

Preacondicionamiento con hierro: efecto sobre la respuesta oxidativa en cerebro de ratas

Iron preconditioning: effect on the oxidative response in rat brain

M. Hernando^{1,2}, O. Iodice¹ y C.O. Cervino¹

¹Instituto de Fisiología y Neurociencias (IFiNe-SeCyT), Universidad de Morón. Buenos Aires, Argentina.

²Depto. Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. Buenos Aires, Argentina.

Manuscrito recibido: 29 de diciembre de 2018; aceptado para publicación: 14 de mayo de 2019

Contacto: Dr. Claudio O. Cervino.

Instituto de Fisiología y Neurociencias (IFiNe-SeCyT), Universidad de Morón. Machado 914, (1708) Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina. E-mail: ccervino@unimoron.edu.ar

Resumen

A pesar de que el hierro (Fe) es esencial para la vida, el exceso es tóxico debido a su habilidad para catalizar reacciones productoras de radicales libres (ROS). El concepto de hormesis explora la posible alternativa de que aumentos moderados en la concentración de ROS en un intervalo definido resulten capaces de generar respuestas citoprotectivas, que podrían proteger los órganos de los efectos dañinos de los subsecuentes eventos deletéreos. La hipótesis de trabajo plantea que el preacondicionamiento con dosis no-tóxicas de Fe (PAFe) es capaz de disparar una respuesta que conduce a disminuir los efectos oxidativos y nitrosativos. El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar el mecanismo de PAFe, como un disparador oxidativo que condiciona la respuesta celular frente a situaciones de estrés. El modelo de PAFe en ratas se realizó mediante la administración *i.p.* de 50 mg Fe-dextrán/kg cada 48 h durante 10 días. El contenido de Fe, TBARS y tioles totales fueron determinados espectrofotométricamente. El contenido de antioxidantes liposolubles (α -tocoferol y β -carotenos) se evaluó por HPLC. El contenido total de Fe en cerebro de rata mostró un incremento significativo 2 h posadministración de la sexta dosis, coincidente con una disminución significativa de α -tocoferol, indicando un consumo de antioxidantes. En TBARS no se encontraron diferencias significativas con los controles. El contenido de β -caroteno fue prácticamente nulo y sin modificaciones por el suministro de Fe. También se registró un aumento significativo de tioles totales a 6 h. La PAFe favoreció el asentamiento de un estrés oxidativo inicial, tanto en los compartimentos hidrófilos como lipófilos, resultando en una protección celular evidenciada por la regulación positiva de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Considerando que el Fe tiene una activa participación en la catálisis de la generación de ROS, se puede concluir preliminarmente que el PAFe podría evitar daños neurológicos debido a un consumo de antioxidantes liposolubles, en particular α -tocoferol.

Palabras clave: estrés oxidativo, hierro, antioxidantes, preacondicionamiento con Fe, sobrecarga aguda.

Abstract

Although iron (Fe) is essential for life, excess is toxic due to its ability to catalyze free radical species (e.g. ROS). The concept of hormesis explores the possible alternative that moderate increases in ROS concentration in a defined

interval, are able to generating cytoprotective responses, which could protect the organs from the harmful effects of subsequent deleterious events. The working hypothesis proposes that pre-conditioning with non-toxic doses of Fe (PAFe) is able to trigger a response that leads to decrease oxidative and nitrosative effects. The objective of this study is to identify and characterize the PAFe mechanism, as an oxidative trigger that conditions the cellular response to stress situations. The PAFe model in rats was performed by i.p. administration of 50 mg Fe-dextran/kg every 48 h for 10 days. The content of Fe, TBARS and total thiols were determined spectrophotometrically. The content of lipid-soluble antioxidants (α -tocopherol and β -carotenes) was evaluated by HPLC. The total Fe content in rat brain showed a significant increase 2 h post-administration of the sixth dose, coinciding with a significant decrease in α -tocopherol and indicating that there was a consumption of the antioxidant at that time. In TBARS, no significant differences were found with control treatment. The β -carotene content was very low and unchanged by the Fe supply. There was also a significant increase in total thiols at 6 hours. The PAFe favored the establishment of an initial oxidative stress, both in both hydrophilic and lipophilic compartments, resulting in a cellular protection evidenced by the positive regulation of non-enzymatic antioxidants. Considering that Fe has an active participation in the catalysis of ROS generation, it can be preliminarily concluded that PAFe could prevent neurological damage due to a consumption of lipid-soluble antioxidants, in particular α -tocopherol.

Key words: oxidative stress, iron, antioxidants, pre-conditioning with Fe, acute overload.

Introducción

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para todos los organismos, dado que funciona como cofactor de enzimas que catalizan reacciones redox (Hernando *et al.*, 2019). Está presente en la dieta tanto en forma de compuestos hemo, como de Fe no hemínico. Agentes complejantes presentes naturalmente en la dieta, como azúcares, aminoácidos, ácido ascórbico y glicoproteínas pueden formar complejos

con el Fe, manteniéndolo en una forma soluble y favoreciendo su absorción. En cambio, los fitatos, fosfatos, carbonatos, oxalatos, bicarbonatos, los componentes del té y la fibra dietaria unen el Fe formando complejos relativamente insolubles y resultan en una disminución de la absorción intestinal (Searle *et al.*, 1987).

El Fe en el organismo se encuentra formando parte de dos compartimentos. El primero es funcional, formado por numerosos compuestos, entre los que se incluyen la hemoglobina, la mioglobina y las enzimas que requieren Fe como cofactor o como grupo prostético, ya sea en forma iónica o como grupo hemo. El segundo compartimento es de depósito, constituido por la ferritina (FT) y la hemosiderina, que constituyen las reservas corporales de este metal (Forrellat *et al.*, 2000).

El Fe es transportado en sangre unido a proteínas específicas: transferrina y lactoferrina (Ponka *et al.*, 1998). A través de procesos mediados por receptores específicos se incorpora a la célula, donde se almacena formando un complejo estable con la FT (Ferrari *et al.*, 1992). La FT juega un papel previniendo la toxicidad del Fe por su habilidad de secuestrar, almacenar y liberar varios miles de átomos de Fe en su cavidad central en una forma soluble, no tóxica y biodisponible (Lobreaux *et al.*, 1993). La síntesis de FT es estimulada durante el desarrollo, la diferenciación celular (Kakhlon *et al.*, 2001), la inflamación y por alteraciones en el contenido de Fe y de óxido nítrico (Kim y Ponka, 2002), por hormonas y citoquinas (Harrison y Arosio, 1996).

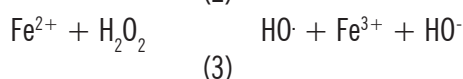
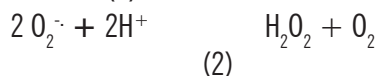
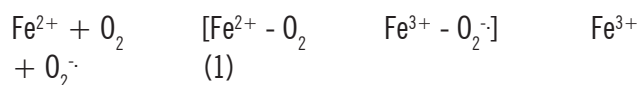
El mayor mecanismo para la regulación y homeostasis del Fe se establece por control postranscripcional de los receptores mRNAs de FT y transferrina, los cuales son reconocidos por dos proteínas reguladoras de Fe (IRP-1 y IRP-2) que modulan su translación y estabilidad, respectivamente. Las IRPs pueden regular mRNAs por otras enzimas relacionadas con la utilización del Fe (Cairo y Pietrangelo, 2000).

La “sobrecarga de hierro” incluye un abanico de situaciones clínicas de muy diversa fisiopatología y cuadros clínicos en los que la sobrecarga puede ser tanto sistémica como localizada. Entre las sistémicas se encuentran las primarias –por defectos en la síntesis de proteínas reguladoras del metabolismo del hierro, como las hemocromatosis o la enfermedad por ferroportina, entre otras causas, y las secundarias, ocasionadas por transfusiones múltiples,

anemias con eritropoyesis inefectiva, etc. (Chiappe, 2017; Hernando *et al.*, 2019).

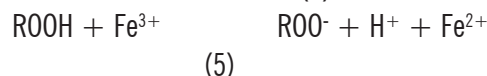
En la actualidad, los casos de sobrecarga de Fe están incrementándose, especialmente en países donde el Fe hemínico es libremente consumido y donde existe una variedad de prácticas culturales que favorecen la sobreadquisición de Fe inorgánico (Puntarulo, 2005). En Estados Unidos el número de personas que adquiere Fe en exceso es estimado en 30 millones (Weinberg, 1990).

El estrés oxidativo mediado por Fe ha sido clásicamente vinculado a muerte celular por apoptosis y más recientemente a ferropoptosis, que representa una forma de muerte celular no-apoptótica dependiente de Fe. Diferentes protocolos de tratamiento con Fe en ratas, suplementado en la dieta o en forma parenteral, han sido determinantes de distintos perfiles en el contenido de Fe en los distintos tejidos (Piloni y Puntarulo, 2010; Piloni *et al.*, 2013 y 2017). El Fe contiene electrones desapareados y puede ser considerado como un radical (Halliwell y Gutteridge, 1990). La oxidación de Fe^{2+} conduce, a través de la pérdida de un electrón que es recibido por el O_2 , a la formación de anión superóxido (O_2^-). La generación de O_2^- da origen a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede reaccionar con Fe^{2+} y producir radical hidroxilo ($\bullet OH$) (reacciones 1 a 3). De esta forma el Fe resulta un catalizador adecuado de la producción de intermediarios de la reducción parcial del O_2 de alta reactividad, llamados especies reactivas del oxígeno (ROS).



Entre las reacciones químicas Fe-dependientes, aquellas relacionadas con la peroxidación de lípidos han sido ampliamente estudiadas. Como especies responsables de la iniciación de las reacciones en cadena se han propuesto tanto al $\bullet OH$ (Halliwell y Gutteridge, 1990) como al Fe-oxo-especies, tales como el ión perferrilo (Sugioka *et al.*, 1983), el ión ferrilo (FeO^{2+}) (Koppenol, 1985) o el complejo $Fe^{2+}-O_2-Fe^{3+}$ (Bucher *et al.*, 1983). En la etapa de propagación

el Fe interviene incrementando la velocidad de oxidación de lípidos a través de la conversión de los hidroperóxidos lipídicos ($ROOH$) en radicales alcoxilos ($RO\cdot$) o peroxilos ($ROO\cdot$) (reacciones 4 y 5) (Gutteridge, 1988).



Dada la toxicidad de las especies activas del O_2 , las células requieren sistemas de eliminación de gran eficiencia para mantener bajas concentraciones en estado estacionario y así limitar el posible daño celular. Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparada a la de los sustratos oxidables, disminuye o previene de una manera significativa la oxidación de dicho sustrato. Se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos (Gutteridge y Halliwell, 2000). Dentro de los primeros cabe mencionar la actividad de: (a) la enzima superóxido dismutasa (SOD); (b) la enzima catalasa (CAT), que es un catalizador ampliamente distribuido en las células de los mamíferos, (c) la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y (d) la enzima glutatión reductasa (GR). Los antioxidantes no-enzimáticos pueden a su vez clasificarse en liposolubles e hidrosolubles. Dentro del grupo de los liposolubles se incluyen: (a) la vitamina E, término que se aplica a una familia de compuestos estructuralmente relacionados: los tocoferoles; (b) los pigmentos carotenoides, incluyendo el β -caroteno y (c) los ubiquinoles. Dentro de los antioxidantes hidrosolubles cabe mencionar al glutatión (GSH), tripéptido de síntesis endógena en animales, y el ácido ascórbico (vitamina C) (Halliwell y Gutteridge, 1989). La melatonina extrapineal es considerada un antioxidante celular con propiedades lipo e hidrosolubles (Reiter *et al.*, 2003; Cervino y Hernando, 2015).

El tejido cerebral puede ser más susceptible que otros órganos a daño por ROS considerando que: (1) las neuronas poseen una gran cantidad de mitocondrias y esto se asocia con un alto metabolismo aeróbico con gran disponibilidad de oxígeno; (2) bajas concentraciones de algunos antioxidantes enzimáticos; (3) alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (con mayor reactividad con las ROS) y (4) un alto contenido de Fe. Todas estas características pueden

hacer que el cerebro sea particularmente susceptible a degeneración producida por especies reactivas del oxígeno (Halliwell, 2006). En condiciones fisiológicas, el Fe neuronal no es reactivo a pesar de su alto nivel, probablemente por su absorción, transporte y almacenamiento, sin embargo, cuando se alcanza un exceso de Fe se induce el estrés oxidativo (Floyd y Carney, 1992). Dicha situación de estrés ha sido asociada a desórdenes neurodegenerativos y muerte neuronal, probablemente por defectos en los mecanismos de defensa antioxidante (Berg y Youdim, 2006; Ke y Qian, 2007). El metabolismo anormal del Fe en humanos puede resultar en desórdenes neurológicos tales como las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington (Gerlach *et al.*, 1994; Berg y Youdim, 2006).

Recientemente se ha enunciado el concepto de hormesis que se refiere a qué células y organismos expuestos a condiciones moderadas de estrés oxidativo responden induciendo mecanismos protectivos que resultan en efectos beneficiosos (Videla, 2009). La respuesta hormética es inducida por dosis bajas de agentes tóxicos, irradiación, ROS, restricción calórica dietaria, ejercicio moderado y estrés por calor (Videla, 2009). Hormesis es una respuesta dependiente de la dosis, que dispara mecanismos que dependen del tipo celular, del nivel de ROS alcanzado y de la duración de la exposición. Datos preliminares indican que la exposición a concentraciones moderadas de Fe lleva a controlar adecuadamente el daño dependiente de isquemia-reperusión en hígado de rata (Galleano *et al.*, 2011).

El objetivo del presente estudio es identificar y caracterizar el mecanismo de pre-acondicionamiento con Fe, como un disparador oxidativo que condiciona la respuesta celular frente a situaciones de estrés en cerebro de rata. Además, se comparará la respuesta observada con la sobrecarga aguda causada por la administración intraperitoneal de Fe-dextrán en cerebro total, estudio realizado por el mismo grupo de investigación (Piloni *et al.*, 2017).

Los experimentos programados incluyen el análisis del efecto del tratamiento sobre la condición oxidativa celular. Además, se propone realizar un estudio cinético para establecer la ventana temporal óptima donde no aparezcan daños oxidativos, pero asimismo, que los valores de concentración en estado estacionario del Fe no hayan regresado a los valores controles.

Material y Método

Animales

Todos los experimentos se realizaron con ratas macho correspondientes a la cepa Sprague-Dawley, pesando 200 ± 10 g y una edad de 45 ± 5 días. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Morón bajo condiciones estándar de iluminación (L:O 12:12), temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad con acceso ilimitado de agua y alimento. Estas condiciones fueron conservadas durante el transcurso de todo el experimento.

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Morón. Los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo con las leyes argentinas y siguiendo el Código Ético propuesto por el *Canadian Council on Animal Care*.

Diseño experimental

El modelo de preacondicionamiento con Fe-dextrán (Sigma-Aldrich) en ratas se realizó mediante la administración intraperitoneal (*i.p.*) de 6 dosis de 50 mg Fe-dextrán/kg cada 48 h durante 10 días (grupo con Fe; $n = 21$). A otro grupo de ratas se le suministró solución fisiológica (grupo control; $n = 21$).

Para la evaluación del contenido de Fe en cerebro total, las ratas fueron sacrificadas a 1, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h posadministración de la última dosis de Fe-dextrán y se les extrajo el cerebro para su posterior análisis.

Para la determinación de antioxidantes liposolubles se analizó α tocoferol en homogeneizados de cerebro total a 2, 4, 6 y 8 h y para β caroteno 2 h posadministración de la última dosis de Fe-dextrán. En el caso de daño a lípidos (TBARS y tioles totales) se analizaron muestras luego de 6 h de la última dosis de Fe-dextrán. Se estableció la ventana temporal óptima donde no aparecieron daños oxidativos pero los valores de concentración en estado estacionario del Fe no hayan regresado a los valores controles.

Para la medición del contenido de Fe, contenido de antioxidantes liposolubles y contenido de TBARS, se siguieron las técnicas y métodos expuestos en Piloni *et al.* (2013, 2016 y 2017). A continuación, solo se incluirá una breve descripción.

Contenido de Fe: las muestras de tejido cerebral fueron extraídas, lavadas, pesadas y colocadas en estufa a 60°C para desecación hasta peso seco constante, luego fueron pulverizadas y sometidas a digestión ácida. Posteriormente las muestras fueron mineralizadas y el contenido de Fe se determinó espectrofotométricamente con la formación del complejo Fe (II):batofenatrolina ($\lambda = 535$ nm).

Contenido de antioxidantes liposolubles: el contenido de α -tocoferol y β -caroteno en homogeneizados de cerebro fue cuantificado por HPLC fase reversa con detección electroquímica utilizando un detector amperométrico LC-4CBioanalyticalSystems con un electrodo a un potencial aplicado de oxidación de 0.6 V. Las muestras fueron extraídas con 1 ml de etanol y 4 ml de hexano. Luego de una centrifugación a 600xg durante 10 min, la fase de hexano fue removida e inyectada para análisis por HPLC. Se utilizaron estándares de D,L- α -tocoferol (Sigma-Aldrich) y β -caroteno (Sigma-Aldrich).

Contenido de TBARS: alícuotas (50 mg) de muestras de cerebros fueron homogeneizadas con 1 ml de buffer de fosfato de potasio 40mM, KCl 120 mM (pH 7,4). A 0,1 ml de homogenato se agregó 0,05 ml de hidroxitoluenobutilado (BHT) 4% p/v y 0,25 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) 3%. Luego de homogeneizar se agregaron 1 ml de HCl 0,1 N; 0,15 ml de ácido fosfotúngstico 10% p/v y ácido 2-tiobarbitúrico 0,7% p/v. La mezcla fue calentada en agua hirviendo durante 45 min y las TBARS fueron extraídas en 1 ml de n-butanol. Luego de una corta centrifugación, se realizó una lectura en espectrofotómetro a 535nm. Los valores se expresaron en nanomoles TBARS (equivalentes malondialdehído) por mg de proteína. Los estándares de malondialdehído fueron preparados de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Las mediciones de proteínas totales fueron realizadas de acuerdo con Lowry *et al.* (1951).

Tioles totales: fueron determinados espectrofotométricamente en el cerebro total en presencia de 20 mM EDTA en una concentración de 75 mg/ml de acuerdo con Sedlak y Lindsay (1968), empleando 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) y midiendo la absorbancia a 412 nm usando GSH como estándar. La curva estándar se realizó utilizando 1 mM GSH solución SIGMA.

Análisis estadístico de los resultados

Todos los protocolos experimentales se optimizaron en cuanto a las características bioquímicas de los estudios (linealidad con la concentración, el tiempo, etc.).

Para evaluar las diferencias estadísticas en los parámetros evaluados se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) (programa Statistica, versión 9). Posteriormente se aplicó el test de Tukey. Para la significación estadística se consideró $P < 0,05$.

Resultados

La **Fig. 1** muestra el contenido total de Fe en cerebro de rata en función del tiempo posadministración de Fe-dextrán (*i.p.*). El grupo control no presentó diferencias significativas en cada uno de los tiempos analizados. El contenido total de Fe mostró un incremento significativo 2 h posadministración de la última dosis.

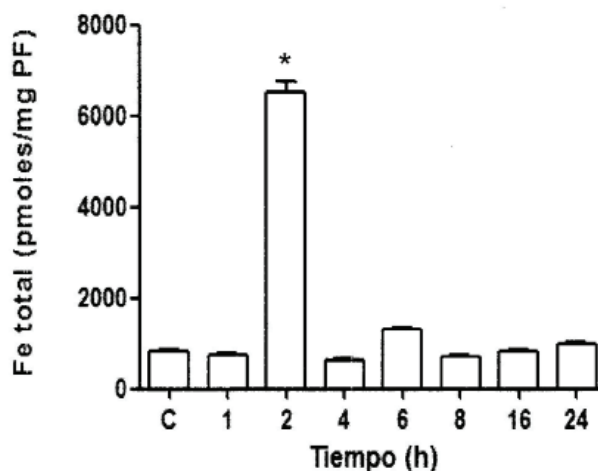


Figura 1: Contenido total de Fe en cerebro total de ratas ($n = 3$ por tiempo) inyectadas con Fe-dextrán (50 mg/kg) en función del tiempo posadministración de la sexta dosis determinado espectrofotométricamente. C representa el valor promedio de Fe total del grupo control que se midió en cada tiempo sin presentar diferencias significativas comparando cada tiempo. Se muestra a modo de representación gráfica solo el valor C para el tiempo 1 (h). Se presenta media \pm D.E.; * Significativamente diferente de los controles y del resto de los otros grupos, ANOVA $P < 0,05$.

La evaluación del daño a lípidos por especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro luego de 6 h de exposición a la última dosis de precondicionamiento al Fe muestra un aumento (Fig. 2). A pesar de observarse una tendencia al aumento de las TBARS, no se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con Fe-dextrán y los controles.

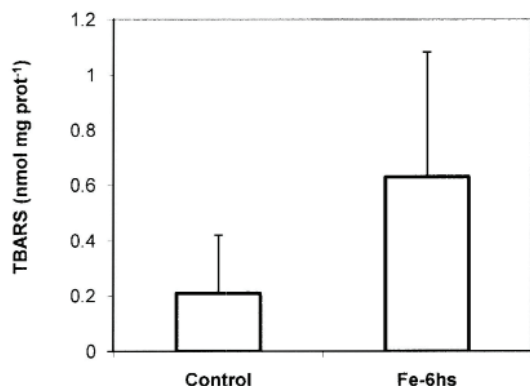


Figura 2: Evaluación de daño a lípidos por especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro ($n = 3$) luego de 6 h de exposición a la última dosis de precondicionamiento al Fe. Se presenta media \pm D.E.

El contenido de los antioxidantes α -tocoferol y β -caroteno en los homogeneizados de cerebro se muestran en la Fig. 3. El contenido de α -tocoferol mostró una disminución significativa a las 2 h luego de la última dosis de Fe (Fig. 3A). El contenido de β -caroteno fue prácticamente nulo y no se modificó por el suministro de Fe (Fig. 3B).

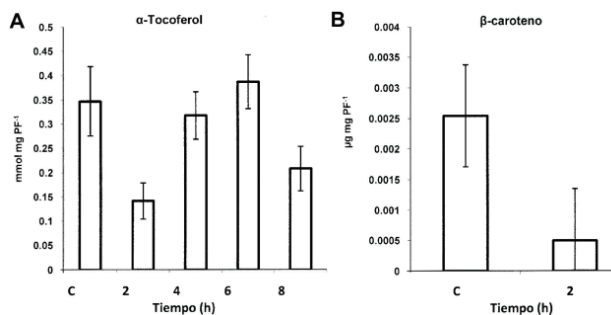


Figura 3: Efecto de precondicionamiento a Fe evaluando en homogeneizado de cerebro ($n = 3$) a distintos tiempos de exposición a la última dosis. **A**, concentración de α -tocoferol en función de las horas de exposición a

Fe en cerebro de rata normalizado a peso fresco. **B**, concentración de β -caroteno en ratas control y luego de 2 h de exposición. Se presenta media \pm D.E.; * Significativamente diferente del control (C) y de los otros grupos, ANOVA $P < 0,05$.

El contenido de tioles totales se muestra en la Fig. 4 donde se observa un aumento significativo ($P < 0,05$) luego de 6 h de la última dosis de Fe.

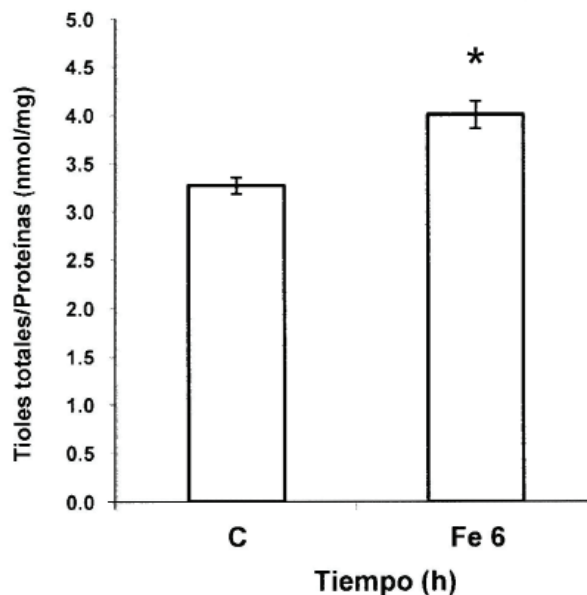


Figura 4: Efecto de precondicionamiento a Fe evaluando en homogeneizado de cerebro ($n = 3$) luego de 6 h de exposición a la última dosis de precondicionamiento. Concentración de tioles totales en ratas control (C) y luego de 6 h de exposición, normalizado a proteínas. Se presenta media \pm D.E. * Significativamente diferente del grupo control (C), ANOVA $P < 0,05$.

Discusión

A pesar de que el Fe es esencial para la vida, el exceso es tóxico debido a su habilidad para catalizar reacciones productoras de radicales libres (ROS) (Hernando *et al.*, 2019). La característica que le permite al Fe actuar como un agente catalítico redox, al aceptar y donar electrones reversiblemente, lo convierte en un elemento peligroso, pues es la base de su toxicidad, que puede reaccionar con las especies reactivas del oxígeno formadas como resultado

de la respiración celular y provocar la peroxidación de proteínas, del ADN y de los lípidos de membrana; estos efectos deletéreos se exageran cuando hay sobrecarga del mineral pues solo se producen cuando el Fe está “libre” o en una forma anormal dentro de la célula (Fleming, 2015).

La oxidación de Fe^{2+} conduce, a través de la pérdida de un electrón que es recibido por el O_2 , a la formación de anión superóxido (O_2^-). La generación de O_2^- da origen a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede reaccionar con Fe^{2+} y producir radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Como se hizo referencia en la Introducción, estos procesos son responsables del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en las células.

El concepto de hormesis explora la posible alternativa que aumentos moderados en la concentración de ROS en un intervalo definido resulten capaces de generar respuestas citoprotectivas, que podrían proteger los órganos de los efectos dañinos de los subsecuentes eventos deletéreos (Videla, 2009). En este trabajo, nuestro grupo evaluó la posible participación del Fe en el fenómeno de hormesis disparado en cerebro por la administración de Fe.

Los compuestos de Fe pueden administrarse por vía parenteral y oral (generalmente dietaria), y la modalidad del tratamiento puede ser aguda o crónica. La administración *i.p.* de Fe-dextrán (500 mg/kg de peso) da origen a cuadros similares a los correspondientes a las medicaciones con Fe parenteral y a las transfusiones, donde el Fe es esencialmente incorporado a los macrófagos. Se han observado alteraciones en el metabolismo oxidativo y en las defensas antioxidantes celulares en el hígado y sangre de animales sobrecargados con Fe (Galleano y Puntarulo, 1992). La administración parenteral de Fe incrementa marcadamente el Fe sérico, superando la capacidad fisiológica para unir Fe circulante y conduciendo a una situación de estrés oxidativo en plasma, evaluado en términos de incrementos en el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y disminución del contenido de α -tocoferol plasmático.

La peroxidación de lípidos es una medida de daño oxidativo. Cuando se produce un desbalance, ya sea por un aumento en la producción de ROS o una disminución en el contenido de antioxidantes, la concentración en estado estacionario de las especies activas aumenta y se llega a una situación conocida como estrés oxidativo. Los ROS reaccionan con

moléculas celulares que pierden su estructura y función y aparece la condición de injuria celular que puede conducir a la necrosis (Hernando *et al.*, 2019).

En el experimento realizado con precondicionamiento, con un progresivo aumento en la carga de Fe, se excede la capacidad de almacenamiento del Fe. Así, resulta en un incremento de la actividad catalítica del ion al superar el *pool* en tránsito en las células. El Fe cataliza la peroxidación de lípidos por lo que se pretende comprender el papel de este metal luego de diferentes tiempos de exposición en las neuronas.

Nuestro trabajo mostró que el Fe se incorpora en el cerebro de rata y presenta un máximo luego de 2 h de la última dosis administrada en precondicionamiento. De esta forma se comprueba que el Fe es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La concentración de α -tocoferol fue significativamente menor a los valores control luego de 2 h de la última dosis de Fe, coincidentemente con el aumento del contenido de Fe. También se observó una disminución a las 8 h aunque no fue estadísticamente significativa. Estos resultados indican que hubo un consumo de los antioxidantes lipofílicos en esos momentos. Se sugiere que el posterior aumento en su concentración alcanzando los niveles del tratamiento control, puede deberse a una movilización interna proveniente de reservas de α -tocoferol en diferentes tejidos. Este hecho puede demostrar un efecto protector en el cerebro frente al potencial daño en el medio lipofílico que podría producir el aumento de Fe. En cambio, el contenido de β -caroteno fue prácticamente nulo, consistente con estudios previos (Serbinova *et al.*, 1992; Stahl *et al.*, 1992; Leung *et al.*, 2001) y la disminución observada a las 2 h de la última dosis de Fe no fue estadísticamente significativa. En relación con el medio hidrofílico, se observó un aumento significativo en el contenido 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.

En exposición a precondicionamiento, la exposición al Fe produjo una rápida respuesta en la producción de estos antioxidantes no enzimáticos que probablemente serán utilizados en caso de una exposición mayor a 6 h. Otra interpretación de estos resultados podría ser que se ha

producido una concentración aún mayor de tioles totales que se ha utilizado en el transcurso de las 6 h para evitar el daño a lípidos evidenciado por los resultados de TBARS discutidos previamente. Dicho resultado es opuesto al determinado por Piloni *et al.* (2017) donde por una exposición aguada a Fe, el contenido de tioles totales disminuye significativamente luego de 6 h de exposición. Por otro lado, Piloni *et al.* (2016) ha demostrado un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en estudios de precondicionamiento para cerebro total, aunque dicho aumento fue significativamente mayor en corteza cerebral.

Considerando que el Fe tiene una activa participación en la catálisis de la generación de ROS, se puede concluir preliminarmente que el precondicionamiento con Fe podría evitar daños neurológicos debido a un consumo de antioxidantes liposolubles, en particular α -tocoferol. Dichos resultados son coincidentes con los presentados por Piloni *et al.* (2016) quienes demostraron que el precondicionamiento activa antioxidantes tanto lipofílicos como hidrofílicos resultando en una protección celular. Sin embargo, también han demostrado que diferentes áreas del cerebro de rata exhiben una sensibilidad diferencial a los efectos del exceso de Fe. Estos resultados también fueron observados por Drögue (2002) quien demostró que contrariamente a un aumento de estrés oxidativo en exposiciones agudas, incrementos moderados de ROS en un período definido, pueden ejercer la regulación de la expresión génica con respuestas citoprotectivas. El mismo efecto fue observado con la administración subcrónica de Fe en hígado (Galleano *et al.*, 2011).

En un trabajo previo (Piloni *et al.*, 2017), nuestro grupo ha demostrado que en ratas expuestas a sobrecarga aguda de Fe-dextrán (500 mg/kg de peso, *i.p.*) el contenido de Fe aumentó significativamente ($P < 0,05$) con respecto a los controles en cerebro total, a los tiempos 6 y 8 h posteriores a la sobrecarga (Fig. 5). No se observaron diferencias significativas en el daño a lípidos ($P > 0,05$) a las 6 y 8 h con respecto al control. Sin embargo, la presencia de especies reactivas fue significativamente menor ($P < 0,05$) tanto a las 6 como a las 8 h posteriores a la sobrecarga de Fe respecto al tratamiento control (Fig. 5).

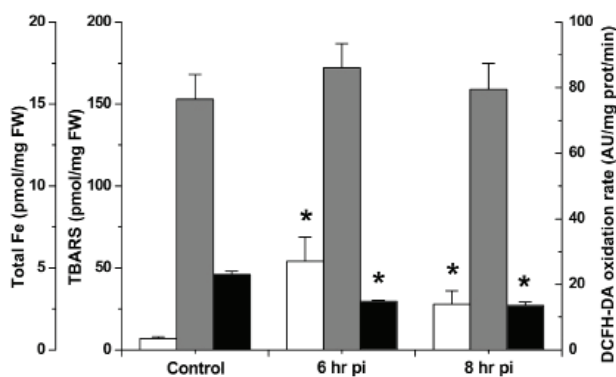


Figura 5: Cinética en cerebro total luego de la administración aguda de Fe (barra blanca), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (barra gris) y oxidación de 2'7' diclorofluoresceína diacetato (barra negra), normalizado por proteínas. Se presenta media \pm D.E. * Significativamente diferente de los valores control respectivos. ANOVA $P < 0,05$. (Piloni *et al.*, 2017)

También, se demostró que en referencia al contenido de α -tocoferol, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el cerebro completo a las 6 u 8 h del tratamiento agudo con Fe-dextrán con respecto al grupo control (Fig. 6).

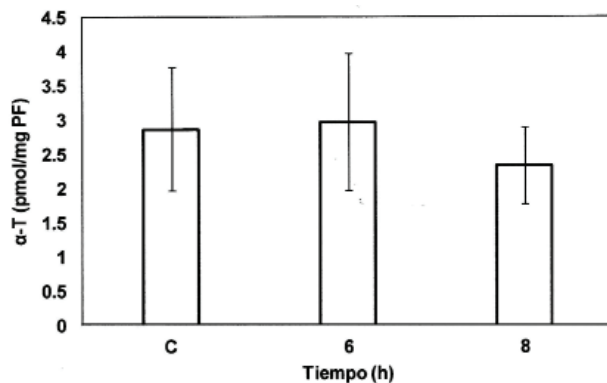


Figura 6: Contenido de α -Tocoferol (α -T) en cerebro total a las 6 y 8 h del tratamiento con sobrecarga aguda de Fe-dextrán. Valores normalizados por peso fresco. Se presenta media \pm D.E. (Piloni *et al.*, 2017)

Asimismo, el contenido de tioles totales (Fig.7) disminuyó significativamente luego de 6 h (22%) y 8 h (25%) en cerebro total respecto al control.

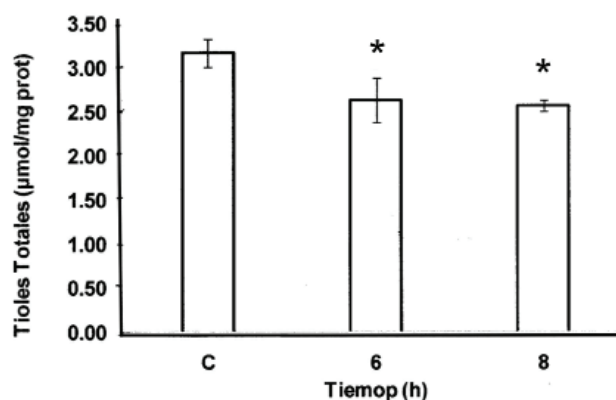


Figura 7: Contenido de tioles totales en cerebro completo a las 6 y 8 h del tratamiento con sobrecarga aguda de Fe-dextrán. Valores normalizados por proteínas. Se presenta media \pm D.E. * Significativamente diferente del control (C), ANOVA $P < 0,05$. (Piloni *et al.*, 2017).

Los resultados del experimento con sobrecarga aguda de Fe muestran un máximo incremento de la concentración total de Fe luego de 6 h de la administración de Fe-dextrán, en coincidencia con estudios previos que evidencian que en el hígado se alcanza el máximo de acumulación de Fe luego de 6 h empleando el mismo protocolo de administración (Puntarulo, 2005). Piloni *et al.* (2017) muestran que luego de 6 y 8 h de la aplicación de la sobrecarga de Fe, se observa un aumento significativo en el contenido total de Fe en el cerebro total luego de 6 y 8 h de tratamiento con Fe-dextrán. La disminución en el contenido de tioles totales reportada por Piloni *et al.* (2017), sugiere que el balance oxidativo en el medio celular hidrofílico fue afectado significativamente por la sobrecarga de Fe y los tioles son una importante barrera de defensa para prevenir futuros daños. En cuanto al medio lipofílico, no se observaron cambios significativos en el contenido de α -tocoferol con la exposición aguda de Fe, sugiriendo un escaso aumento en los radicales lipídicos en coincidencia con la ausencia de daño observado con TBARS. Estos resultados indicarían que la respuesta antioxidante no resulta uniforme en el cerebro total. En el mismo trabajo se demuestra que algunas áreas del cerebro pueden estar menos propensas que otras a expresar daño oxidativo. Dichos autores demuestran que la corteza cerebrales más susceptible a estrés oxidativo producido por exceso de Fe a nivel lipofílico. Una insuficiente respuesta antioxidante,

diferentes características de la composición de lípidos o una combinación de ambos aspectos, podrían ser responsables de los efectos encontrados en la corteza cerebral en relación con el hipocampo o el estriado (Piloni *et al.*, 2017).

Puesto que el estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre las defensas antioxidantes totales y la especie reactiva generada en un tejido, Piloni *et al.* (2017) indicaron que el exceso agudo de Fe induce estrés oxidativo en cerebro de rata. En este punto, cabe destacar que el cerebro tiene bajas defensas antioxidantes en comparación con otros tejidos (Halliwell y Gutteridge, 1996), un hecho que hace que este tejido sea más vulnerable al aumento de los niveles de especies reactivas. De hecho, el estrés oxidativo ha sido implicado en la patofisiología de desórdenes neurodegenerativos comunes (Reynolds *et al.*, 2007; Shucla *et al.*, 2011), tales como Enfermedad de Parkinson (Zhou *et al.*, 2008; Nikam *et al.*, 2009), Enfermedad de Huntington (Pérez, S. *et al.*, 2000; Stoy *et al.*, 2005) y Enfermedad de Alzheimer (Mancuso *et al.*, 2006; Lovell y Markesbery, 2007).

Karelson *et al.* (2001) mide marcadores de estrés oxidativo en cuatro regiones de cerebros control y con enfermedad de Alzheimer pareados por edad. Los datos sugieren que en la corteza cerebral, el estrés oxidativo se expresa en la siguiente secuencia (de mayor a menor): corteza temporal inferior > corteza frontal inferior > corteza sensorial poscentral, que corresponde aproximadamente a la distribución histopatológica de la enfermedad de Alzheimer desde las áreas corticales asociativas a las áreas corticales primarias.

O'Donnell (2012) propone que el estrés oxidativo en interneuronas corticales puede ser una vía común final por la que varios factores etiológicos diferentes puedan producir la disfunción cortical característica de la esquizofrenia. Además, el estrés oxidativo se ha relacionado con la hiperexcitación neuronal y esto, a las descargas epilépticas (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013).

Conclusiones

De los resultados que aporta este estudio se puede deducir que los radicales libres desempeñan un papel muy importante en el metabolismo oxidativo del cerebro

entero. Por lo tanto, resulta importante la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados con el fin de conocer su relación con las distintas patologías y poder así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a su tratamiento.

Tanto la administración aguda como subcrónica de Fe-dextrán generan una situación de estrés oxidativo en cerebro de rata. Nuestros resultados muestran una disminución en el índice general de estrés oxidativo en las ratas preacondicionadas ya que luego de varios días el consumo de antioxidantes, tanto en medio lipofílico como hidrofílico, protegió las neuronas. Esto quedó demostrado por un significativo consumo de α -tocoferol y concentraciones elevadas de tioles totales en las ratas tratadas respecto a las controles. Así, las ratas mostrarán una capacidad de preadaptarse a exposiciones crónicas de sobrecarga de Fe en un período de tiempo menor al observado en exposición aguda. Piloni *et al.* (2016) también observaron una significativa activación de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en ratas preacondicionadas. El tratamiento subcrónico con Fe produjo un efecto protector a nivel lipofílico e hidrofílico que podría ser considerado como un efecto hormético.

Sobre la base de nuestros resultados se propone el análisis del posible papel del Fe como un potencial agente beneficioso frente a la posterior exposición a agentes desencadenantes de estrés oxidativo. Así, el preacondicionamiento con dosis no-tóxicas de Fe es capaz de disparar una respuesta que conduce a disminuir los efectos oxidativos que condiciona la respuesta celular frente a situaciones de estrés. En comparación con una intoxicación aguda, uno de los objetivos de este trabajo, el contenido del Fe aumenta significativamente en el cerebro a las 2 h de la exposición a la sexta dosis pudiendo actuar como agente catalizador de la generación de ROS, y generando efectos deletéreos que son atenuados por el efecto protector de las especies antioxidantes tanto de naturaleza enzimática (que aumentan su actividad) como no-enzimática (que son consumidos) que se encuentran en concentraciones elevadas debidas a la exposición subcrónica. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado (Piloni *et al.*, 2017) que esta respuesta frente a la generación de ROS en una exposición aguda no es tan rápida como la observada en ratas preacondicionadas.

Por otro lado, altos niveles de Fe en cerebro pueden

generar estrés oxidativo que ha sido asociado a desórdenes neurodegenerativos y de muerte neuronal, probablemente por defectos en los mecanismos de defensa antioxidante. Nosotros también hemos demostrado (Piloni *et al.*, 2017) que, en una exposición aguda, la respuesta antioxidante no resulta uniforme en todas las áreas cerebrales, sugiriendo que algunas de estas áreas pueden estar menos propensas que otras a expresar daño oxidativo. Así, nosotros hemos observado que la corteza cerebral es más susceptible a estrés oxidativo producido por exceso de Fe a nivel lipofílico. Nuestros resultados con preacondicionamiento sugieren una adecuada protección antioxidante en el medio hidrofílico y el lipofílico. Se requiere analizar detalladamente el complejo escenario de interconexión con otros antioxidantes (tanto enzimáticos como no enzimáticos), que permitirían interpretar el aumento del contenido de α -tocoferol, luego de su disminución a las 2 h de exposición a Fe en el tratamiento de preacondicionamiento, que podría deberse a una movilización interna desde diferentes tejidos o probablemente debido a procesos de regeneración con ascorbato.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con fondos de la Fundación Universidad de Morón a través de los subsidios Código15-001/12 y Código15-001/14. Los autores desean agradecer a la Dra. Susana Puntarulo (IBIMOL, CONICET-UBA) por los aportes realizados durante el desarrollo de esta investigación y a la Dra. Natacha Piloni (IBIMOL, CONICET-UBA) por los aportes técnicos durante el desarrollo del trabajo.

Bibliografía

- Berg, D. & Youdim, MB. (2006). Role of iron in neurodegenerative disorders. *Topics Magn Resonance Imaging*, 17, 5-17.
- Bucher, J.R., Ming, T. & Aust, S.D. (1983). The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *BiochemBiophys Res Commun*, 111, 777-782.
- Cairo, G. & Pietrangelo, A. (2000). Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J.*, 352, 241-250.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Rivera-

- Espinosa, L. Montesinos-Correa, H., Bandala, C. & Carmona-Aparicio, L. (2013). Role of oxidative stress in refractory epilepsy: Evidence in patients and experimental models. *Int J MolSci*, 14, 1455-1476.
- Cervino, C.O. & Hernando, M. (2015). La melatonina como agente antioxidante: análisis de estrés oxidativo en un modelo animal con exposición a hierro. *Rev. de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UM)*, 13, 89-103.
 - Chiappe, G. (2017). Sobrecarga de hierro. *HEMATOLOGIA*, 21(Nº extraordinario), 191-204.
 - Drögue, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82,47-95.
 - Ferrari, M., Signorini, C., Ciccoli, L. & Comporti, M. (1992). Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J*, 285, 295-301.
 - Fleming, M.D. (2015). Disorders of iron and copper metabolism, the sideroblastic anemias, and lead toxicity. In S.H. Orkin, D.E. Fisher, D. Ginsburg, T. Look, S.E. Lux and D.G. Nathan (Ed.), *Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
 - Floyd, R.A. & Carney, J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol*, 32(Suppl.), S22-27.
 - Forrellat Barrios, M. (2015). Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas, un mismo objetivo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1). Recuperado: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/403/214>
 - Galleano, M. & Puntarulo, S. (1992). Hepatic chemiluminescence and lipid peroxidation in mice iron overload. *Toxicology*, 76, 27-34.
 - 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.
 - Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P. & Youdin, M. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem*, 63,793-807.
 - Gutteridge, J.M.C. (1988). Lipid peroxidation: some problems and concepts. In: B. Halliwell (Ed.), *Oxygen radicals and tissue injury* (9-19). Kansas: Allen Press.
 - Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci*, 899, 136-147.
 - Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem*, 97, 1634-1658.
 - Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*, 2^{da} edic, Oxford, London: Clarendon Press.
 - Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol*, 186, 1-85.
 - Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1996). Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci*, 8: 22-26.
 - Harrison, P.M. & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage functions and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1275, 161-203.
 - Hernando, M.P., Piloni, N.E., Cervino, C.O. & Puntarulo, S. (2019). The role of melatonin on intracellular oxidative stress. Interaction with Fe overload. In L.V. Berhardt (Ed.), *Advances in Medicine and Biology, Special Topics, Medicine and Health*, 140 (63-84). New York: Nova Science Publishers, Inc.
 - Kakhlon, O., Gruenbaum, Y. & Cabantchik, I. (2001). Repression of the heavy ferritin chain increases the labile iron pool of human K562 cells. *Biochem J*, 356, 311-316.
 - Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A., Winblad, B., Zilmer, K., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Kairane, C. & Zilmer, M. (2001). The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's disease: noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res*, 26, 353-361.
 - Ke, Y. & Qian, Z.M. (2007). Brain iron metabolism: Neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol*, 83(3), 149-173.
 - Kim, S. & Ponka, P. (2002). Blood cells, molecules, and diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 12214-12219.
 - Koppenol, W.J. (1985). The reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide: evidence against hydroxyl radical

- formation. *J Free Radic Biol Med*, 1(4), 281-285.
- Leung, I., Tso, M., Li, W. & Lam, T. (2001). Absorption and tissue distribution of zeaxanthin and lutein in rhesus monkeys after taking Fructus lycii (Gou Qi Zi) extract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 466-471.
 - Lobreaux, S., Hardy, T. & Briat, J.F. (1993). Abscisic acid is involved in the iron induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J*, 12,651-657.
 - Lovell, M. & Markesbery, W. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*, 35, 7497-7504.
 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J BiolChem*, 193, 265-275.
 - Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G. & Murri, L. (2006). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimer's Dis*, 10, 59-73.
 - Nikam, S., Nikam, P., Ahaley, S. & Sontakke, A. (2009). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem*, 24, 98-101.
 - O'Donnell, P. (2012). Cortical interneurons, immune factors and oxidative stress as early targets for schizophrenia. *Eur J Neurosci*, 35(12), 1866-1870.
 - Pérez-Severiano, F., Ríos, C. & Segovia, J. (2000). Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res*, 862, 234-237.
 - Piloni, N. & Puntarulo, S. (2010). Iron role in the oxidative metabolism of animal and plant cells. Effect of iron overload. In: M.S. Giménez (Ed.), *Metals in Biology Systems, Research Signpost* (29-50). Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India.
 - Piloni, N., Fernández, V., Videla, L. & Puntarulo, S. (2013). Acute iron overload and oxidative stress in brain. *Toxicology*, 314, 174-182.
 - Piloni, N., Perazzo, J., Fernández, V., Videla, L. & Puntarulo, S. (2016). Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. *Biometals*, 29, 119-130.
 - Piloni, N., Reiteri, M., Hernando M., Cervino, C. & Puntarulo, S. (2017). Differential effect of acute iron overload on oxidative status and antioxidant content in regions of rat brain. *Toxicologic Pathology*, 45 (8),1067-1076.
 - Ponka, P., Beaumont, C. & Richardson, D.R. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*, 35, 35-54.
 - Puntarulo, S. (2005). Iron, Oxidative Stress and Human Health. *Molec Asp Med*, 26, 299-312.
 - Reiter, R.J, Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., León, J. & Czarnocki, Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*, 50(4), 1129-1146.
 - Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, RL & Gendelman, H.E. (2007). Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol*, 82, 297-325.
 - Searle, J.W., Kerr, J.F.R., Halliday, J.W. & Powell, L.W. (1987). Iron storage disease. In RNM MacSween, PP Anthony & PJ Scheuer (Eds.), *Pathology of the Liver*. London: Churchill Livingstone, London.
 - Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25, 192-205.
 - Serbinova, E., Choo, M. & Packer, L. (1992). Distribution and antioxidant activity of a palm oil carotene fraction in rats. *Biochem Int*, 28, 881-886.
 - Shucla, V, Mishra, S & Pant, H. (2011). Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci*, 2011, 572-634.
 - Stahl, Schwarz, W., Sundquist, A.R. & Sies, H. (1992). Cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys*, 294, 173-177.
 - Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Christofides, J, Egerton, M., Stone, T.W. & Darlington, L.G. (2005). Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem*, 93, 611-623.
 - Sugioka, K., Nakano, H., Nakano, M., TeroKubota, S. & Ikegami, Y. (1983). Generation of hydroxyl radicals during the enzymatic reductions of the Fe³⁺-ADP-

phosphate-adriamycin and Fe^{3+} -ADP-EDTA systems: less involvement of hydroxyl radical and a great importance of proposed perferryl ion complexes in lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 753, 411-416.

- Videla, L.A. (2009). Oxidative stress signaling underlying liverdisease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol*, 1, 72-78.
- Weinberg, E.D. (1990). Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev*, 22, 531-579.
- Zhou, C., Huang, Y. & Przedborski, S. (2008). Oxidative stress in Parkinson's disease: A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 93-104.