NO que proporcionan su transporte a través de varias células y tejidos (Vanin y col., 1998). Señales características de EPR permitieron detectar DNIC en los tejidos animales o células aisladas tratados con NO gaseoso o dadores de NO (Vanin y col., 1998). En estos complejos, el ion Fe²⁺ coordina dos moléculas de NO junto con otros dos ligandos, generando un característico espectro de EPR, centrado a aproximadamente 2,03 g (Pedersen y col., 2007). Además, los MNICs, hasta el momento, han sido detectados por EPR (Simontacchi y col., 2011), aunque no fueron detectados por CA. La formación de MNICs y DNICs podrían considerarse como factores que contribuyen a la expresión del efecto hormético en el medio hidrofílico.

El papel fisiológico de los DNIC es aún controversial, porque a pesar de actuar como portadores estables de NO, también se sabe que tienen efectos tóxicos en los sistemas biológicos (por ejemplo, inhibidores irreversibles de la actividad de la enzima glutatión reductasa) (Pedersen y col., 2007). Nuestros resultados sugieren que la administración simultánea de Fe y LPS protege al cerebro de la producción de radicales oxidativos dependientes de la presencia de Fe en exceso. Este efecto podría deberse a la capacidad del NO de quelar el Fe y limitar su habilidad catalítica.

4.4.2- Administración subcrónica de Fe seguida de LPS

Bajo el protocolo de administración subcrónica de Fe luego de 72 h de la administración de la 6^{ta} dosis, tanto el contenido de Fe total como el LIP y la Ft se encuentran aumentados en hígado de rata (22,9-; 8,3- y 15,2- veces, respectivamente) (Galleano y col., 2011). Esta situación lleva a un aumento transiente del estado oxidativo del hígado entre las 24 y 72 h de la administración de la 6^{ta} dosis, determinado por el nivel de proteínas carboniladas y la relación proteínas carboniladas/GSH, que a las 72 h retornan al valor control (Galleano y col., 2011). Además, se demostró la capacidad de protección otorgada por este protocolo de administración de Fe contra los efectos de la isquemia-reperfusión (IR) hepática, al ser producida la sobrecarga de Fe previamente a la IR (Galleano y col., 2011). Estos resultados son consistentes con el hecho de que un aumento transiente y moderado del estrés oxidativo en el hígado es considerado como un estímulo hormético que lleva a un pre-acondicionamiento ante la aparición de un segundo estrés, como por ejemplo diversas condiciones de IR experimental, incluyendo isquemia transiente (Romanque y col., 2010; Peralta y col., 1997; Terajima y col., 2000). Esta estrategia de pre-acondicionamiento tiene potencial uso clínico ya que se ha demostrado una significativa protección otorgada por la administración de Fe en el hígado cuando se administra antes de la IR, sin embargo no se conoce el efecto que puede producir en otros órganos como el cerebro. En este trabajo, luego de 72 h de la 6^{ta} dosis de Fe, se administró LPS con el fin de generar endotoxemia y evaluar el efecto sobre el cerebro en el período temporal donde un aumento transiente y moderado de estrés oxidativo en el hígado llevó a un pre-acondicionamiento ante la exposición a una situación de estrés en ese órgano.

Este trabajo muestra que en cerebro de rata, no se observó un aumento en el contenido de A[•] en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, se observó un aumento significativo en el contenido de Fe en el grupo de ratas tratadas con Fe en presencia de LPS. Este hecho es consistente con dos situaciones posibles i) con el hecho de que un estímulo inflamatorio, como el LPS, genere NO y que el exceso circulante del mismo esté quelando el Fe y favoreciendo la incorporación del metal en el cerebro en forma paulatina, lo que explicaría el aumento de Fe total en el grupo de ratas tratadas con Fe en presencia de LPS; y ii) aunque el Fe se incorpora paulatinamente, su actividad catalítica se encuentre limitada debido a que, probablemente, se produce la formación de DNICs y MNICs que no permiten que el Fe catalice efectivamente la generación de A[•]. No se observaron modificaciones en el índice A[•]/AH⁻ en ninguno de los grupos estudiados y, además, no se registró daño a

nivel lipofílico considerando los niveles de TBARS, indicando que, en las condiciones temporales estudiadas, la presencia de LPS favorece la incorporación de Fe en el cerebro limitando la generación de estrés oxidativo que pudiera producir el exceso del metal.

4.4.3- Administración subcrónica de Fe seguida de CPZ

Como se mencionó previamente, la CPZ es un fármaco altamente lipofílico que se une a una elevada proporción de proteínas del plasma y se concentra sustancialmente en el cerebro. Los efectos adversos causados por el tratamiento con CPZ se relacionan con la dosis y duración del mismo (Otręba y col., 2015). Aunque se ha demostrado que la administración de CPZ en distintas dosis es capaz de ejercer un efecto neuroprotector significativo sobre el daño en cerebro (Li y col., 2014), en la isquemia de la médula espinal (Sader y col., 2002), la neurotoxicidad inducida por el glutamato (Stone y Pilowsky, 2007) y la apoptosis neuronal inducida por etanol (Wu y col., 2011), también se ha demostrado que la actividad y la expresión de CAT y SOD disminuyen como consecuencia de la administración de una dosis de CPZ (Pillai y col., 2007), generando una situación controversial que podría ser explicada en términos del efecto hormético. Además, recientemente se ha demostrado en células melanocíticas epidérmicas humanas, que una incubación con CPZ durante 24 h, produce un aumento significativo en la actividad de SOD (que correlaciona con un aumento en los niveles de H₂O₂) y una disminución de la actividad intracelular de CAT-dosis dependiente (Otręba y col., 2015). Esta disminución en la actividad de CAT puede estar relacionada con los elevados niveles detectados de H₂O₂ que no pudieron ser eliminados, lo que indicaría que el sistema de defensa antioxidante no estaría actuando adecuadamente (Otręba y col., 2015). Akyol y col. (2002) también indicaron un posible papel de aumento del estrés oxidativo y antioxidantes enzimáticos disminuidos (por ej. SOD), los cuales pueden ser relevantes para la fisiopatología de la esquizofrenia. Además, el aumento de la producción de NO por la actividad de NOSs sugirió un posible papel del NO en el proceso fisiopatológico de la esquizofrenia. (Akyol y col., 2002).

De acuerdo al protocolo de administración de Fe y CPZ utilizado en este trabajo, luego de 8 h de administración de la 6^{ta} dosis de Fe, las ratas recibieron una dosis de CPZ de 10 mg/kg ip disuelta en solución fisiológica. Esta dosis es la concentración máxima que se administra en tratamientos terapéuticos en humanos (Baldessarini, 1996). Se observó un aumento significativo de la velocidad de generación de RL[•] en las muestras de cerebro de ratas tratadas con CPZ en ausencia

del pretratamiento con Fe, 9 y 10 h luego de la administración de la 6^{ta} dosis de solución fisiológica, mientras que en los cerebros de ratas pretratadas con Fe, la administración de CPZ no mostró diferencias significativas en el parámetro mencionado.

La generación de ROS inducida por CPZ y los cambios en las actividades de SOD y CAT también fue discutida por otros autores. Rukmini y col. (2004) demostraron que la CPZ y la tioridazina causaron estrés oxidativo en el suero de pacientes con esquizofrenia en los que se observó un decaimiento del sistema de defensa antioxidante. Además, Anthérieu y col. (2013) demostraron el aumento de la expresión de MnSOD en células HepaRG humanas después de 24 h de tratamiento con CPZ.

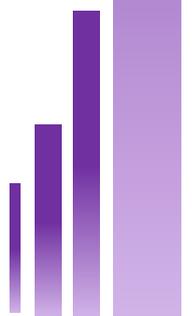
Los resultados presentados en este trabajo indican que no se observaron diferencias en la actividad de CAT entre las muestras de cerebro de ratas tratadas con CPZ en ausencia del pretratamiento con Fe y los valores control. Sin embargo, hubo un aumento significativo en la actividad de CAT en las muestras de cerebro de ratas tratadas con CPZ en presencia del pretratamiento con Fe, al cabo de 10 y 12 h post-administración de la 6^{ta} dosis de Fe, con respecto a los valores control. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la CPZ es capaz de producir efectos secundarios no deseados dependientes del tiempo y de la dosis. Sin embargo, dichos efectos pueden ser modificados si previamente se trata a los animales con un agente “levemente” estresante como el Fe-dextrán en forma controlada, capaz de activar el sistema de defensa antioxidante.

Si bien el pretratamiento con Fe (sobrecarga subcrónica de Fe-dextrán) generó un aumento del LIP al cabo de 2 h luego de la 6^{ta} dosis de Fe que se mantuvo elevado durante las 24 h, la absorción lenta del metal por la Ft frente a las dosis anteriores de Fe recibidas, permitiría por un lado, que el metal tenga menos posibilidades de actuar como catalizador en la generación de especies activas y por otro lado, que las defensas antioxidantes se activen. De este modo, el exceso de Fe estaría protegiendo al cerebro del daño lipídico generado por la CPZ. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de hormesis, en base a la observación de una disminución del daño lipídico causado por la CPZ, producida probablemente por la administración previa de sucesivas dosis bajas de Fe-dextrán.

Muchos agentes tóxicos han mostrado beneficios con bajos niveles de exposición (Calabrese, 2002). El concepto de hormesis se basa en observaciones experimentales, pero el supuesto de que efectos estimulantes son siempre o habitualmente beneficiosos, no está comprobado. Muchas respuestas estimuladoras de bajas dosis tienen consecuencias adversas igualmente probables que incluyen el

aumento de la replicación celular, la síntesis de ADN; la presión arterial, la frecuencia cardíaca, y otros inconvenientes (Calabrese y Baldwin 2003).

Las respuestas adaptativas en el hígado suelen implicar acciones de los compuestos químicos sobre las vías de señalización celular, que es a menudo mediada por el receptor, que conduce a cambios en la expresión génica y en última instancia, a la alteración del metabolismo, dirigida hacia el mantenimiento de la homeostasis a través de la modulación de diversas funciones celulares y extracelulares. En todos los niveles de organización, las respuestas adaptativas son beneficiosas en el sentido que mejoran la capacidad de todas las unidades de respuesta al estrés inducido por productos químicos, son reversibles y preservan la viabilidad. Los resultados presentados en este trabajo en relación al efecto de la administración de LPS y CPZ en cerebro de ratas tratadas con sobrecarga de Fe, son importantes ya que muestran efectos beneficiosos tanto con una única administración como con varias administraciones de Fe-dextrán. En lo que respecta al cerebro, por ejemplo, muchos estudios han encontrado que la hormesis potencia las células madre a un estado en el que pueden soportar un entorno celular mucho más duro y mejorar la recuperación funcional en modelos animales de enfermedad neurodegenerativa. Por lo tanto, es racional promover la combinación de la terapia de células madre con hormesis para lograr un resultado más deseable, y fomentar más investigación en el campo relacionado (Wang, 2012). Del mismo modo, los resultados presentados en este trabajo, muestran que el tratamiento agudo y subcrónico con Fe-dextrán, generan una situación de estrés oxidativo cuyos mecanismos difieren de un tratamiento a otro pero que tienen la particularidad de desencadenar la respuesta antioxidante en el cerebro. Esta respuesta es capaz de apaciguar los efectos producidos por la presencia de otra situación estresante, por ejemplo, la administración de CPZ, por lo que la administración de Fe se convierte en un posible químico capaz de generar una respuesta hormética en cerebro de rata. Considerando que muchas respuestas estimuladoras de bajas dosis tienen consecuencias adversas igualmente probables, que en el caso de la sobrecarga aguda de Fe se visualiza en una disminución de la integridad nuclear y mitocondrial del ADN y en la sobrecarga subcrónica se visualiza en una disminución de la integridad del ADN mitocondrial, es importante la continuidad del estudio a fin de caracterizar en profundidad el efecto hormético producido por el Fe para evaluar la factibilidad de un uso terapéutico.



5. Conclusiones

1. Los datos presentados en este trabajo indican que la sobrecarga aguda de Fe *in vivo* aumenta el contenido de Fe total en el cerebro de rata a las 6 h de la administración de la dosis única de Fe. Este incremento en el contenido de Fe lleva a un aumento en el contenido de LIP, que luego de 8 h vuelve a valores control. El aumento en el Fe total cerebral, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, condujo a un aumento transiente del LIP en el citoplasma que podría distribuirse en los componentes celulares que requieren Fe, tales como las mitocondrias, para rápidamente retomar al nivel control.
2. El incremento en el Fe total y en el LIP como consecuencia de la sobrecarga aguda de Fe *in vivo*, llevaron a un incremento en la concentración de las ROS llevando a un estado de estrés oxidativo inicial que se verifica por un aumento en el valor del índice A^{\bullet}/AH^{\cdot} , en sincronía temporal con el aumento en el contenido de Fe total y en el LIP.
3. El estrés oxidativo desencadenado por la sobrecarga aguda de Fe generó el aumento del porcentaje de activación del factor NF- κ B (30%) y en la actividad de la enzima CAT (62%), sin la producción de un daño significativo en cerebro ni alteración en la morfología del tejido. Sin embargo, se observó una disminución en la integridad de ADN nuclear y mitocondrial, que sería la consecuencia de las reacciones deletéreas causadas por el aumento en la concentración en estado estacionario de las especies activas catalizado por el incremento de Fe en las células.
4. El contenido de Fe total luego de 6 h de administración de la dosis única de Fe-dextrán ip en cerebro se ve reflejado en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, pero con un aumento mayoritario en el cuerpo estriado. Por otro lado, se observó un incremento en la peroxidación lipídica en la corteza acompañada de una respuesta antioxidante basada en un aumento en la actividad de la enzima CAT y el consumo de tioles totales. Esta situación pone en evidencia la mayor susceptibilidad a nivel lipofílico de la corteza y la capacidad del tejido cortical para contrarrestar los efectos estresantes generados por la administración del metal.
5. La sobrecarga subcrónica de Fe *in vivo* empleada incrementó significativamente el contenido de Fe en cerebro entero a las 2 h luego de la 6^{ta} dosis, en comparación con los valores obtenidos en animales no tratados. El

estrés oxidativo inicial frente a la administración subcrónica de Fe mostró una cinética que difiere de la observada en el modelo de sobrecarga aguda de Fe, ya que se incrementó el contenido de LIP a partir de las 2 h pi y se mantuvo elevado durante todo el período estudiado. En este caso, se propone que la Ft podría funcionar como proteína de secuestro y almacenamiento activo y paulatino del metal durante el período de tratamiento.

6. El estrés oxidativo desencadenado por la sobrecarga subcrónica de Fe generó el aumento del índice $RL^{\bullet}/\alpha\text{-T}$ al cabo de 2 h de la 6^{ta} dosis, que retornó a valores control luego de 4 h de la 6^{ta} dosis y un aumento del índice A^{\bullet}/AH^{\bullet} y de la velocidad de oxidación de DCFH-DA al cabo de 4 h de la 6^{ta} dosis que retornaron a valores control luego de 6 h de la administración de la última dosis de Fe-dextrán. Por lo tanto, este protocolo de administración de Fe llevó a una cinética diferencial de respuesta oxidativa en los medios hidrofílico y lipofílico.
7. El estrés oxidativo desencadenado por la sobrecarga subcrónica de Fe condujo a un incremento en la actividad de las enzimas SOD y CAT a las 2 y 8 h, respectivamente, luego de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán. El porcentaje de unión a ADN del factor NF- κ B no se modificó en el período estudiado sugiriendo un mecanismo de defensa antioxidante diferente al desencadenado por la sobrecarga aguda de Fe. No se observaron cambios en la integridad nuclear de ADN, pero la integridad del ADN mitocondrial fue afectada. Estos resultados indican una adecuada capacidad del cerebro para limitar el daño debido a la sobrecarga subcrónica de Fe, ya que el daño se restringe al ADN expuesto, en la matriz mitocondrial, a contenidos relevantes de Fe destinados por ejemplo, a la síntesis del hemo.
8. La sobrecarga subcrónica de Fe generó el aumento en el contenido de Fe total a las 2 h luego de la administración de la 6^{ta} dosis en cerebro total que se ve reflejado en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, aunque en este último se mantiene elevado hasta las 6 h. El contenido de Fe aumentó más de 2 veces en las 3 áreas estudiadas, aunque el efecto se observó mayoritariamente en el hipocampo. Se midió en la corteza un incremento significativo en la actividad de CAT. Esta situación acentúa la mayor susceptibilidad de la corteza cerebral observada frente a una situación de

estrés y su capacidad para contrarrestar los efectos estresantes generados por la administración del Fe, en concordancia con los resultados observados en el tratamiento agudo. Sin embargo, estos resultados también dan cuenta de la importancia de individualizar cada área específica del cerebro. La respuesta frente al estrés generado por el Fe está relacionado con la estructura, función y capacidad antioxidante que posee cada área específica y resulta indispensable no desestimar cualquiera de los efectos que pueda producir el tratamiento.

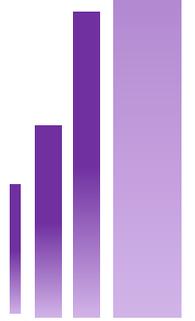
9. Tanto la administración aguda como subcrónica de Fe-dextrán generan una situación de estrés oxidativo en cerebro de rata. La administración simultánea de Fe y LPS en las dosis estudiadas, parece tener un efecto protector ante la producción de A^\bullet en el tratamiento agudo. En cambio, luego del tratamiento subcrónico, no se observó un cambio en el contenido de A^\bullet aunque el contenido de Fe se incrementó en presencia de LPS. El NO generado por el LPS, podría estar quelando el Fe (formación de complejos MNIC y DNIC), favoreciendo la incorporación del metal en forma paulatina y disminuyendo su capacidad catalítica. Sin embargo, son necesarios más estudios al respecto para identificar los mecanismos diferenciales en cada uno de estos tratamientos.

10. La administración subcrónica de Fe en presencia de CPZ generó un efecto protector en el medio lipofílico, representado por una disminución de la velocidad de generación de RL^\bullet , cuando la droga se administra a ratas que fueron tratadas previamente con Fe. Este efecto podría considerarse un efecto hormético. Si bien se requieren otros estudios que avalen esta hipótesis, la posibilidad de encontrar la ventana temporal en que el Fe genera una respuesta antioxidante capaz de contrarrestar el efecto oxidativo de drogas como la CPZ, resulta interesante, no sólo para caracterizar los efectos del Fe a nivel mecanístico, sino también desde un punto de vista clínico.

Tomados en forma integral, este estudio avanza sobre el conocimiento de los fenómenos oxidativos disparados por la administración de Fe en cerebro. Los datos aquí presentados abren posibilidades para diseñar estrategias de tratamientos, una vez que se explote en profundidad las diferencias generadas por los protocolos de administración y la capacidad

endógena de defensa antioxidante como así también los complejos escenarios de señalización gatillados por el estrés oxidativo.

6. Resumen



El objetivo general de esta tesis fue estudiar el efecto de la sobrecarga de Fe en cerebro de rata. Se utilizó un modelo agudo y uno subcrónico de exposición a Fe-dextrán. Se estudiaron los mecanismos vinculados al metabolismo oxidativo y el establecimiento de una posible respuesta hormética generada por la administración de otros agentes estresantes.

La sobrecarga aguda de Fe aumentó el contenido de Fe total en el cerebro de rata a las 6 h de administración de la dosis de Fe, que se vio reflejado en la corteza, el hipocampo y mayoritariamente en el cuerpo estriado. Este incremento llevó a un aumento en cerebro entero en el contenido de LIP y de las ROS que desencadenaron un estado de estrés oxidativo. Aunque se observó una disminución en la integridad de ADN nuclear y mitocondrial, el estrés oxidativo generó el aumento de la activación del factor NF- κ B y en la actividad de la enzima CAT, sin la producción de un daño significativo en cerebro. El incremento en la peroxidación lipídica observado en la corteza, acompañado de una respuesta antioxidante, puso en evidencia la mayor susceptibilidad a nivel lipofílico de este área cerebral y su capacidad para contrarrestar los efectos estresantes generados por la administración del Fe.

La sobrecarga subcrónica de Fe incrementó el contenido de Fe en cerebro entero a las 2 h luego de la 6^{ta} dosis, en comparación con los valores obtenidos en animales no tratados, e incrementó el contenido de LIP a partir de las 2 h pi. Luego de la 6^{ta} dosis de Fe-dextrán, se desencadenó un estado de estrés oxidativo y se observó un incremento en la actividad de SOD y CAT a las 2 y 8 h, respectivamente. El porcentaje de unión del factor NF- κ B al ADN no se modificó en el período estudiado indicando el gatillado de un mecanismo de señalización del sistema de defensa antioxidante diferente al desencadenado por la sobrecarga aguda de Fe. No se observaron cambios en la integridad del ADN nuclear, aunque la integridad del ADN mitocondrial disminuyó. Estos resultados indican una adecuada capacidad del cerebro para limitar el daño debido a la sobrecarga subcrónica de Fe. El aumento en el contenido de Fe total a las 2 h luego de la administración de la 6^{ta} dosis de Fe en cerebro total se vio reflejado en la corteza, el cuerpo estriado y mayoritariamente en el hipocampo. Se midió un incremento significativo en la actividad de CAT en la corteza. Estos resultados acentúan la mayor susceptibilidad de la corteza cerebral frente a una situación de estrés y reiteran la importancia de individualizar cada área específica del cerebro para el estudio de la respuesta frente al estrés generado por el Fe.

La administración simultánea de Fe y LPS en una única dosis, parece tener un efecto protector a nivel hidrofílico (evidenciado por la generación de radical ascorbilo). En cambio, la administración de LPS posterior a un tratamiento subcrónico con Fe, no

da cuenta de ninguna protección adicional en este medio celular a los tiempos estudiados. Sin embargo, el tratamiento subcrónico con Fe en forma previa a la administración de CPZ, produjo un efecto protector a nivel lipofílico, que podría ser considerado como un efecto hormético. Si bien se requieren otros estudios que avalen esta hipótesis, la posibilidad de encontrar la ventana temporal en la cual el Fe genere una respuesta antioxidante capaz de contrarrestar el efecto oxidativo de drogas como la CPZ, resulta interesante no sólo desde un punto de vista clínico sino también para caracterizar los efectos del Fe a nivel mecanístico.



7. Referencias

- Aebi, H.**, 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Akatsu, H., Hori, A., Yamamoto, T., Yoshida, M., Mimuro, M., Hashizume, Y., Tooyama, I., Yezdimer, E.M.**, 2012. Transition metal abnormalities in progressive dementias. *Biometals* 25, 337-350.
- Akyol, O., Herken, H., Uz, E., Fadillioğlu, E., Unal S., Söğüt, S., Ozyurt, H., Savaş, H.A.**, 2002. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 26, 995-1005.
- Andersen, J.K.**, 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10 (Suppl.), S18-S25.
- Anderson, A.C.**, 1994. Iron poisoning in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 6, 289-294.
- Anthérieu, S., Bachour-EI Azzi, P., Dumont, J., Abdel-Razzak, Z., Guguen-Guillouzo, C., Fromenty, B., Robin, M.A., Guillouzo, A.**, 2013. Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology* 57, 1518-1529.
- Arosio, P., Ingrassia, R., Cavadini, P.**, 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 589-599.
- Arosio, P., Levi, S.**, 2010. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 783-792.
- Arroyo, A., Navarro, F., Gómez-Díaz, C., Crane, F.L., Alcain, F.J., Navas, P., Villalba, J.M.**, 2000. Interactions between ascorbyl free radical and coenzyme Q at the plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32,199-209.
- Aslan, M., Ozben, T.**, 2003. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 781-788.
- Atkins, P., de Paula, J.**, 2008. Espectroscopía molecular 3: resonancia magnética. En: Atkins, P., de Paula, J. (Eds.) *Atkins Química Física*, Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Capítulo 15, pp. 549-554. Edición: 8.
- Baldessarini, R.J.**, 1996. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Depression and mania. En: Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G. (Eds.) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, pp. 399-430. Edición: 9.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Brennan, J.M., Vallance, K.L.**, 1999. Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. *Exp. Neurol.* 156, 165-171.
- Bartzokis, G., Sultzer, D., Cummings, J., Holt, L.E., Hance, D.B., Henderson, V.W., Mintz, J.**, 2000. In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 47-53.
- Bayraktar, U.D., Bayraktar, S.**, 2010. Treatment of iron deficiency anemia associated with gastrointestinal tract diseases. *World J. Gastroenterol.* 16, 2720-2725.

- Berg, D., Gerlach, M., Youdim, M.B., Double, K.L., Zecca, L., Riederer, P., Becker, G.,** 2001. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 79, 225-236.
- Bielski, B.H.J.,** 1982. Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses. En: Seib, P.A. y Tolber, B.M. (Eds.), *Chemistry of ascorbic acid radicals*, Amer. Chem. Soc., Washington DC, pp. 81-100.
- Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.S.,** 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57-69.
- Bodannes, R.S., Chan, P.C.,** 1979. Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett.* 105,195-196.
- Boveris, A.,** 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina* 58, 350-356.
- Boveris, A., Cadenas, E.,** 2000. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50, 245-250.
- Boveris, A., Puntarulo, S.,** 1998. Free-radical scavenging actions of natural antioxidants. *Nutr. Res.* 18, 1545-1557.
- Bradley, S.J., Gosriwitana, I., Srichairatanakool, S.,** 1997. Nontransferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br. J. Haematol.* 99, 337-343.
- Brand, A., Schonfeld, E., Isharel, I., Yavin, E.,** 2008. Docosahexaenoic acid-dependent iron accumulation in oligodendroglia cells protects from hydrogen peroxide-induced damage. *J. Neurochem.* 105, 1325-1335.
- Breuer, W., Shvartsman, M., Cabantchik, Z.I.,** 2008. Intracellular labile iron. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 350-354.
- Brumby, P.E., Massey, V.,** 1967. Determination of nonheme iron, total iron and cooper. *Meth. Enzymol.* 10, 463-474.
- Buettner, G.R.,** 1987. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* 3, 259-303.
- Buettner, G.R.,** 1988. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 16, 27-40.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A.,** 1993. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 49-55.
- Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A.,** 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide. *Trends Molec. Med.* 7, 548-554.
- Calabrese, E.J.,** 2002. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat. Res.* 511, 181-189.
- Calabrese, E.J.,** 2004. Hormesis: A revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO Rep.* 5, S37-S40.
-

- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A.**, 2003. Peptides and hormesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 355-405.
- Carlsson, M., Cortes, D., Jepsen, S., Kanstrup, T.**, 2008. Severe iron intoxication treated with exchange transfusion. *Arch. Dis. Child.* 93, 321-322.
- Carmine, T.C., Evans, P., Bruchelt, G.**, 1995. Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. *Cancer Lett.* 94, 219-226.
- Carpenter, W.T., Koenig, J.I.**, 2008. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. *Neuropsychopharmacol.* 33, 2061-2079.
- Chatterjee, I.B., Majumder, A.K., Nandi, B.K., Subramanian, N.**, 1975. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258, 24-47.
- Chen, G., Jing, C.H., Liu, P.P., Ruan, D., Wang, L.**, 2013. Induction of autophagic cell death in the rat brain caused by iron. *Am. J. Med. Sci.* 345, 369-374.
- Chevion, M., Leibowitz, S., Aye, N.N., Novogrodsky, O., Singer, A., Avizemer, O., Bulvik, B., Konijn, A.M., Berenshtein, E.**, 2008. Heart protection by ischemic preconditioning: a novel pathway initiated by iron and mediated by ferritin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 839-845.
- Comar, D., Zarifian, E., Verhas, M., Soussaline, F., Maziere, M., Berger, G., Loo, H., Cuche, H., Kellershohn, C., Deniker, P.**, 1979. Brain distribution and kinetics of ¹¹C-chlorpromazine in schizophrenics: positron emission tomography studies. *Psychiatry Res.* 1, 23-29.
- Combrinck, M., Perry, V., Cunningham, C.**, 2002. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behavior in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112, 7-11.
- Cook, J.D., Skikne, B.S., Baynes, R.D.**, 1994. Iron deficiency: the global perspective. *Adv. Exp. Med. Biol.* 356, 219-228.
- Courderot-Masuyer, C., Lahet, J.J., Verges, B., Brun, J.M., Rochette, L.**, 2000. Ascorbyl free radical release in diabetic patients. *Cell Mol. Biol.* 46, 1397-1401.
- Crichton, R.R., Dexter, D.T., Ward, R.J.**, 2008. Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. En: Linert, W., Kozlowski, H. (Eds.) *Metal ions in Neurological Systems*, pp. 1-16.
- Croll, R.P., Baker, M.W., Khabarova, M., Voronezhskaya, E.E., Sakharov, D.A.**, 1997. Serotonin depletion after prolonged chlorpromazine treatment in a simpler model system. *Gen. Pharmacol.* 29, 91-96.
- Czerniczyniec, A., Karadayian, A.G., Bustamante, J., Cutrera, R.A., Lores-Arnaiz, S.**, 2011. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1428-1436.
- Darbari, D., Loyevsky, M., Gordeuk, V., Kark, J.A., Castro, O., Rana, S.**, 2003. Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. *Blood* 102, 357-364.
-

- Das, M., Das, D. K.**, 2008. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199-203.
- Deryckere, F., Gannon, F.**, 1994. A one-hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* 16, 405.
- Desai, I.**, 1984. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Meth. Enzymol.* 105, 138-146.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., y Sies, H.**, 1991. Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1Suppl), 194S-200S.
- Dixon, S.J, Stockwell, B.R.**, 2014. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* 10, 9-17.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison 3rd, B., Stockwell, B.R.**, 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072.
- Doba, T., Burton, G.W., Ingold, K.U.**, 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 835, 298-303.
- Dominguez, E.A.**, 1995. Long-term infectious complications of liver transplantation. *Semin. Liver Dis.* 15, 133-138.
- Dröge**, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., Cabantchik, Z.I.**, 1997. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* 248, 31-40.
- Espinoza, A., Morales, S., Arredondo, M.**, 2014. Effects of Acute Dietary Iron Overload in Pigs (*Sus scrofa*) with Induced Type 2 Diabetes Mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 342-352.
- Espósito, B.P., Epsztejn, S., Breuer, W., Cabantchik, Z.I.**, 2002. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal. Biochem.* 304, 1-18.
- Farina, M., Silva Avila D., Teixeira da Rocha, J. B., Aschner, M.**, 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem. Internat.* 62, 575-594.
- Forman, H.J.**, 2010. Reactive oxygen species and alpha,beta-unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203, 35-44.
- Frei, B., Lawson, S.**, 2008. Vitamin C and cancer revisited. *PNAS* 105, 11037-11038.
- Fröhlich, E.**, 2013. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* 14(9), 976-988.
-

- Fujiwara, T., Harigae, H.,** 2015. Update on the biology of heme synthesis in erythroid cells. *Rinsho Ketsueki* 56(2), 119-127.
- Galiano Ramos, A.,** 2008. *Vademecum. Med cyclopedia* <http://www.igb.es/cbasicas/farma/farma04/c137.htm>
- Galleano, M., Aimo, L., Puntarulo, S.,** 2002. Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. *Toxicol. Lett.* 133, 193-201.
- Galleano, M., Puntarulo, S.,** 1992. Hepatic chemiluminescence and lipid peroxidation in mild iron overload. *Toxicology* 76, 27-38.
- Galleano, M., Puntarulo, S.,** 1994. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2349-2358.
- Galleano, M., Puntarulo, S.,** 1995. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 321-326.
- Galleano, M., Puntarulo, S.,** 1997. Dietary alpha-tocopherol supplementation on antioxidant defenses after in vivo iron overload in rats. *Toxicology* 124, 73-81.
- Galleano, M., Tapia, G., Puntarulo, S., Varela, P., Videla, L.A., Fernández, V.,** 2011. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci.* 89, 221-228.
- Gey, K.F., Stähelin, H.B., Puska, P., Evans, A.,** 1987. Relationship of plasma level of vitamin C to mortality from ischemic heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 498, 110-123.
- Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C.L., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J.M., Dandona, P.,** 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 2281-2287.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J.,** 2006. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-1505.
- Goodnough, L.T.,** 2012. Iron deficiency syndromes and iron-restricted erythropoiesis (CME). *Transfusion* 52, 1584-1592.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Kortsha, G.X., Brown, G.G., Richardson, R.J.,** 1997. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology* 48, 650-658.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Kortsha, G.X., Brown, G.G., Richardson, R.J.,** 1999. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 20, 239-247.
- Gregory, A., Hayflick, S.J.,** 2011. Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11, 254-261.

Gregory, A., Polster, B.J., Hayflick, S.J., 2009. Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *J. Med. Genet.* 46, 73-80.

Gruber, R., Axmann, S., Schoenberg, M.H., 2005. The influence of oxygenated water on the immune status, liver enzymes, and the generation of oxygen radicals: a prospective, randomised, blinded clinical study. *Clin. Nutr.* 24, 407-414.

Gurusamy, K.S., Nagendran, M., Davidson, B.R., 2014. Methods of preventing bacterial sepsis and wound complications after liver transplantation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No.: CD006660. DOI: 10.1002/14651858.CD006660.pub3.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634-1658.

Halliwell, B., Aruoma, O.I., Mufti, G., 1988. Bleomycin-detectable iron in serum from leukaemic patients before and after chemotherapy. *FEBS Lett.* 241, 202-204.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. En: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, pp. 86-179.

Halonen, P., Mattila, J., Suominen, P., 2003. Iron overload in children who are treated for acute lymphoblastic leukemia estimated by liver siderosis and serum iron parameters. *Pediatrics* 111, 91-96.

Harrison, F.E., May, J.M., 2009. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter (SVCT2). *Free Radic. Biol. Med.* 46, 719-730.

Harrison, P., Neilson, J.R., Marwah, S.S., 1996. Role of nontransferrin bound iron in iron overload and liver dysfunction in long term survivors of acute leukaemia and bone marrow transplantation. *J. Clin. Pathol.* 49, 853-856.

Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161-203.

Heber, U., Miyake, C., Mano, J., Ohno, C., Asada, K., 1996. Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectrometry is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. *Plant Cell Physiol.* 37, 1066-1072.

Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A., 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1456-1462.

Hidalgo, C., Núñez, M.T., 2007. Calcium, iron and neuronal function. *IUBMB Life* 59, 280-285.

Hollenbeak, C.S., Alfrey, E.J., Souba, W.W., 2001. The effect of surgical site infections on outcomes and resource utilization after liver transplantation. *Surgery* 130, 388-395.

Horemans, N., Asard, H., Caubergs, R.J., 1994. The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome b-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiol.* 104, 1455-1458.

- Horowitz, M.P., Greenamyre, J.T.,** 2010. Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J. Alzheimer's Dis.* 20 (Suppl 2), S551-S568.
- Howland, M.A.,** 1996. Risks of parenteral deferoxamine for acute iron poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 34, 491-497.
- Hoyland, D.V., Taylor, A. J.,** 1991. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chem.*, 40, 271-291.
- Jang, D.H., Hoffman, R.S.,** 2011. Heavy metal chelation in neurotoxic exposures. *Neurol. Clin.* 29, 607-622.
- Jellinger, K.A.,** 1999. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14, 115-140.
- Jiang, H., Song, N., Wang, J., Ren, L.Y., Xie, J.X.,** 2007. Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurochem. Int.* 51, 32-36.
- Johnstone, D., Milward, E.A.,** 2010. Molecular genetic approaches to understanding the roles and regulation of iron in brain health and disease. *J. Neurochem.* 113, 1387-1402.
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R.,** 1994. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* 59, 1-4.
- Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I.,** 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1037-1046.
- Ke, Y., Qian, Z.M.,** 2007. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog. Neurobiol.* 83, 149-173.
- Kell, D.B.,** 2010. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch. Toxicol.* 84, 825-889.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S.,** 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89-116.
- Khan, F. A., Fisher, M. A., Khakoo, R. A.,** 2007. Association of hemochromatosis with infectious diseases: Expanding spectrum. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 482-487.
- Konigsberg Fainstein M.,** 2008. Sección I: química de los radicales libres y Sección II: el dióxígeno y sus especies reactivas. En: Martínez Moreno, M. (Ed.) Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas, Editorial El Manual Moderno, México pp. 3-45.
- Kotake, Y., Tanigawa, T., Tanigawa, M., Ueno, I., Randel Allen, D., Lai, C.S.,** 1996. Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron dithiocarbamate complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, 362-368.
-

- Kramarenko, G.G., Hummel, S.G., Martin, S.M., Buettner, G.R.,** 2006. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* 82, 1634-1637.
- Kruszewski, M.,** 2003. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* 531, 81-92.
- Kumar, H., Lim, H.W., More, S.V., Kim, B.W., Koppula, S., Kim, I.S., Choi, D.K.,** 2012. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10478-10504.
- Kutnink, M.A., Hawkes, W.C., Schaus, E.E., Omaye, S.T.,** 1987. An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. *Anal. Biochem.* 166, 424-430.
- Kwok, J.B.,** 2010. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics* 2, 671-682.
- Lander, H.M.,** 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11, 118-124.
- Laurie, S.H., Tancock, N.P., McGrath, S.P., Sanders, J.,** 1991. Influence of complexation on the uptake by plants of iron, manganese, copper and zinc. I. Effect of EDTA in a multimetal and computer simulation study. *Exp. Bot.* 42, 509-513.
- Legrand-Poels, S., Vaira, D., Pincemail, J., van de Vorst, A., Piette, J.,** 1990. Activation of human immunodeficiency virus type 1 by oxidative stress. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 1389-1397.
- Levi, S., Rovida, E.,** 2009. The role of iron in mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 629-636.
- Li, C., Wen, T.F., Mi, K.,** 2012. Analysis of infections first 3-month after living donor liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 18, 1975-1980.
- Li, H.J., Zhang, Y.J., Zhou, L., Han, F., Wang, M.Y., Xue, M.Q., Qi, Z.,** 2014. Chlorpromazine confers neuroprotection against brain ischemia by activating BK(Ca) channel. *Eur. J. Pharmacol.* 735C, 38-43.
- Lockman, J.A., Geldenhuys, W.J., Bohn, K.A., Desilva, S.F., Allen, D.D., Van der Schyf, C.J.,** 2012. Differential effect of nimodipine in attenuating iron-induced toxicity in brain -and blood-brain barrier-associated cell types. *Neurochem. Res.* 37, 134-142.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lutz, K., von Komorowski, G., Dürken, M.,** 2008. Myocardial iron overload in transfusion-dependent pediatric patients with acute leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 51, 691-693.
- Maaroufi, K., Ammari, M., Jeljeli, M., Roy, V., Sakly, M., Abdelmelek, H.,** 2009. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate. *Physiol. Behav.* 96, 343-349.
-

- Maaroufi, K., Save, E., Poucet Sakly, B., Abdelmelek, H., Had-Aissouni, L., 2011.** Oxidative stress and prevention of the adaptive response to chronic iron overload in the brain of young adult rats exposed to a 150 kilohertz electromagnetic field. *Neuroscience* 186, 39-47.
- Magdalan, J., Zawadzki, M., Sozanski, T., 2011.** Fulminant hepatic failure in woman with iron and non-steroidal anti-inflammatory drug intoxication. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1106-1111.
- Makeshova, A.B., Levina, A.A., Mamukova, Iul., 2009.** Regulatory mechanisms of iron metabolism in patients with acute leukemia. *Ter. Arkh.* 81, 16-20.
- Malanga, G., Oстера, J.M., Puntarulo, S., 2015.** Assessment of oxidative balance in the lipo- and hydro-philic cellular environment in biological systems. En: Catalá, A. (Ed.) *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation*, Nova Science Publishers, pp. 43-60.
- Mao, L., Franke, J., 2013.** Hormesis in Aging and Neurodegeneration. A Prodigy Awaiting Dissection. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13109-13128.
- Marras, C., Goldman, S.M., 2011.** Genetics meets environment: evaluating gene-environment interactions in neurologic diseases. *Semin. Neurol.* 31, 553-561.
- Martell, A.E., 1982.** Chelates of ascorbic acid. Formation and catalytic properties. En: Seib, P.A., Tolbert, B.M. (Eds.) *Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses*. *Advances in Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, pp 152-156.
- Martín-Romero, F.J., Gutiérrez-Martín, Y., Henao, F., Gutiérrez-Merino, C., 2002.** The NADH oxidase activity of the plasma membrane of synaptosomes is a major source of superoxide anion. *J. Neurochem.* 82, 604-614.
- Matsuo, Y., Kihara, T., Ikeda, M., Ninomiya, M., Onodera, H., Kogure, K., 1995.** Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 941-947.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 2014.** Superoxide dismutases: you've come a long way, baby. *Antioxid. Redox Signal.* 20(10), 1548-1549. doi: 10.1089/ars.2013.5547. Epub 2013 Sep 11. PubMed PMID: 23924157.
- McNaughton, N.C.L., Green, P.J., Randall, A.D., 2001.** Inhibition of human alpha (1E) subunit-mediated Ca²⁺ channels by the antipsychotic agent chlorpromazine. *Acta Physiol. Scand.* 173, 401-408.
- McNeill, A., Birchall, D., Hayflick, S.J., Gregory, A., Schenk, J.F., Zimmerman, E.A., Shang, H., Miyajima, H., Chinnery, P.F., 2008.** T₂ and FSE MRI distinguishes four subtypes of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Neurology* 70, 1614-1619.
- Mesquita, S.D., Ferreira, A.C., Sousa, J.C., Santos, N.C., Correia-Neves, M., Sousa, N., Palha, J.A., Marques, F., 2012.** Modulation of iron metabolism in aging and in Alzheimer's disease: relevance of the choroid plexus. *Front. Cell. Neurosci.* 6, 25, 1-10.

- Metzler, B., Jehle, J., Theurl, I., Ludwiczek, S., Obrist, P., Pachinger, O., Weiss, G.,** 2007. Short term protective effects of iron in a murine model of ischemia/reperfusion. *BioMetals* 20, 205-215.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G.,** 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61, 4197-4220.
- Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Mascianà, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., Vecchio, F.M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C.P., Grieco, A.,** 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1877-1887.
- Minakata, K., Suzuki, O., Saito, S., Harada, N.,** 1993. Ascorbate radical levels in human sera and rat plasma intoxicated with paraquat and diquat. *Arch. Toxicol.* 67, 126-130.
- Minotti, G., Aust, S.D.,** 1992. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 27, 219-226.
- Montgomery, S.L., Bowers, W.J.,** 2012. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7, 42-59.
- Moos, T., Nielsen, T.R., Skjørringe, T., Morgan, E.H.,** 2007. Iron trafficking inside the brain. *J. Neurochem.* 103, 1730-1740.
- Morales, P., Vargas, R., Videla, L.A., Fernández, V.,** 2014. Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Food Funct.* 2, 243-250.
- Morley, J.E., Farr, S.A., Kumar, V.B., Banks, W.A.,** 2002. Alzheimer's disease through the eye of a mouse. Acceptance lecture for the 2001 Gayle A. Olson and Richard D. Olson prize. *Peptides* 23, 589-599.
- Moon, M.S., McDevitt, E.I., Zhu, J., Stanley, B., Krzeminskym, J., Amin, S., Aliaga, C., Miller, T.G., Isom, H.C.,** 2012. Elevated hepatic iron activates NF-E2-related factor 2-regulated pathway in a dietary iron overload mouse model. *Toxicol. Sci.* 129, 74-85.
- Muley, V.A., Ghadage, D.P., Bhore, A.V.,** 2015. Bacteriological profile of neonatal septicemia in a tertiary care hospital from Western India. *J. Global Infect Dis.* 7, 75-7.
- Muñoz, J.P., Chiong, M., García, L., Troncoso, R., Toro, B., Pedrozo, A., Díaz-Elizondo, J., Salas, D., Parra, V., Núñez, M.T., Hidalgo, C., Lavandero, S.,** 2010. Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 526-534.
- Nakagawa, K., Kanno, H., Miura, Y.,** 1997. Detection and analyses of ascorbyl radical in cerebrospinal fluid and serum of acute lymphoblastic leukemia. *Anal. Biochem.* 254, 31-35.
- Nath, B., Szabo, G.,** 2009. Alcohol-induced modulation of signaling pathways in liver parenchymal and nonparenchymal cells: implications for immunity. *Semin. Liver Dis.* 29, 166-177.
-

- Nedergaard, O.A., Abrahamsen, J.,** 1988. Effect of chlorpromazine on sympathetic neuroeffector transmission in the rabbit isolated pulmonary artery and aorta. *Br. J. Pharmacol.* 93, 23-34.
- Nishikimi, M.,** 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 463-468.
- Nishino, H., Ito, A.,** 1986. Subcellular distribution of OM cytochrome b-mediated NADH-semidehydroascorbate reductase activity in rat liver. *J. Biochem.* 100, 1523-1531.
- Nunn, J.F.,** 1985. Oxygen - friend and foe. *J. R. Soc. Med.* 78, 618-622.
- Núñez, M.T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., Salazar, J.,** 2012. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* 25, 761-776.
- Olcay, L., Hazirovan, T., Yildirmak, Y., Erdemli, E., Terzi, Y.K., Arda, K., Oztürkmen, S., Akyay, A., Kaymak-Cihan, M., Biçakçı, Z., Bal, C.,** 2014. Biochemical, radiologic, ultrastructural, and genetic evaluation of iron overload in acute leukemia and iron-chelation therapy. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 36, 281-92.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.,** 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922.
- Otręba, M., Wrześniok, D., Beberok, A., Rok, J., Buszman, E.,** 2015. Melanogenesis and antioxidant defense system in normal human melanocytes cultured in the presence of chlorpromazine. *Toxicol. In Vitro* 29, 221-227.
- Owen, J.B., Butterfield, D.A.,** 2010. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Meth. Mol. Biol.* 648, 269-277.
- Packer, J.E., Slater, T.F., Wilson, R.L.,** 1979. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738.
- Papanastasiou, D.A., Vayenas, D.V., Vassilopoulos, A., Repanti, M.,** 2000. Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs. *Pathol. Res. Pract.* 196, 47-54.
- Park, S.Y., Jin, M.L., Kim, Y.H., Kim, Y., Lee, S.J.,** 2012. Anti-inflammatory effects of aromatic-turmerone through blocking of NF-kappaB, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in amyloid beta-stimulated microglia. *Int. Immunopharmacol.* 14,13-20.
- Pedersen J.Z., De Maria, F., Turella, P., Federici, G., Mattei, M., Fabrini, R., Dawood, K.F., Massimi, M., Caccuri, A.M., Ricci, G.,** 2007. Glutathione transferases sequester toxic dinitrosyl-iron complexes in cells. A protection mechanism against excess nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 282, 6364-6371.
- Peralta, C., Hotter, G., Closa, D., Gelpí, E., Bulbena, O., Roselló-Catafau, J.,** 1997. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25, 934-937.
- Pérez, G., Vittori, D., Pregi, N., Garbossa, G., Nesse, A.,** 2005. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Hematología* 39, 301-314.

- Petrák, J.V., Vyoral, D.**, 2001. Detection of iron-containing proteins contributing to the cellular labile iron pool by a native electrophoresis metal blotting technique. *J. Inorg. Biochem.* 86, 669-675.
- Pietrangelo A.**, 2003. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol* 30, 121-129.
- Pietri, S., Culcasi, M., Albat, B., Albérici, G., Menasché, P.**, 1994. Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution, Celsior. A hemodynamic and electron spin resonance study. *Transplantation* 58, 739-742.
- Pietronigro, D.D., Hovsepian, M., Demopoulos, H.B., Flamm, E.S.**, 1985. Reductive metabolism of ascorbic acid in the central nervous system. *Brain Res.* 333,161-164.
- Pillai, A., Parikh, V., Terry, A.V. Jr., Mahadik, S.P.**, 2007. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 41, 372-386.
- Piloni, N., Puntarulo, S.**, 2010. Iron role in the oxidative metabolism of animal and plant cells. Effect of iron overload. En: Gimenez, M. S. (Ed.), *Metals in Biology Systems*, Research Signpost, Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, pp. 29-50.
- Prohaska, R., Sibon, O.C., Rudnicki, D.D., Danek, A., Hayflick, S.J., Verhaag, E.M., Vonk, J.J., Margolis, R.L., Walker, R.H.**, 2012. Brain, blood, and iron: perspectives on the roles of erythrocytes and iron in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 46, 607-624.
- Ramos, P., Santos, A., Pinto, N.R., Mendes, R., Magalhães, T., Almeida, A.**, 2014. Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem. Med. Biol.* 28(1), 13-17.
- Rey, A. I., Hopia, A., Kivikari, R., Kahkonen, M.**, 2005. Use of natural food/plant extracts: Cloudberry (*Rubuschamaemorus*), beetroot (*Beta vulgaris* "Vulgaris") or willow herb (*Epilobiumangustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *Lebensm. Wiss. Technol.* 38, 363-370.
- Rice, D., Barone, Jr. S.**, 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animals models. *Environ. Health Perspect.* 108, 511-533.
- Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A.**, 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9, 517-524.
- Roginsky, V.A., Stegmann, H.B.**, 1994. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 93-103.
- Robello, E., Galatro, A., Puntarulo, S.**, 2007. Iron role in oxidative metabolism of soybean axes upon growth: effect of iron overload. *Plant Sci.* 172, 939-947.
- Robello E., Piloni N., Puntarulo S.**, 2012. γ - Irradiation effect on Fe content in developing neural precursor cells requires mother-fetus interaction. *Res. Trends Curr. Top. Toxicol.* 8, 82-93.
-

Romanque, P., Díaz, A., Tapia, G., Uribe-Echevarría, S., Videla, L.A., Fernandez, V., 2010. Delayed ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury in vivo. *Transplant Proc.* 42,1569-1575.

Rooney, M.L., 1983. Ascorbic acid as a photooxidation inhibitor. *Photochem. Photobiol.* 38, 619-621.

Rosas, H.D., Chen, Y.I., Doros, G., Salat, D.H., Chen, N.K., Kwong, K.K., Bush, A., Fox, J., Hersch, S.M., 2012. Alterations in brain transition metals in Huntington disease: an evolving and intricate story. *Arch. Neurol.* 69, 887-893.

Rosendorff, C., Beeri, M.S., Silverman, J.M., 2007. Cardiovascular risk factors for Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* 16, 143-149.

Rousseau, I., Galleano, M., Puntarulo, S., 2011. Fe allocation in liver during early stages of endotoxemia in Fe-overload rats. *Toxicol. Pathol.* 39, 1075-1083.

Rukmini, M. S., D'Souza, B., D'Souza, V., 2004. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian J. Clin. Biochem.* 19, 114-118.

Sader, A.A., Barbieri-Neto, J., Sader, S.L., Mazzetto, S.A., Alves Jr., P., Vanni, J.C., 2002. The protective action of chlorpromazine on the spinal cord of rabbits submitted to ischemia and reperfusion is dose-dependent. *J. Cardiovasc. Surg.* 43, 827-831.

Sadrzadeh, S.M., Eaton, J.W., 1988. Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *J. Clin. Invest.* 82, 1510-1515.

Santos, J.H., Meyer, J.N., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., 2006. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Meth. Molec. Biol.* 314,183-199.

Santos, R.M., Lourenco, C.F., Ledo, A., Barbosa, R.M., Laranjinha, J., 2012. Nitric oxide inactivation mechanisms in the brain: role in bioenergetics and neurodegeneration. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 1-13.

Schipper, H.M., 2012. Neurodegeneration with brain iron accumulation—clinical syndromes and neuroimaging. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 350-360.

Schmedes, A., Holmes, G., 1989. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 813-817.

Schneider, S.A., Hardy, J., Bhatia, K.P., 2012. Syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA): an update on clinical presentations, histological and genetic underpinnings, and treatment considerations. *Mov. Disord.* 27, 42-53.

Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258.

Schumann, K., 2001. Safety aspects of iron in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 91-101.

- Shamberger, R. J., Shamberger, B.A., Willis, C. E.**, 1977. Malonaldehyde content of food. *J. Nutr.* 107, 1404-1409.
- Sebastiani, G., Pantopoulos, K.**, 2011. Disorders associated with systemic or local iron overload: from pathophysiology to clinical practice. *Metallomics* 3, 971-986.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H.**, 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analyt. Bioc.* 25, 192-205.
- Sharma, M.K., Buettner, G.R.**, 1993. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 649-653.
- Shen, W.W.**, 1999. A history of antipsychotic drug development. *Compr. Psych.* 40, 407-414.
- Sheng, J.G., Bora, S.H., Xu, G., Borchelt, D.R., Price, D.L., Koliatsos, V.E.**, 2003. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14,133-145.
- Sian-Hulsmann, J., Mandel, S., Youdim, M.B., Riederer, P.**, 2011. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 118, 939-957.
- Siew, S.S., Kauppinen, T., Kyyronen, P., Heikkila, P., Pukkala, E.**, 2008. Exposure to iron and welding fumes and the risk of lung cancer. *Scand. J. Work Environ. Health* 34, 444-450.
- Silverstein, S.B., Rodgers, G.M.**, 2004. Parenteral iron therapy options. *Am. J. Hematol.* 76, 74-78.
- Simic, M.G.**, 1991. Antioxidants compounds: an overview. En: Davies, K.J.A. (Ed.) *Oxidative damage and Repair*, Pergamon Press, Oxford, pp. 47-56.
- Simontacchi, M., Buet, A., Lamattina, L., Puntarulo, S.**, 2011. Exposure to nitric oxide increases the nitrosyl-iron complexes content in sorghum embryonic axes. *Plant Sci.* 183, 159-166.
- Simontacchi, M., Buet, A., Puntarulo, S.**, 2011 b. The use of electron paramagnetic resonance (EPR) in the study of oxidative damage to lipids in plants. En Catalá, A. (Ed.) *Lipid Peroxidation: Biological Implications*, Research Signpost, Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, pp. 141-160.
- Singh, N., Sun, H. Y.**, 2008. Iron overload and unique susceptibility of liver transplant recipients to disseminated disease due to opportunistic pathogens. *Liver Transpl.* 14, 1249-1255.
- Sipahi, T., Karakurt, C., Bakirtas, A., Tavil, B.**, 2002. Acute iron ingestion. *Indian J. Pediatr.* 69, 947-949.
- Skaper, S.D, Giusti, P., Facci, L.**, 2012. Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *FASEB J.* 26, 3103-3117.
- Smirnoff, N.**, 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3, 229-235.
-

- Southam, C.M., Ehrlich, J.**, 1943. Effects of extract of western red cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33, 517-524.
- Stone, J.M., Pilowsky, L.S.**, 2007. Novel targets for drugs in schizophrenia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6, 265-272.
- Swartz H.M., Swartz, S.M.**, 1983. Biochemical and biophysical applications of electron spin resonance. *Meth. Biochem. Anal.* 29, 207-323.
- Szabo, G., Velayudham, A., Romics, L., Mandrekar, P.**, 2005. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29, 140S-145S.
- Szabo, G., Bala, S.**, 2010. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J. Gastroenterol.* 16, 1321-1329.
- Tadolini, B., Hakim, G.**, 1996. The mechanism of iron (III) stimulation of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 25, 221-227.
- Tappel, A.L.**, 1974. Selenium-glutathione peroxidase and vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 960-965.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B.**, 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R431-R444.
- Terajima, H., Enders, G., Thiaener, A., Hammer, C., Kondo, T., Thiery, J., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y., Messmer, K.**, 2000. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 31, 407-415.
- Thameen Dheen, S., Kaur, C., Ling, E.A.**, 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189-1197.
- Tilg, H., Moschen, A.R., Kaser, A.**, 2009. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology* 136, 1476-1483.
- Tonks, N.K.**, 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signalling. *Cell* 121, 667-670.
- Tseng, Y.J., Chen, C.H., Chen, W.K., Dong-Zong, H.**, 2011. Hand warmer related corrosive injury. *Clin. Toxicol. (Phila)* 49, 870-871.
- Tsuneizumi, T., Babb, S.M., Cohen, B.M.**, 1992. Drug distribution between blood and brain as a determinant of antipsychotic drug effects. *Biol. Psych.* 32, 817-824.
- Vanin A.F., Serezhenkov, V.A., Mikoyan, V.D., Genkin, M.V.**, 1998. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide* 2, 224-234.
- Vera, A., Contreras, F., Guevara, F.**, 2011. Incidence and risk factors for infections after liver transplant: single-center experience at the University Hospital Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia. *Transpl. Infect. Dis.* 3, 608-615.
-

- Vergely, C., Maupoil, V., Clermont, G., Bril, A., Rochette, L.,** 2003. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 420, 209-216.
- Videla L. A.,** 2010. Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: association with oxidative stress. *IUBMB Life* 62, 460-466.
- Wade, J.J., Rolando, N., Hayllar, K.,** 1995. Bacterial and fungal infections after liver transplantation: an analysis of 284 patients. *Hepatology* 21, 1328-1336.
- Wallace, D.C.,** 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- Wang G.,** 2012. Hormesis, cell death, and regenerative medicine for neurodegenerative diseases. *Dose Resp.* 11, 238-254.
- Wang, B., Pace, R. D., Dessai, A. P., Bovell-Benjamin, A., Philips, B.,** 2002. Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *J. Food Sci.* 67, 2833-2836.
- Weinberg, E. D.,** 2000. Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes Infect.* 2, 85-89.
- Wills, E.J., Epstein, M.A.,** 1966. Subcellular changes in surface adenosine triphosphatase activity of human liver in extrahepatic obstructive jaundice. *Am. J. Pathol.* 49, 605-635.
- Woodmansee, A.N., Imlay, J.A.,** 2002. Quantitation of intracellular free iron by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Meth. Enzymol.* 349,3-9.
- Wu, J., Ding, T., Sun, J.,** 2013. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus. *Neurotoxicology* 34, 243-253.
- Wu, J., Song, R., Song, W., Li, Y., Zhang, Q., Chen, Y., Fu, Y., Fang, W., Wang, J., Zhong, Z., Ling, H., Zhang, L., Zhang, F.,** 2011. Chlorpromazine protects against apoptosis induced by exogenous stimuli in the developing rat brain. *PLoS One* 6(7), e21966. doi:10.1371/journal.pone.0021966.
- Xaio, H., Banks, W.A., Niehoff, M.L., Morley, J.E.,** 2001. Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res.* 896, 36-42.
- Yu, S., Feng, Y., Shen, Z., Li, M.,** 2011. Diet supplementation with iron augments brain oxidative stress in a rat model of psychological stress. *Nutrition* 27, 1048-1052.
- Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C.,** 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1527-1547.
- Zhang, Y., Chen, Jim., Wu, J., Chalson, H., Merigan, L., Mitchell, A.,** 2013. Probiotic use in preventing postoperative infection in liver transplant patients. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2, 142-147.
-

