

**Estudio del efecto de la quercetina en la
viabilidad celular en un modelo de
Enfermedad de Parkinson inducido por
rotenona**

Mariángeles Kovacs

Departamento de Neuroquímica

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Dra. Giselle Prunell

Co – orientadora: Dra. Carolina Echeverry

Montevideo, Diciembre 2016



Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer, y afecta al 2% de la población mundial mayor de 60 años. Se caracteriza por la presencia de alteraciones motoras como escasez de movimientos espontáneos, rigidez, bradiquinesia, trastornos en la postura y temblor en reposo. Estos síntomas se deben principalmente a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc). Actualmente, los tratamientos clínicos disponibles para tratar esta enfermedad son sintomáticos y no frenan el progreso de la misma. Por lo tanto, es fundamental la búsqueda de terapias alternativas. En este sentido, datos epidemiológicos asocian de forma significativa dietas ricas en flavonoides, definida como “dieta mediterránea”, con una baja morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer. En particular, la quercetina es uno de los flavonoides más abundantes en la dieta, y ha sido objeto de varias investigaciones por su gran poder antioxidante. Ha sido utilizado con éxito contra alergias, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Sin embargo, los estudios de su poder neuroprotector en general y en modelos de EP en particular, han sido controversiales. En este contexto, este trabajo tiene como objetivo general el evaluar la capacidad neuroprotectora de quercetina en un modelo celular de EP. Como modelo de Parkinson se utilizó células catecolaminérgicas PC12 expuestas a la rotenona, un conocido herbicida y plaguicida ampliamente usado para generar Parkinson experimental.

Primariamente se puso a punto un modelo de EP con rotenona en células PC12 naive y PC12 diferenciadas (PC12d) para luego estudiar la capacidad del flavonoide quercetina de prevenir la muerte inducida por rotenona en estas células.

Los resultados muestran que la exposición de los cultivos a la neurotoxina durante 48hs causó la muerte neuronal en forma dosis- dependiente, determinada por el ensayo con Rojo Neutro. Para el caso de las PC12 naive, la concentración de 100 nM disminuyó la sobrevivencia en un 50%, mientras que para las PC12d la concentración necesaria para obtener la misma sobrevivencia fue de 40nM. Ensayos de inmunohistoquímica en PC12d evidenciaron que las células remanentes presentaban una morfología alterada, caracterizada por ausencia de neuritas y somas redondeados.

El efecto de la quercetina en este modelo se evaluó en un protocolo que incluye el pretratamiento de diferentes concentraciones del flavonoide durante 24hrs antes del insulto con rotenona. En este paradigma experimental, la quercetina mostró un leve efecto

neuroprotector. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir el aumento en los niveles de ROS generado por el tratamiento con rotenona y evaluado con la sonda diclorofluoresceína.

En conclusión, no se observó un efecto neuroprotector importante de quercetina en este modelo celular de EP. Esto último probablemente se deba a que, a pesar de que la quercetina disminuye el estrés oxidativo generado por la toxina, no logre contrarrestar otros de los mecanismos de muerte neuronal inducidos por rotenona.

Índice

1	Introducción.....	6
1.1	Enfermedad de Parkinson.....	6
1.1.1	Introducción.....	6
1.1.2	Mecanismos de muerte neuronal en la EP.....	7
1.1.3	Modelos de EP experimental.....	9
1.1.4	Tratamientos para la EP:.....	11
1.2	Flavonoides.....	12
1.2.1	Introducción.....	12
1.2.2	Flavonoides y efectos beneficiosos.....	13
1.2.3	Flavonoides y EP.....	13
1.2.4	Quercetina y EP.....	14
2	Antecedentes particulares.....	16
3	Hipótesis.....	16
4	Objetivo general.....	16
4.1	Objetivos específicos.....	17
5	Estrategia experimental.....	17
6	Materiales y métodos.....	20
6.1	Células PC12.....	20
6.2	Tratamientos.....	21
6.3	Evaluación sobrevida celular.....	22
6.4	Cuantificación de la producción intracelular de ERO.....	22
6.5	Inmunohistoquímica.....	22
6.6	Análisis de datos.....	24
7	Resultados.....	24
7.1	PC12 naïve.....	24

7.2	PC12 diferenciadas	26
8	Discusión	32
8.1	Modelo experimental de EP	32
8.2	Efecto de la quercetina en el modelo de EP	33
9	Conclusión.....	35
10	Perspectivas.....	36
11	Referencias	36

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1 Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer, y afecta al 2% de la población mundial mayor de 60 años [1]. Se caracteriza por la presencia de alteraciones motoras como escasez de movimientos espontáneos, rigidez, bradiquinesia, trastornos en la postura y temblor en reposo [2,3]. Estos síntomas se deben principalmente a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc), lo cual conduce a una disminución de dopamina (DA) en el cuerpo estriado (CE) [4]. Tanto el CE como la SNpc, forman parte de los ganglios basales (GB), los cuales están directamente involucrados en el control voluntario del movimiento. Por esta razón es que se observan claros síntomas motores asociados a esta enfermedad. Cabe resaltar que cuando los síntomas motores aparecen, ya existe aproximadamente un 80% de degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [2].

La EP no es solo una enfermedad de síntomas motores. También se han identificado otros síntomas como la depresión, trastornos del sueño, anormalidades sensoriales, disfunción autonómica y demencia [4]. Contrario a lo que sucede con los síntomas motores, las causas de los síntomas no motores se desconocen, pero se los ha relacionado con alteraciones fuera de los GB, como la degeneración en áreas como el locus coeruleus, núcleo dorsal del rafe, núcleo basal de Meynert y neuronas simpáticas post-ganglionares [4].

Otra característica de la EP, es la formación de agregados proteicos llamados cuerpos de Lewy (CL) [2,4]. Los mismos están formados por una mezcla heterogénea de proteínas y lípidos, presentando altos niveles de la proteína α -sinucleína. Existen CL en áreas que no incluyen los GB, y que están involucradas en la aparición de los síntomas no motores [4].

Las causas de la EP todavía permanecen inciertas. El 90% de los casos de EP son esporádicos, en donde factores ambientales, tales como agroquímicos o metales pesados parecen ser determinantes. Únicamente un 10% de los mismos está determinado por factores genéticos [4].

La edad es un factor de riesgo importante. Para ilustrar esto, se conoce que la prevalencia de la EP en países industrializados es de un 0,3%, pero la misma aumenta a 1% en

mayores de 60 años y a 4% en la población mayor de 80 años [4]. Además también se puede observar una distinción entre la prevalencia en hombres y mujeres, siendo la relación de 3:1 para hombres. Esto puede deberse a un efecto neuroprotector de los estrógenos [4].

1.1.2 Mecanismos de muerte neuronal en la EP

Como se mencionó anteriormente las causas de la enfermedad no se conocen, pero si se han identificado mecanismos que participan en el proceso neurodegenerativo, incluyendo disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, inflamación y alteración en la formación y degradación de proteínas [5].

En organismos aeróbicos, debido a procesos involucrados en las funciones normales dentro de la célula, continuamente se están produciendo especies reactivas del oxígeno (ERO). Particularmente, durante la fosforilación oxidativa necesaria para producir ATP dentro de la mitocondria, se generan gran cantidad de ERO por la pérdida de electrones desde la cadena transportadora de electrones, lo que termina en una reducción parcial de la molécula de oxígeno en superóxido [6]. Debido a que estas ERO son potencialmente dañinas para las células, existe un sistema de defensas antioxidantes responsables de disminuirlas o transformarlas en compuestos menos tóxicos. Si la cantidad de ERO, no puede ser contrarrestada por los sistemas de defensa antioxidantes, se genera una condición de estrés oxidativo, lo que puede derivar en daño y posterior muerte celular [4]. Entonces podemos definir al estrés oxidativo como un desbalance entre pro-oxidantes y antioxidantes.

Es así que la mitocondria juega un importante papel en procesos como la producción de ERO y en la apoptosis [4]. Disfunciones en este organelo, principalmente causadas por deficiencias en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, se encuentran dentro de las principales alteraciones celulares presentes en pacientes con EP [5].

Las deficiencias en el complejo I mitocondrial, además de conducir a una deficiencia en la producción de ATP, están estrechamente relacionadas con el aumento de ERO [4], lo cual puede implicar estrés oxidativo en caso de que las defensas antioxidantes se vean superadas.

El cerebro es un órgano particularmente susceptible a sufrir estrés oxidativo ya que consume casi un 20% del O₂ total, presenta una alta tasa metabólica, una capacidad antioxidante reducida y una baja regeneración. Las neuronas dopaminérgicas son particularmente vulnerables a sufrir estrés oxidativo y neurodegeneración. Esto se debe

a que, además de la producción de ERO por el funcionamiento mitocondrial, se suma al metabolismo oxidativo de la DA. La DA puede formar ERO y quinonas por diferentes caminos, por ejemplo:

1) A través de su metabolización por la monoamina oxidasa (MAO), en donde se produce peróxido de hidrógeno y ácido desoxifenilacético. El H_2O_2 , puede reaccionar con metales, como el Fe^{2+} , y formar radicales hidroxilos, altamente tóxicos [7,8]. Es de destacar que la SNpc se caracteriza por presentar altos niveles de hierro debido a la presencia de neuromelanina, pigmento con alta afinidad por este metal [5,8].

2) A través del anillo catecol de la DA, que al oxidarse, produce DA quinona, H_2O_2 y anión superóxido.

El metabolismo de la DA hace que estas neuronas se encuentren normalmente en un estado de estrés oxidativo compensado. Este estado es exclusivo, y las distingue de otros tipos neuronales y las haría más propensas al estrés oxidativo [7].

En la SNpc de pacientes con EP se han detectado diferentes marcadores de estrés oxidativo, incluyendo bajos niveles de antioxidantes como el glutatión, altos niveles de hierro y alteraciones mitocondriales incluyendo la inhibición del complejo I mitocondrial [8]

La inflamación es otro proceso clave en el proceso neurodegenerativo en la EP, particularmente asociado a la activación de la microglía. En muestras postmortem de pacientes con EP se observan altos niveles de activación de la microglía [4].

Por último, otro mecanismo implicado en la degeneración es la alteración en el metabolismo de proteínas, en especial, en los sistemas de degradación de las mismas. Para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas, las células poseen sistemas, como el sistema ubiquitin-proteasomal. Los proteasomas son grandes complejos proteicos, que se encargan de la degradación de proteínas marcadas para ser eliminadas con poliubiquitinas. Se sugiere que una disfunción de este sistema estaría involucrado en los mecanismos de muerte neuronal en la EP. Por ejemplo, se ha observado que los CL, además de α -sinucleína, presentan altos niveles de ubiquitina y subunidades 20S y 26S del proteasoma [9]. Otro sistema implicado en la degradación de proteínas, es la vía autofágica lisosomal, un mecanismo selectivo de degradación de proteínas mal plegadas. Dos proteínas claves en este mecanismo son Hsc70 y LAMP2A. Hsc70 es una proteína perteneciente a la familia de las chaperonas que cumple un rol importante en el reconocimiento de motivos en proteínas mal plegadas, mientras que LAMP2A es un receptor que se encuentra en la membrana lisosomal y que se encarga de la

internalización de proteínas destinadas a la degradación [10]. Estudios recientes han demostrado que la chaperona Hsc70 le confiere a las células resistencia frente a cambios oxidativos [11]. Disfunciones en esta vía parecen estar asociadas a la EP. En particular, se han observado bajos niveles tanto de Hsc70 como de LAMP2A en la SNpc de cerebros de pacientes con EP [10].

1.1.3 Modelos de EP experimental

Para lograr avanzar en el estudio de los mecanismos patogénicos en la EP y ensayar posibles terapias efectivas es necesario el uso de modelos preclínicos. Dentro de los modelos de EP actuales podemos distinguir dos grandes tipos, por un lado los modelos genéticos, y por el otro, los modelos que utilizan neurotoxinas. Ambos tipos de modelos han sido utilizados *in vivo* y en preparados celulares para estudiar diferentes aspectos de la EP.

Los modelos genéticos se basan en la expresión de genes humanos mutados, cuya presencia se asocia a la aparición de la EP familiar o que recapitulan algunas de las características de la enfermedad [5]. Se destacan como los más importantes los que utilizan mutaciones en los genes α -sinucleína y parkina, proteínas asociada a los CL y al sistema ubiquitin- proteasoma, respectivamente [5]. Sin embargo, el costo asociado a estos modelos hace que en muchos laboratorios no puedan ser implementados.

Los modelos experimentales de EP más utilizados se basan en el uso de compuestos tóxicos, que dañan las neuronas dopaminérgicas. Dentro de las toxinas más empleadas se encuentran, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), y rotenona.

La 6-OHDA es una neurotoxina específica para neuronas catecolaminérgicas. Tiene una estructura similar a la DA y tiene alta afinidad por los transportadores de DA (DAT) por lo que es incorporada en los terminales dopaminérgicos donde se auto-oxida generando estrés oxidativo que determina la muerte celular [12]. Sin embargo, esta toxina no reproduce la formación de inclusiones tipo CL [12].

El MPTP es convertido en su metabolito activo, el MPP⁺ por la MAO-B, el cual es ingresado a las neuronas dopaminérgicas por el DAT. Una vez dentro de las neuronas, actúa inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, resultando en el aumento de radicales libres, y la disminución de la producción de ATP. Estos procesos llevan a la muerte neuronal [5,12]. Al igual que la 6-OHDA, no induce la formación de agregados tipo CL.

El uso de rotenona como modelo de EP se ha extendido durante los últimos años. La rotenona es un flavonoide que se obtiene de las raíces de ciertas plantas y es utilizado como insecticida y pesticida. Estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a este pesticida aumenta el riesgo de contraer la EP [3]. La rotenona es un compuesto altamente lipofílico que es capaz de atravesar las membranas y que, por lo tanto, no requiere de transportador para ingresar a las neuronas dopaminérgicas [3]. Una vez en el interior celular, actúa como un inhibidor específico del complejo I mitocondrial, bloqueando la actividad de la NADH-deshidrogenasa [3]. La inhibición del complejo I también derivaría en la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, lo que facilitaría la activación del programa de muerte neuronal [13]. También se ha visto que la rotenona promueve la despolimerización de los microtúbulos [14–16]. Esta inhibición del ensamblaje de los microtúbulos genera una disrupción en el transporte vesicular que lleva, en el caso de las neuronas dopaminérgicas, a la acumulación de DA en el soma neuronal, promoviendo el aumento del estrés oxidativo a causa de la oxidación de la DA [14].

Como consecuencia directa de la inhibición del complejo I, ocurre el aumento de ERO y la inhibición del proteosoma. Esto genera una disminución en los niveles de glutatión en neuronas dopaminérgicas, y la oxidación de ADN, lípidos y proteínas [12]. Todas estas determinantes, van a conducir a la célula a la muerte por apoptosis. A esto, se le suma una menor producción de ATP debido al bloqueo del complejo I, sin embargo, este déficit bioenergético no pareciera ser la principal razón de la muerte neuronal [7]. Otro mecanismo que podría estar involucrado en la toxicidad causada por rotenona es la disfunción de vía autofágica/lisosomal [10,17]. Estudios recientes muestran que rotenona induce una disminución en los niveles de la proteína Hsc70, por un mecanismo independiente a la producción de ERO. Deficiencias en el control de proteínas por autofagia también estarían causadas por el déficit bioenergético causado por la rotenona, ya que se verían afectados procesos dependientes de ATP como lo es el tráfico por microtúbulos, lo que llevaría a la inhibición del flujo autofágico [16,18].

La rotenona, por su mecanismo de acción, no afectaría exclusivamente a neuronas dopaminérgicas de la SNpc, sin embargo, diferentes evidencias sugieren que las mismas podrían ser más vulnerables debido, entre otras cosas, a la gran facilidad que posee la DA para oxidarse [2]. Como se mencionó anteriormente, en condiciones homeostáticas, la concentración de ERO en neuronas dopaminérgicas es elevada. La interacción entre las ERO producidos por el bloqueo al complejo I mitocondrial con las ERO producidos durante

el metabolismo de la DA, podrían ser la clave del daño selectivo a las neuronas dopaminérgicas.

Una de las mayores ventajas del uso de rotenona en modelos de EP es que, a diferencia de las otras toxinas, su administración *in vivo* genera inclusiones citoplasmáticas tipo CL en la SNpc, sugiriendo que reproduciría mejor las características de la enfermedad [12,19]

1.1.4 Tratamientos para la EP:

Actualmente, los tratamientos existentes para la EP son sintomáticos, en donde se busca detener o reducir algunos de los síntomas característicos de la enfermedad, principalmente los síntomas motores. Estos tratamientos no detienen el proceso degenerativo. Por esta razón, es fundamental la búsqueda de terapias alternativas que permitan detener o retrasar el progreso de la enfermedad.

Los principales tratamientos farmacológicos para los pacientes con EP utilizados en los últimos 30 años tienen como objetivo aumentar la transmisión dopaminérgica o imitar el efecto del neurotransmisor ausente, e incluyen el tratamiento con levodopa, agonistas dopaminérgicos e inhibidores de enzimas involucradas en la recaptación de dopamina, por ejemplo [2].

Levodopa, precursor de la DA, es el principal tratamiento actualmente existente para los pacientes con EP [2]. La misma se administra oralmente, al ingresar al organismo es inmediatamente decarboxilada, y solo una pequeña parte penetra el SNC intacta, por lo tanto se requiere administrar una alta dosis para generar el efecto deseado, y esto provoca en los pacientes efectos adversos como náuseas o vómitos. Además de esto, se han registrado otros efectos adversos al uso de levodopa, como depresión, insomnio, agitación y ansiedad. Por otro lado, el uso prolongado de este fármaco ha sido asociado con efectos adversos motores, como disquinesias. Las mismas pueden ser tan severas que impidan la correcta realización de acciones como el habla o la respiración. También se observaron fluctuaciones motoras (fenómeno “on/off”) y disminución de las funciones motoras (“wearing off”) luego de un tratamiento prolongado con levodopa [2].

Otro tratamiento existente es el uso de agonistas de receptores dopaminérgicos de dopamina, como la apomorfina. Los mismos aumentan la transmisión dopaminérgica, y pueden ser utilizados solos, para retrasar el uso de levodopa o, junto con levodopa, para maximizar su efectividad [2].

Por otro lado, se utilizan como tratamientos, inhibidores de enzimas que participan en el metabolismo de dopamina como la MAO-B y COMT para disminuir la degradación del

neurotransmisor y así aumentar sus niveles en la hendidura sináptica. En general estos tratamientos se usan principalmente en combinación con levodopa [2].

Debido a la gran cantidad de efectos adversos que estos tratamientos generan, y sumado a lo dicho anteriormente, que solamente ayudan a reducir los síntomas motores, se hace totalmente necesaria la búsqueda de terapias alternativas. Actualmente hay varios candidatos posibles, cuyos estudios se encuentran en fase preclínica o ensayos clínicos, como la nicotina, melatonina, agentes anti-inflamatorios, vitaminas A, C y E, etc. [2].

En base a lo expuesto en los puntos anteriores, el estrés oxidativo puede ser considerado como diana terapéutica fundamental para el tratamiento de la EP. Por esta razón, en las últimas dos décadas se ha profundizado en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antioxidantes [20,21]. Han sido reportados numerosos estudios que evalúan posibles agentes antioxidantes y que poseen capacidad neuroprotectora en diferentes modelos de EP. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado una terapia exitosa con antioxidantes exógenos. Las posibles causas para este fracaso incluyen la toxicidad de estos compuestos, que impide que puedan ser administrados en las altas dosis necesarias para poder producir un efecto neuroprotector. Por otro lado, la imposibilidad de atravesar la barrera hemato-encefálica (BHE) que tienen la mayoría de los antioxidantes exógenos, disminuye su biodisponibilidad cerebral, siendo esta otra de las posibles causas [22].

En este sentido, en los últimos años la comunidad científica ha dedicado mucho la atención en un grupo de compuestos antioxidantes provenientes de la dieta, los flavonoides, que al ser moléculas pequeñas, algunos de ellos pueden atravesar la BHE con cierta facilidad.

1.2 FLAVONOIDES

1.2.1 Introducción

Los flavonoides son una familia de compuestos polifenólicos, productos del metabolismo secundario de las plantas, abundantes en frutos, semillas y hojas. Le brindan el color naranja, azul y púrpura y el olor a frutos, flores y hojas [23], además las protegen contra diversos insultos como la radiación UV o el frío [24,25]. También están presentes en grandes cantidades en bebidas como el vino o el té [23]. El interés en estos compuestos surge de numerosos estudios clínicos y epidemiológicos realizados en los últimos años que asocian de forma significativa dietas ricas en flavonoides, definida como “dieta

mediterránea”, con una baja morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer [26–28].

La familia de flavonoides es muy heterogénea, que según su estructura molecular se pueden dividir en seis principales subgrupos: flavonas, flavonoles, flavan-3-ol, antocianidinas, flavanonas, isoflavanonas [29].

1.2.2 Flavonoides y efectos beneficiosos

En general, estos compuestos poseen varios efectos beneficiosos para prevenir enfermedades muy heterogéneas. Por ejemplo, en la prevención de la arteroesclerosis al proteger de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad y en la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria [30]. Modulan la actividad enzimática de varias enzimas como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, fosfolipasa A2, mieloperoxidasa, xantinoxidasa (las últimas dos involucradas en la formación de H₂O₂ y anión superóxido respectivamente) [27,31]. También cumplen importantes funciones anti- inflamatorias y han mostrado efectos citostáticos, importantes en la regulación de procesos importantes en el desarrollo del cáncer.

Sin embargo, el efecto beneficioso más estudiado, y el que inicialmente surgió como el más destacado [23] es su acción como antioxidantes. Hoy en día se ha demostrado que además de poseer capacidad antioxidante directa atrapando radicales libres y quelando iones metálicos, tienen la capacidad de actuar como antioxidantes indirectos, a través de su capacidad de interactuar con enzimas antioxidantes, de modular diversas rutas de señalización celular, participando en la homeostasis del calcio, etc. Todos estos procesos forman parte de diferentes eventos oxidativos que conducen al daño en las células en enfermedades como el cáncer, arteroesclerosis, asma [23], y en enfermedades neurodegenerativas como la EP o enfermedad de Alzheimer [31].

1.2.3 Flavonoides y EP

Diversos estudios epidemiológicos en poblaciones humanas y experimentos en modelos animales y celulares de enfermedades neurodegenerativas, proveen evidencias de que los flavonoides pueden proteger al sistema nervioso frente a una diversidad de enfermedades y noxas [32,33].

Por ejemplo y en relación con la EP , estudios preclínicos han demostrado que el kaempferol, un flavonol ampliamente estudiado, previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducido por la neurotoxina MPTP en un modelo *in vivo* de EP [34]. Otro flavonol estudiado, baicaleína, ha resultado eficaz en la reducción de la producción de

H₂O₂, previniendo el daño en las neuronas dopaminérgicas causado por la toxina 6-OHDA en modelos *in vitro* e *in vivo* de EP [35]. También se han observado efectos neuroprotectores de este flavonol contra el daño inducido por rotenona, en un modelo de EP en células PC12 [36].

Diferentes mecanismos de acción han sido propuestos para explicar el potencial neuroprotector de estos compuestos. Por ejemplo se ha observado que algunos flavonoides son capaces de activar las defensas antioxidantes endógenas de las neuronas protegiéndolas contra una posible degeneración [23]. Encontraron que, quercetina glicosilada, rutina e isoquercetina actúan aumentando la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa y del glutatión en un modelo con 6-OHDA en células PC12 [23]. Nagata y cols (1999) estudiaron los efectos antioxidantes de quercetina y catequina y observaron que existía una interacción directa con la enzima glutatión peroxidasa [37]. Por otro lado, se ha visto que flavonoides como catequina y epicatequina inhiben la peroxidación de lípidos en el cerebro [23]. El mismo efecto fue observado por quercetina glicosilada, rutin e isoquercitrin en modelos de 6-OHDA en células PC12. También se encontró que los flavonoides regulan negativamente el proceso de neuroinflamación inhibiendo las vías de señalización MAPK que pueden atenuar la activación de las vías de señalización ERK5, JNK y p38 [23]. Además, se encontró que la epigallocatequina 3-galato modula la expresión de genes proapoptóticos como Bax, Bad y Mdm2 [23], mientras que la genisteína induce cambios en la expresión del gen Bcl-2, aumentando así la supervivencia de células en enfermedades neurodegenerativas [23].

Aunque los flavonoides han mostrado ser posibles candidatos como agentes neuroprotectores, el potencial farmacológico y terapéutico es aún incierto. Esto es en parte debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos de acción claves, así como su inespecificidad y sus múltiples blancos celulares.

1.2.4 Quercetina y EP

En este trabajo, nos vamos a centrar en la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) (figura 1), la cual pertenece al subgrupo flavonoles.

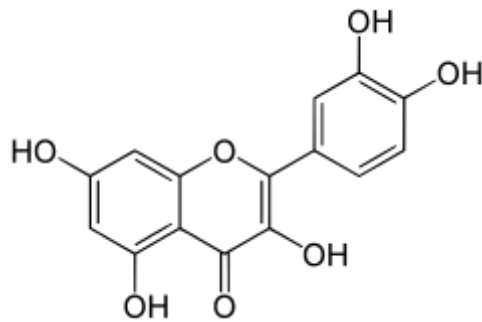


Figura 1: Estructura molecular de quercetina.

La quercetina es uno de los flavonoides más abundantes en la dieta, se puede encontrar en alimentos como manzana, cebolla, té, vegetales verdes y bayas [38]. La quercetina ha sido objeto de varias investigaciones por su gran poder antioxidante y anti inflamatorio [39,40]. Si bien ha sido utilizado con éxito contra alergias, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y cáncer [23], ha sido poco estudiada en asociación con la patogénesis de la EP.

Los pocos estudios obtenidos con quercetina en relación al aumento en la sobrevivencia neuronal frente a neurotoxinas son contradictorios [40]. Incluso algunos ensayos muestran una función dualista en donde la quercetina es protectora en el período inicial de tratamiento y se convierte en perjudicial para las células después de la exposición prolongada [40,41].

Dentro de los estudios realizados con quercetina, se ha descrito que el flavonoide induce una mejora en la actividad del complejo I mitocondrial en ratones tratados con rotenona [42]. Asimismo, se ha descrito un efecto neuroprotector de la quercetina frente al daño por la neurotoxina MPTP en un modelo celular [43]. Se ha propuesto en estos modelos que la quercetina además de actuar como antioxidante podría inhibir la fibrilación de α -sinucleína [44].

Sin embargo, otros estudios en modelos de EP han mostrado efectos negativos en cuanto a neuroprotección por quercetina [41,45], los cuales en algunos casos pueden ser explicados por la toxicidad de la misma.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes que todavía parecen insuficientes, surge la necesidad de continuar investigando en este ámbito, ya que la quercetina posee las características, por lo pronto auspiciosas para convertirse en una posible terapia alternativa frente a la EP.

2 ANTECEDENTES PARTICULARES

Desde hace 15 años el Departamento de Neuroquímica del IIBCE lleva a cabo una línea de investigación abordando el potencial neuroprotector de flavonoides, teniendo como premisa que mantener la homeostasis redox podría tener un rol fundamental en la prevención y evolución de enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de los temas de estudio, se destacan, la evaluación de flavonoides en modelos de muerte neuronal por daño oxidativo en cultivos celulares y el estudio de sus mecanismos de acción [45,46]. En una serie de experimentos se estudió el posible efecto neuroprotector de 13 flavonas, analizando la relación entre estructura y función. Una de las flavonas que resultó neuroprotectora fue la quercetina, la cual a dosis intermedias tiene efecto neuroprotector ($10\mu\text{M}$), mientras que a dosis más altas se vuelve tóxica ($100\mu\text{M}$) [46]. El estudio de los posibles mecanismos de acción de la quercetina sugiere que además de tener una potente capacidad atrapadora de radicales libres *in vitro*, induce la activación del factor Nrf2 con el consecuente aumento de la transcripción de genes que codifican defensas antioxidantes [31,47].

Otra línea de investigación del laboratorio se centra en la identificación de compuestos neuroprotectores en modelos celulares e *in vivo* de Enfermedad de Parkinson [10,48,49]. Dadas las características de la quercetina y su demostrado efecto neuroprotector frente a una injuria oxidativa, surge como paso natural el estudiar su posible capacidad neuroprotectora en modelos de EP. En este sentido se orienta el presente estudio.

3 HIPÓTESIS

La hipótesis bajo la cual estructuramos nuestro trabajo es la siguiente: La rotenona induce la muerte de células PC12 y la quercetina es neuroprotectora en este paradigma experimental.

4 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es evaluar la capacidad neuroprotectora de quercetina en un modelo celular de Enfermedad de Parkinson con rotenona.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Poner a punto un modelo de EP con rotenona en células PC12 (naive y diferenciadas)
2. Estudiar el efecto de la quercetina en la supervivencia celular en el modelo celular de EP
3. Evaluar la producción de ERO en el modelo de EP y el efecto de la quercetina sobre este parámetro

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Línea celular PC12

Los experimentos del presente trabajo se realizaron en células PC12. Esta línea celular proviene de un feocromocitoma trasplantable de rata. Son células capaces de sintetizar, almacenar y liberar dopamina y otras catecolaminas [50,51].

Además, tienen la particularidad de responder al factor de crecimiento neuronal (NGF), sufriendo cambios en su fenotipo que incluyen el dejar de proliferar y adquirir algunas características de las neuronas como lo son la formación de neuritas y conexiones sinápticas [50]. La cantidad de catecolaminas no varía pese al tratamiento con NGF, ni tampoco el nivel de enzimas necesarias para su síntesis [50]. Lo que si se ha reportado es un aumento en la excitabilidad en las células PC12 diferenciadas [52].

Por su cercanía con las neuronas dopaminérgicas en comparación con otras líneas celulares, las células PC12 son ampliamente utilizadas para realizar estudios, no solo acerca de la fisiología de las neuronas dopaminérgicas, sino también para evaluar la posible neurotoxicidad o neuroprotección de varios compuestos que actúan sobre las neuronas dopaminérgicas [19]. Así mismo, son utilizadas ampliamente en modelos de EP [19]. Se conoce que estas células son sensibles a toxinas como rotenona, la cual les induce la muerte celular [51,53].

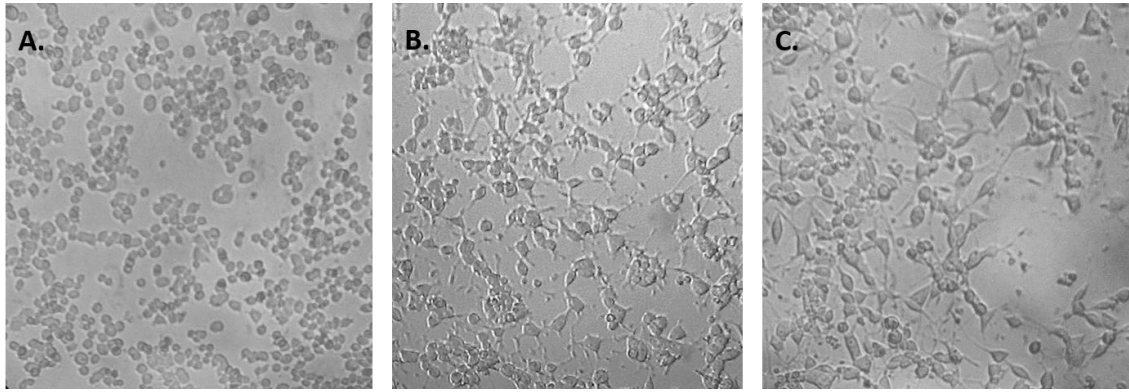


Figura 2: Proceso de diferenciación con NGF. Se muestran fotos de campo claro de A. Células PC12 naive. B. Células PC12d luego de 2 días de diferenciación con NGF 100ng/mL. C. Células PC12d luego de 7 días de diferenciación con NGF. Fotografías tomadas con aumento 200x.

Rotenona como modelo de EP

Dadas las características de la rotenona, mencionadas previamente, se empleó esta toxina para inducir la muerte en células PC12 y así contar con un modelo de Parkinson experimental *in vitro* donde poder estudiar el posible efecto neuroprotector de la quercetina. Para estudios de neuroprotección es deseable una muerte moderada (aproximadamente 50%).

Estudios de sobrevida en PC12 naive

Con el fin de hallar la concentración de rotenona necesaria para obtener una muerte celular del 50% (muerte moderada), se procedió a realizar una curva dosis respuesta utilizando diferentes dosis de rotenona (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 nM) evaluando, la viabilidad celular con el ensayo de Rojo Neutro.

Luego de identificar la concentración necesaria para obtener una viabilidad del 50%, se procedió a estudiar si el pretratamiento con quercetina era neuroprotector en este paradigma experimental. Para ello, se evaluó por un lado la toxicidad de la quercetina en estas células, y por el otro la posible neuroprotección del flavonoide frente al insulto con rotenona realizando una curva dosis respuesta de viabilidad (quercetina 10, 25, 50 y 100 μ M). Para los ensayos de protección se realizó un pretratamiento con quercetina durante 24 horas antes del insulto, para permitir que el flavonoide pueda actuar a través de cascadas de señalización celular (que como se indicó en la introducción es uno de los posibles mecanismos neuroprotectores de los flavonoides).

Estudios de sobrevivencia en PC12d

Pese a que las células PC12 naive tienen características de células catecolaminérgicas, las PC12, al adquirir el fenotipo diferenciado son más similares a las neuronas dopaminérgicas debido a que dejan de proliferar y desarrollan neuritas y conexiones sinápticas. Por ello, evaluamos en las células diferenciadas los efectos de la rotenona y la posible neuroprotección por quercetina.

El abordaje experimental fue similar al utilizado con las PC12 naive, se realizó una curva dosis-respuesta de rotenona (1, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100 nM) para identificar la concentración que induce un 50% de muerte. Utilizando esa dosis de la toxina, se evaluó si el pretratamiento con quercetina ejerce un efecto neuroprotector sobre la viabilidad celular. Como para el caso de las PC12 naive, también se evaluó la posible toxicidad de la quercetina. Las concentraciones de quercetina utilizadas fueron: 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μM .

Para observar la morfología celular con cada uno de los tratamientos realizados, se realizó una inmunohistoquímica para α -tubulina, proteína del citoesqueleto.

También se realizó una inmunocitoquímica anti- Tirosina Hidroxilasa (TH-enzima paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas) en células PC12d controles para comprobar que nuestras células eran catecolaminérgicas.

Estudios de producción de ERO en PC12d

Dado que uno de los mecanismos tóxicos de la rotenona es la producción de ERO y la consecuente generación de estrés oxidativo en la célula y que la quercetina tendría un efecto antioxidante (directo e indirecto), evaluamos los niveles de ERO en nuestro paradigma experimental con células PC12d utilizando la sonda DCF-DA. Primero se realizó una curva temporal de producción de ERO (1, 3, 6 y 24 hs) luego de la administración de la toxina a las dosis que induce un 50% de muerte celular

Una vez identificados el tiempo de mayor producción de ERO por la rotenona, se utilizó ese tiempo post-rotenona para evaluar el efecto de la quercetina realizando un pretratamiento con la misma. Para este ensayo se utilizó la concentración de quercetina a la cual se observó la mayor protección.

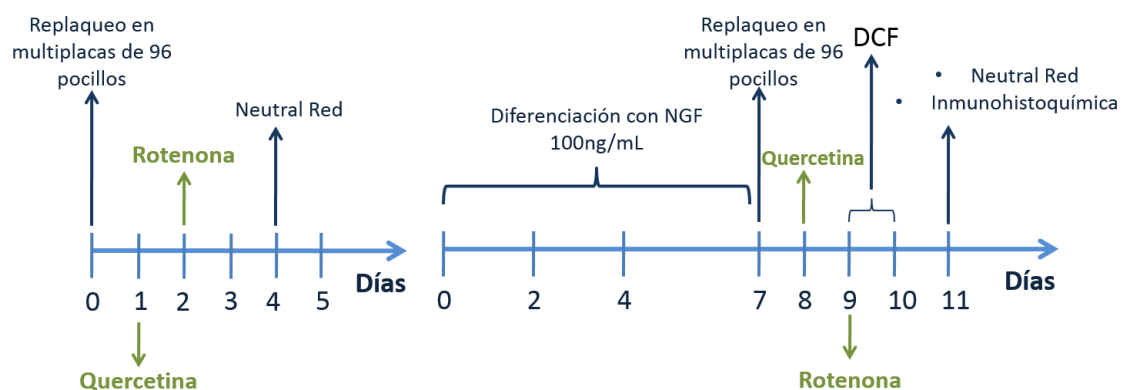


Figura 3: Esquema temporal de tratamientos con rotenona y quercetina y ensayos realizados. A la izquierda se encuentra el esquema temporal para células PC12 naive, mientras que a la derecha de la figura se observa el esquema temporal para células PC12 diferenciadas.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CÉLULAS PC12

Mantenimiento

La línea celular PC12 (PC12 naive) se mantuvo en botellas de cultivo en medio RPMI (Sigma, USA), con 10% suero de caballo (Gibco, USA), 5% de suero fetal bovino (PAA Laboratories, Austria) y 100µg/mL de penicilina (Sigma, USA) y 100 U/mL de streptomycin (Sigma, USA). Para inducir la adherencia de las células al plástico se utilizó colágeno (Gibco, USA). Para ello, las superficies se cubrieron con una solución de 50 µg/mL de colágeno diluido en 0,01% de ácido acético. Luego de por lo menos 2 hs de polimerización y lavado del exceso de colágeno con agua, se plaquean las células.

Los cultivos fueron mantenidos en una estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturada.

A las células crecidas en las botellas se les cambó 2/3 del medio cada 2-3 días y luego de 7 días, cuando alcanzan confluencia, fueron repicadas. Para ello, las células fueron despegadas mecánicamente en el mismo medio en el que se encuentran utilizando una pipeta Pasteur de punta redondeada por calor. Se cuantificó la densidad celular utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 1,5 millones de células en 7 mL de medio por botella de cultivo de 50 mL.

Diferenciación

Para llevar a cabo la diferenciación celular, se colocaron aproximadamente 2 millones de células en botellas cubiertas con colágeno (de igual manera que para las PC12 naive), en un volumen final de 5 mL de RPMI con 100ng/mL de NGF recombinante de rata (Novoprotein, USA). Cada dos días se le agregó la misma cantidad de NGF sin cambiar el medio en el que se encuentran las células. Luego de pasados 7 días en presencia de NGF, las células PC12 diferenciadas (PC12d) fueron replaqueadas para los experimentos.

Replaqueo

Para los experimentos las células fueron replaqueadas en multiplacas. Las células naive se plaquearon en multiplacas de cultivo de 96 pocillos, con una densidad de 20000 células/ pocillo. Las células diferenciadas se plaquearon a una densidad de 25000, 150000 y 300000 células/ pocillo en placas de 96, 48 o 24 pocillos, respectivamente.

6.2 TRATAMIENTOS

Tratamiento con rotenona

Luego de pasadas 48 horas del plaqueo de las células en multiplacas, se realizaron tratamientos con las siguientes dosis de rotenona (Sigma, USA): 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 nM para las PC12 naive y: 1, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100 nM para las PC12d. La solución stock fue preparada en DMSO, y las posteriores diluciones se realizaron en medio. En ambos casos, la solución con la toxina se agregó en un volumen igual o cercano al 5% del volumen final. En todos los experimentos se incluyó el tratamiento con el vehículo de rotenona como control.

Tratamiento con quercetina

Luego de pasadas 24 horas del replaqueo en multiplacas, se trataron las células con diferentes concentraciones de quercetina (Xi'an Sino-Dragon I/E Co., Ltd., China) Para el caso de las células PC12 naive, se trataron con las siguientes concentraciones: 10, 25, 50 y 100 μ M, Mientras que para el caso de las células PC12 diferenciadas, se trataron con las dosis: 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μ M. La solución stock fue preparada en DMSO y todas las diluciones posteriores fueron preparadas en medio RPMI y 10% DMSO. La solución con el flavonoide se agregó en un volumen igual o cercano al 4% del volumen final. En todos los experimentos se incluyó el tratamiento con el vehículo de quercetina como control.

6.3 EVALUACIÓN SOBREVIDA CELULAR

Para evaluar la supervivencia celular se utilizó el método del Rojo Neutro, el mismo provee una estimación cuantitativa de la cantidad de células viables. Se basa en la capacidad de las células vivas de captar el colorante Rojo Neutro y acumularlo en los lisosomas. Este compuesto penetra las membranas celulares por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas uniéndose por interacciones electrostáticas a la matriz lisosomal [54]. Cuando las células mueren, el compuesto no puede ser retenido en el interior de las mismas. Por lo tanto, la cantidad de compuesto retenido es proporcional a la cantidad de células vivas [54].

Protocolo: luego de pasadas 48 horas de la incubación con rotenona, se agregó Rojo Neutro (Sigma, USA) al medio en el que se encuentran las células a una concentración final del compuesto de 25 µg/mL y se incubó durante 3 horas a 37°C.

Luego, se descartó el medio y se lavó con PBS. Se descartó el PBS, se agregó 100 µL de una solución 50% metanol, 49% agua y 1% ácido acético y se incubó con agitación durante 10 minutos. Este último paso permite extraer de las células el Rojo Neutro retenido. La absorbancia a 540 nm se midió en un lector de placas (Varioskan Flash, Thermo Scientific, USA).

6.4 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ERO

La producción intracelular de ERO fue determinada utilizando la sonda 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este compuesto al ser aniónico y apolar atraviesa las membranas, y una vez en el interior celular es modificado por esterasas, convirtiéndolo en DCFH. En presencia de ERO, el DCFH es oxidado a DCF, compuesto fluorescente (pico de absorción a 485 nm, y emisión a 530 nm). La fluorescencia emitida puede ser cuantificada para determinar la producción intracelular de ERO [55].

Protocolo: Se trataron a las células con DCFH-DA a una concentración final de 50 µM, y se lo incubó durante 30 minutos a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se descartó el medio y se lavó una vez con PBS. La fluorescencia emitida por las células se midió a 530 nm en un lector de placas (Varioskan, USA).

6.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica que tiene como objetivo detectar un antígeno de interés (proteína o macromolécula específica) dentro de un tejido o cultivo celular, para

luego poder visualizar el marcaje por microscopía. Es una técnica que se basa en la interacción antígeno- anticuerpo.

Para realizar este ensayo, se utiliza un anticuerpo primario, que es capaz de reconocer a mi antígeno de interés. En general, se utiliza un anticuerpo secundario capaz de reconocer a mi anticuerpo primario, anticuerpo secundario el cual está asociado a alguna sustancia (por ejemplo, un fluoróforo) que tenga alguna característica para ser detectado, como absorber o emitir luz, o producir coloración a una longitud de onda determinada.

Protocolo: En el día 11, los cultivos PC12 diferenciadas fueron fijados con PFA/sucrosa (4%/5%) a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron las células 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con 0.1% tritón X-100 en PBS durante 15 minutos, con el fin de permeabilizar las membranas para permitir el ingreso del anticuerpo primario. Luego de 3 nuevos lavados con PBS se procedió tratar las células con BSA 5% en PBS durante 30 minutos. El objetivo de este paso es evitar cualquier interacción inespecífica del anticuerpo primario.

Para finalizar los tratamientos del primer día, se incubó con anticuerpo primario anti- α -tubulina (monoclonal, producido en ratón, Sigma- Aldrich, USA, dilución 1/2000) y anti- α -TH (policlonal, producido en conejo, Thermo Scientific, USA dilución 1/1000) diluidos en 5% BSA over night.

Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se realizan 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno. Inmediatamente después se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti- ratón (Jackson Immuno Research, USA) para evidenciar la tubulina y con Cy3 anti-conejo (Jackson Immuno Research, USA) para evidenciar la TH, ambos diluidos 1/800 también en BSA 5% en PBS durante una hora. Siguiendo a esto, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron dos lavados finales con PBS durante 10 minutos cada uno.

Con el fin de poder observar los núcleos, se incubaron las células con Hoechst diluido en PBS (1 μ g/mL) durante 10 minutos. Hoechst es un colorante que se intercala en el ADN y por esta razón, los núcleos pueden ser observados.

Finalmente se lavaron las células dos veces con PBS durante 10 minutos. La marcación se observó por microscopía de epifluorescencia (microscopio Olympus IX81) o confocal (Olympus BX61).

6.6 ANÁLISIS DE DATOS

La significancia estadística se evaluó utilizando el test de ANOVA y posteriormente se aplicó el test post-Tukey. Los datos se expresaron como la media \pm SEM respecto al control. Para cada estudio, se realizaron por lo menos 3 experimentos por cuadruplicado.

7 RESULTADOS

7.1 PC12 NAIVE

Efecto de rotenona sobre la sobrevivencia celular

El tratamiento con rotenona (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 nM) durante 48 horas, indujo una disminución de la sobrevivencia celular de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 100 nM la que causó una muerte cercana al 50% (Figura 4). Por ello, se seleccionó esta dosis para ser utilizada en los estudios de la posible protección por el flavonoide quercetina.

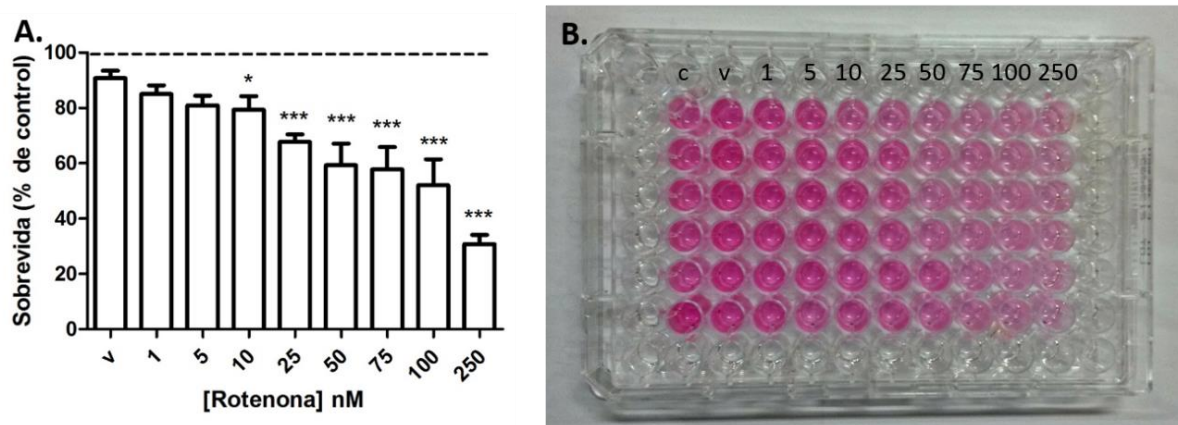


Figura 4: Efecto de la rotenona sobre la sobrevivencia de células PC12 naive. Porcentaje de sobrevivencia celular con respecto a células controles, luego del tratamiento con rotenona 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 nM durante 48 hs. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM * $p < 0,005$ *** $p < 0,001$ respecto al vehículo, test ANOVA una vía seguido del test post- Tukey. $N = 5$. Ejemplo de experimento de sobrevivencia celular para curva dosis-respuesta de rotenona teñido con Rojo Neutro.

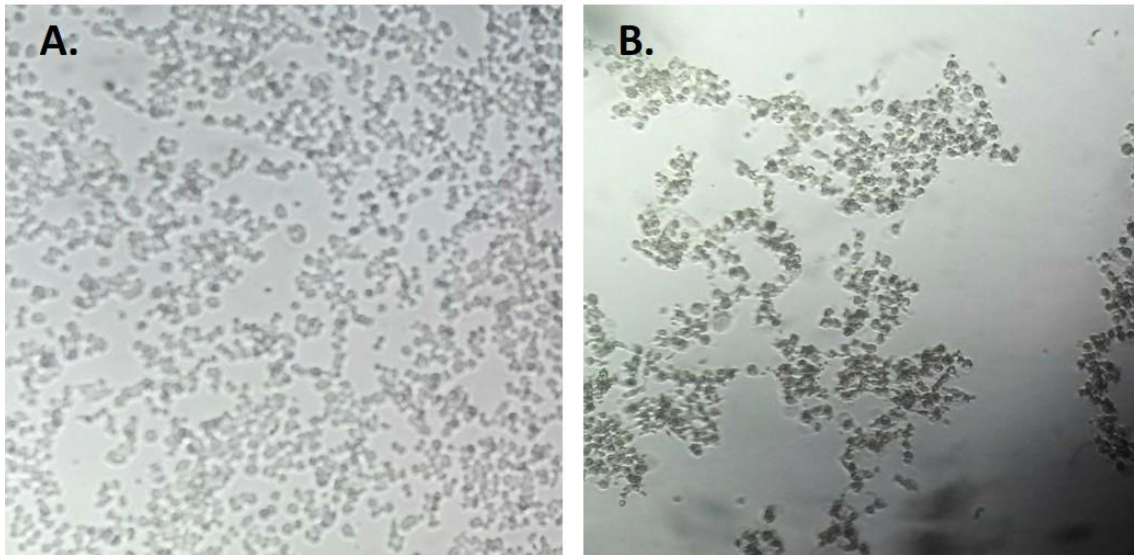


Figura 5: *Sobrevida celular en células PC12 naive. Se muestran fotos de campo claro representativas de A. Células controles. Y B. Células tratadas durante 48hs con rotenona 100 nM. Fotografías tomadas con aumento 100x.*

Estudios de la protección por quercetina frente al daño por rotenona

El tratamiento con quercetina, (10, 25, 50, 100 μM) durante 72 hs evidenció que a partir de 50 μM el flavonoide presenta toxicidad para las células PC12 naive (Figura 6 B).

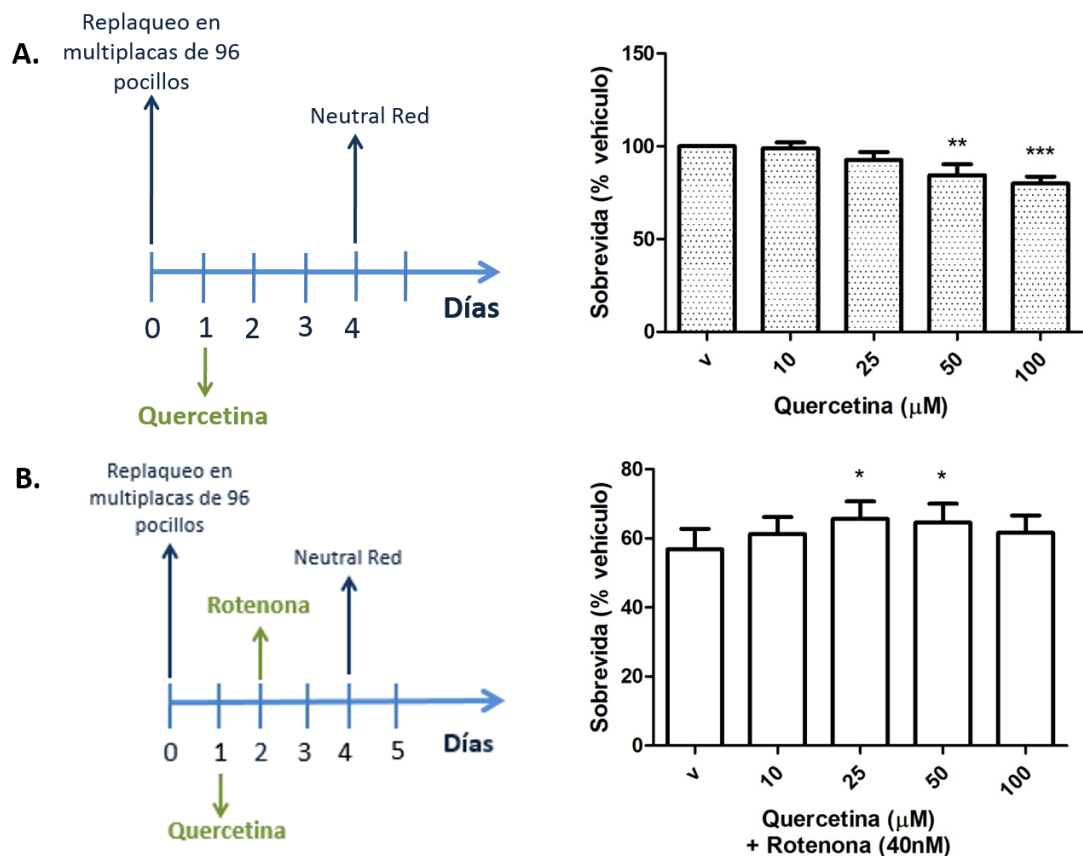


Figura 6: Efecto de la quercetina sobre la supervivencia de células PC12 naive A. Supervivencia celular luego del tratamiento con diferentes dosis de quercetina B. Supervivencia celular luego del tratamiento con rotenona 100 nM y pretratamiento con quercetina a diferentes concentraciones. Los esquemas indican el protocolo experimental utilizado. Los datos fueron expresados como porcentaje de la media \pm SEM respecto al vehículo *p < 0,005 **p < 0,001 ***p < 0,0001, test ANOVA de una vía seguido del test post - Tukey. N= 7.

Por otra parte, el pretratamiento con quercetina 25 μM y 50 μM , indujo un aumento moderado pero significativo en la supervivencia celular luego del tratamiento con rotenona 100 nM (figura 6C).

7.2 PC12 DIFERENCIADAS

Se realizó un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-TH para corroborar que las células PC12d son catecolaminérgicas. En la figura 7B se observan las células PC12d positivas para TH.

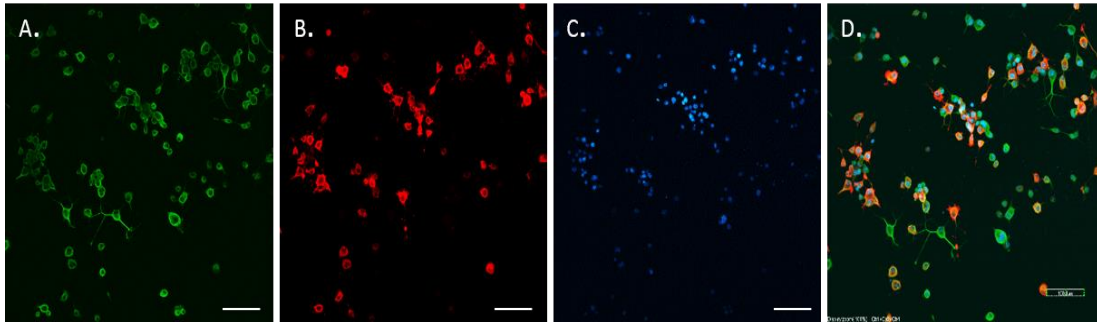


Figura 7: *Inmunohistoquímica de células PC12d. A. Células PC12d marcadas con α -tubulina (verde). B. Células PC12d marcadas con anticuerpo anti- TH (rojo). C. Núcleos marcados con Hoechst (azul). D. Co- inmunomarcación con α -tubulina, TH y Hoechst. Las imágenes fueron tomadas utilizando microscopía confocal. Escala: 100 μ m.*

Efecto de rotenona sobre la sobrevivida de células

El tratamiento con rotenona (1, 5, 10, 20, 40 y 100 nM) durante 48 horas indujo una disminución de la sobrevivida celular de manera dosis dependiente (Figura 8). Como en los estudios en las células naive, se seleccionó la dosis de rotenona que causó una muerte cercana al 50% para ser utilizada en los estudios de la posible protección por el flavonoide quercetina, que para las PC12 d fue de 40 nM.

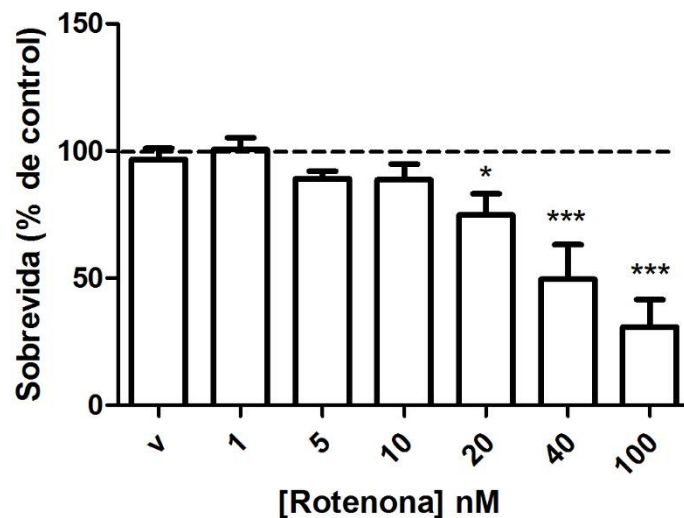


Figura 8: *Efecto de la rotenona sobre la sobrevivida de células PC12 diferenciadas. Porcentaje de sobrevivida celular con respecto células controles, luego del tratamiento con rotenona 1, 5, 10, 20, 40, 100 nM durante 48 hs. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM * p <0,005 *** p <0,001 respecto al vehículo, test ANOVA una vía seguido del test post- Tukey. N= 5.*

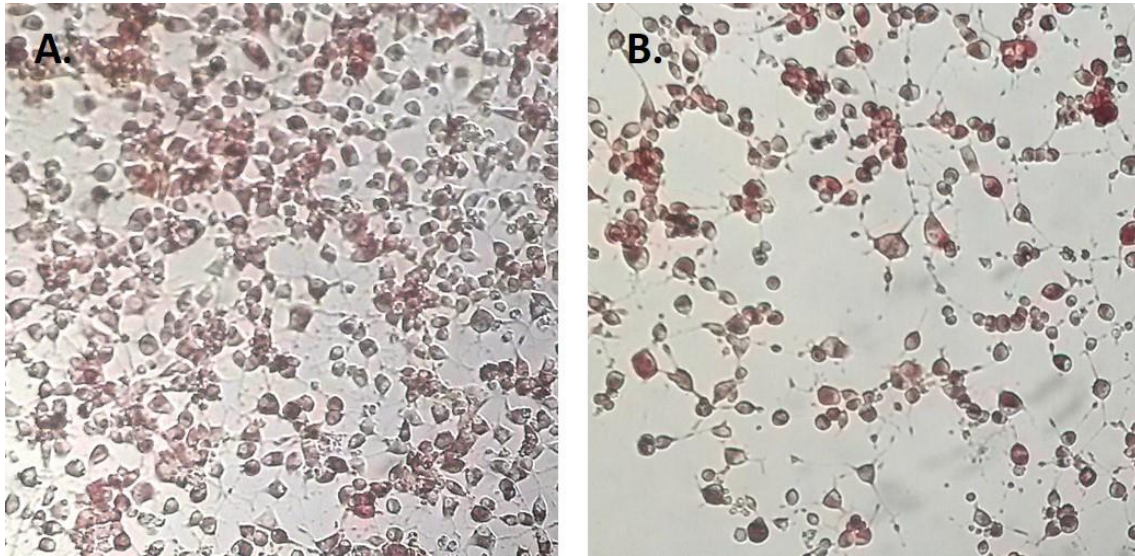


Figura 9: Ensayo de sobrevivencia con Rojo Neutro en células PC12d. Se muestran fotos de campo claro representativas de A. Células control. B. Células tratadas durante 48 horas con rotenona 40nM teñidas con Rojo Neutro. Fotografías tomadas con aumento 200x.

Estudios de la protección por quercetina frente al daño por rotenona

El tratamiento con quercetina, (10, 25, 50, 100 μM) durante 72 hs evidenció, al igual que en PC12 naive, que a partir de 50 μM el flavonoide presenta toxicidad en células PC12 diferenciadas (Figura 10B).

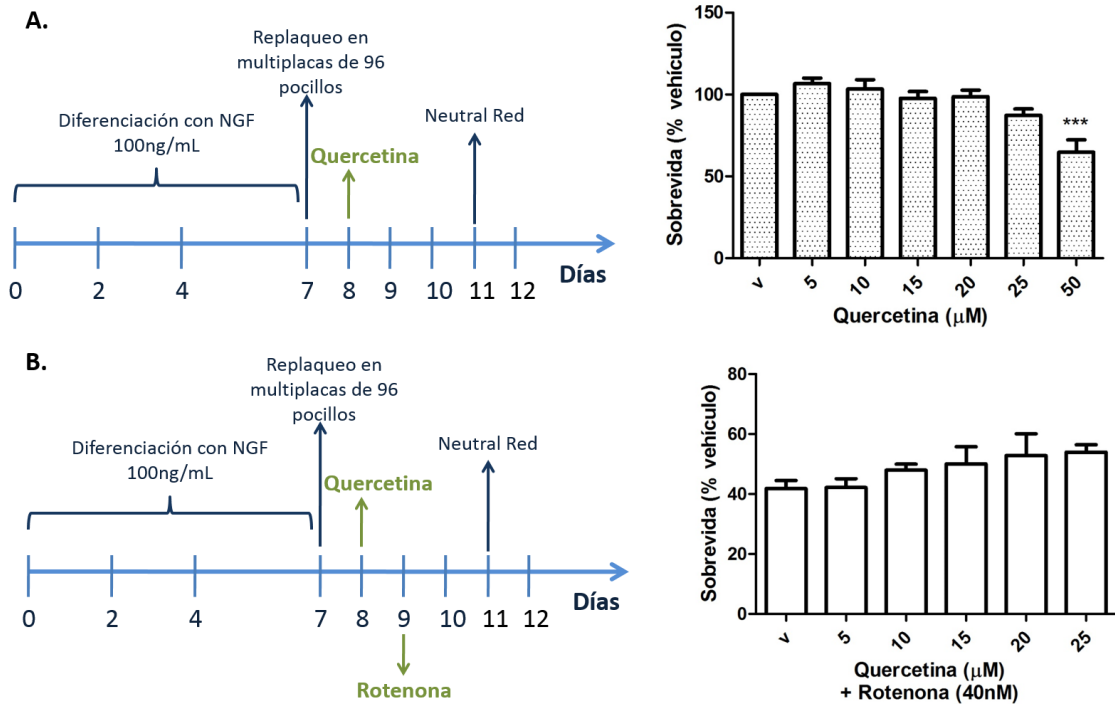


Figura 10: Efecto de la quercetina sobre la sobrevivencia de células PC12d. A. Sobrevivencia celular luego del tratamiento con diferentes dosis de quercetina B. Sobrevivencia celular luego del tratamiento con rotenona 40 nM y pretratamiento con quercetina a diferentes concentraciones. Los esquemas indican el protocolo experimental utilizado. Los datos fueron expresados como porcentaje de la media \pm SEM respecto al vehículo *** $p < 0,0001$, test ANOVA de una vía seguido del test post - Tukey. N= 7.

Por otra parte, el pretratamiento con quercetina no modificó significativamente la sobrevivencia celular luego del tratamiento con rotenona 40 nM (figura 10C). Las dosis de 20 y 25 nM de quercetina muestran una tendencia a aumentar la sobrevivencia de las células tratadas con rotenona, pero dicho aumento no fue significativo.

Inmunohistoquímica

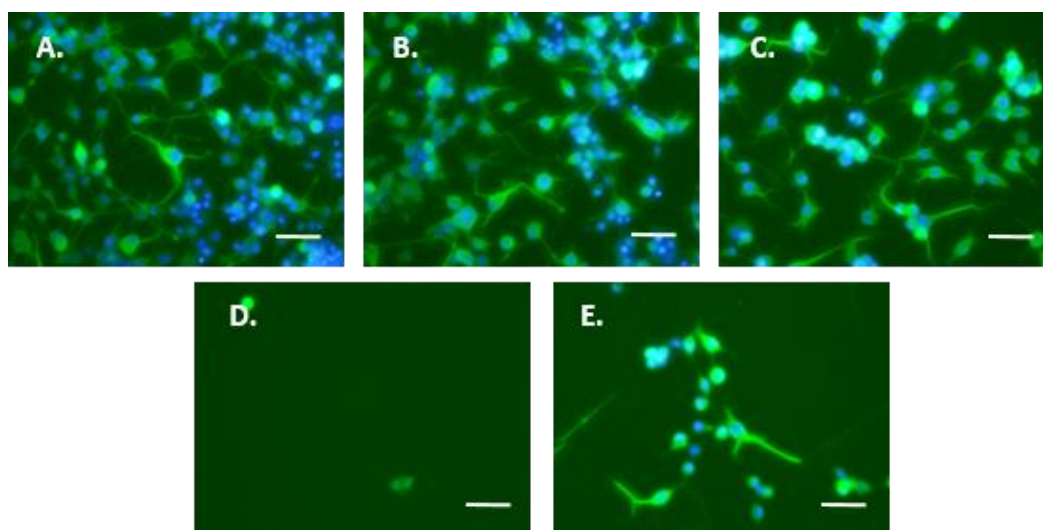


Figura 11: Células PC12d marcadas con α -tubulina (verde) y Hoescht (azul). A. Control. B. Vehículo. C. Quercetina 20 μ M durante 72 hs. D. Rotenona 40 nM durante 48 hs. E. Quercetina y rotenona. Escala: 100 μ m.

Con el fin de observar la morfología de los cultivos después de los diferentes tratamientos se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con α -tubulina y co-marcaje con Hoechst para observar los núcleos. Las imágenes indican que la rotenona disminuye la densidad celular, y a su vez, las células remanentes tienden a presentar somas redondeados y procesos ausentes o más cortos. Luego del tratamiento con quercetina y rotenona las imágenes sugieren que hay mayor número de células presentes y con morfología más saludable que los cultivos tratados con rotenona sin flavonoide.

Evaluación del efecto de la rotenona y la quercetina sobre la producción de ERO

En la figura 12 se observa el efecto temporal de la producción de ERO (1, 3, 6, y 24 hs inducido por la rotenona).

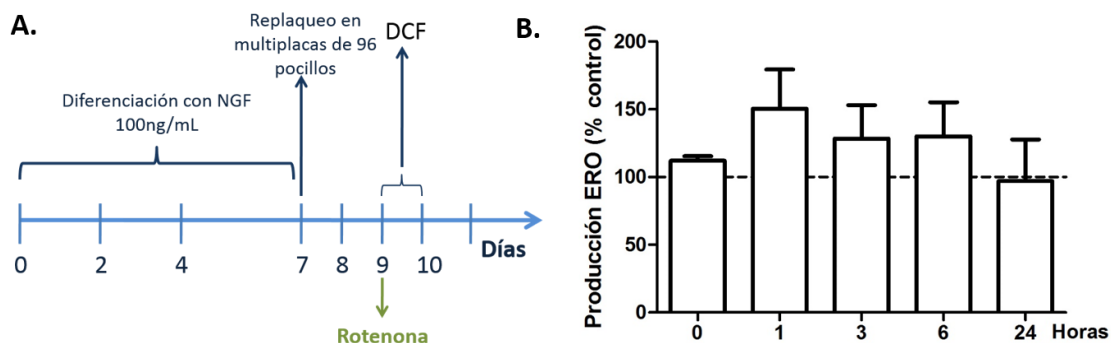


Figura 12: Efecto de la rotenona en la producción de ERO en diferentes tiempos. A. Esquema del protocolo experimental utilizado. B. Curva temporal (0, 1, 3, 6, 24 horas). Porcentaje de producción de ERO con respecto al control luego del tratamiento con rotenona 40 nM. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM. N= 3.

En todos los tiempos evaluados (1, 3, 6, y 24 hs) se observó una tendencia a aumentar el nivel de ERO luego del tratamiento con rotenona, siendo el tiempo 1 hora el que mostró mayor aumento luego del tratamiento ($p=0,0593$).

De acuerdo a estos resultados, el efecto de la quercetina sobre la producción de ERO inducida por rotenona se evaluó 1 hora post toxina. Para este ensayo se utilizó la concentración de quercetina que mostró mayor protección y no toxicidad en los ensayos de sobrevivida ($20\mu\text{M}$). Los resultados indican que el pretratamiento con quercetina tiende a disminuir (aunque no significativamente) el aumento de ERO luego del tratamiento con rotenona.

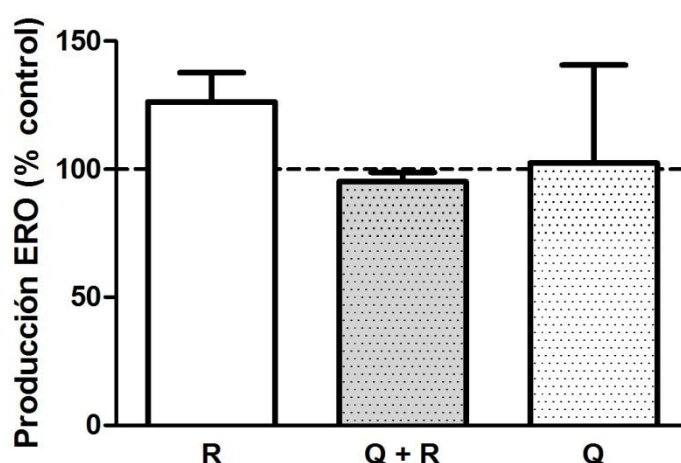


Figura 13: Efecto de la quercetina sobre la producción de ERO. Porcentaje de producción de ERO con respecto al control, luego del tratamiento durante 1 hora con rotenona 40 nM. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM. N= 3.

8 DISCUSIÓN

En esta trabajo se realizó la puesta a punto de un modelo de EP experimental utilizando la neurotoxina rotenona en células PC12 naive y diferenciadas, para luego poder determinar el posible efecto neuroprotector del flavonoide quercetina.

8.1 MODELO EXPERIMENTAL DE EP

Con el fin de poner a punto el modelo de EP, los cultivos, tanto de células PC12 naive como de PC12 diferenciadas fueron tratados con rotenona a diferentes concentraciones. La concentración de toxina que indujo una muerte celular cercana a un 50%, porcentaje de muerte adecuado para realizar los posteriores ensayos de neuroprotección, fue de 100 nM y 40 nM, para células naive y diferenciadas, respectivamente. Por lo tanto, las células PC12d resultaron más sensibles que las PC12 naive a la rotenona ya que fue suficiente una concentración menor de la toxina para obtener el mismo porcentaje de sobrevida celular.

Esta mayor sensibilidad encontrada en las células PC12d, puede deberse a que las PC12 luego del tratamiento con NGF, adquieren características que las hacen más similares a neuronas. Varios estudios sugieren que el fenotipo neuronal tiene una dependencia crítica con la correcta función mitocondrial. Las neuronas poseen una alta tasa metabólica, y debido a su morfología requieren de una gran cantidad de ATP para poder mantener los gradientes iónicos a través de las membranas, fundamental para el correcto funcionamiento de la neurotransmisión [56]. La prevalencia de enfermedades del sistema nervioso asociadas a mutaciones en genes mitocondriales hace evidente una estrecha relación entre neuronas y mitocondria [57].

Por otro lado, las células PC12 naive, al ser células tumorales con alta tasa de proliferación, podrían tener un metabolismo menos dependiente de la función de la mitocondria. Es sabido que las células tumorales obtienen gran parte de su energía a través de la fermentación láctica, aún en condiciones aeróbicas, condición que se conoce como efecto Warburg [58]. Esto no ocurre con los tejidos normales, en donde, en presencia de oxígeno, la respiración aeróbica es la principal fuente de energía. Teniendo en cuenta esto, y debido a que el principal mecanismo de muerte neuronal inducido por rotenona incluye la inhibición del complejo I mitocondrial, las células PC12d, al depender en mayor medida de la mitocondria que las PC12 naive, serían más sensibles al tratamiento con esta neurotoxina. Esta marcada sensibilidad no solo se podría deber a una mayor

disminución en los niveles de ATP, sino también a una mayor producción de ROS al bloquear la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Es importante destacar que el modelo de EP puesto a punto durante este trabajo puede ser usado para futuros estudios del laboratorio, como ensayar el perfil neuroprotector de diferentes moléculas o estudiar sus mecanismos de acción.

8.2 EFECTO DE LA QUERCETINA EN EL MODELO DE EP

Para determinar si la quercetina es neuroprotectora en este modelo, se evaluó un protocolo de pretratamiento utilizando un rango de concentraciones de quercetina entre 10 y 100 μ M para las células PC12 naive. Este rango de concentraciones fue elegido basados en datos previos del laboratorio, que habían determinado que a partir de 100 μ M, la quercetina era tóxica en un modelo de cultivo primario de granos de cerebelo [46,59]. En el caso de las células PC12d el rango de dosis utilizado fue entre 5 y 50 μ M.

En primer lugar, se evaluó si la quercetina resultaba tóxica en alguna las concentraciones indicadas. Para ambos tipos celulares, la quercetina resultó ser significativamente tóxica a partir de la concentración 50 μ M. Esto probablemente se deba a los efectos prooxidantes, apoptóticos, antiproliferativos y citotóxicos ya descritos para altas dosis de este flavonoide [59]. El efecto prooxidante de esta molécula se explica por la presencia de los grupos hidroxilo en la posición orto del anillo B, los cuales son susceptibles a sufrir autooxidación, y por su metabolización enzimática que genera semiquinonas o quinonas [59].

Resulta interesante, el hecho que la quercetina resultó ser tóxica a la misma concentración (50 μ M) tanto en las PC12 naive como las PC12d, mientras que para rotenona resultaron más sensibles las PC12d. Esto refuerza el hecho de que las PC12d al tener más características de neuronas, tienen una mayor dependencia con la mitocondria, y por lo tanto la rotenona las afecta en mayor medida. A diferencia de la rotenona, el mecanismo por el cual resulta ser tóxica la quercetina involucraría el aumento de ERO por la oxidación del flavonoide, lo cual ocurriría tanto en PC12 naive como en PC12d.

En cuanto a los estudios de los efectos neuroprotectores de la quercetina, el protocolo llevado a cabo consistió en un pretratamiento de quercetina 24hs previas al insulto con rotenona. Esta preincubación permitió que el flavonoide pueda actuar no solo directamente, sino también por la inducción de vías intracelulares.

Para las células PC12 naive, se observó un pequeño aumento significativo en la sobrevivencia celular con respecto al vehículo para las concentraciones 25 μM (aumento de 8,8%) y 50 μM (aumento de 7,8%) de quercetina. En la concentración de quercetina igual a 50 μM , se observó tanto neuroprotección como toxicidad (disminución de la sobrevivencia de 15,5%). Este efecto dual de la quercetina ya ha sido observado en estudios previos del laboratorio y puede ser explicado porque a las concentraciones que comienzan a ser tóxicas, las propiedades prooxidantes de la quercetina pueden generar una producción moderada de ERO, así como una depleción parcial de glutatión, uno de los principales antioxidantes endógenos. Esto alteraría el estado redox intracelular, generando una situación de estrés oxidativo moderado que podría llevar a la activación de la expresión de los genes antioxidantes inducido por factores de transcripción sensibles al estado redox [59]. Un ejemplo es el factor de transcripción Nrf2, que al ser activado por la quercetina induce el aumento del gen que codifica para la γ -glutamil cisteína sintetasa, enzima limitante en la síntesis de glutatión [47].

En cuanto a las células PC12d, se observa una tendencia neuroprotectora a 20 y 25 μM , pero que no es significativa. En estas células no se ensayó la dosis de 50 μM por la alta toxicidad que mostró en los ensayos de sobrevivencia (disminución de la sobrevivencia del 35,2%).

El porcentaje de aumento de la sobrevivencia con el tratamiento de quercetina fue similar para las PC12 naive y PC12d, cercano a un 10%. Antecedentes del laboratorio muestran que la quercetina protege hasta de un 80% de las células en un paradigma de células PC12 naive frente al daño por H_2O_2 [60]. Por lo tanto, la protección de quercetina observada en el modelo por daño de rotenona no parece ser relevante.

Los resultados obtenidos por ensayos de sobrevivencia, se conciben con lo observado en los ensayos de inmunohistoquímica. Por un lado se pudo observar una menor densidad celular luego de la exposición durante 48hs con rotenona, la cual resultó ser mayor al 50% observado en los ensayos de sobrevivencia debido a la poca adherencia que las PC12d poseen (luego de los sucesivos lavados incluidos en el protocolo para estudios de inmunofluorescencia, la cantidad de células remanente fue pequeña). Las células que permanecieron adheridas luego del tratamiento con rotenona no presentaron procesos o tenían neuritas cortas, lo que indica sufrimiento celular. Por otro lado, luego del pretratamiento con quercetina se observaron células más saludables, con procesos más largos y morfología menos redondeada, indicando un posible efecto de protección.

Estas diferencias encontradas entre los resultados de este trabajo y los antecedentes del laboratorio, sugieren que la muerte neuronal inducida por rotenona incluiría otros mecanismos más allá del aumento de ERO producido por la inhibición del complejo I mitocondrial. En principio los ensayos realizados con DCF reforzarían esta idea, ya que luego del pretratamiento con quercetina, se observa una disminución en el porcentaje de producción de ERO a la hora del tratamiento con rotenona. Esta disminución no resultó ser significativa debido a un N pequeño y variabilidad importante (N=3), son necesarios más estudios para concluir sobre este punto. Estos resultados indicarían que si bien la quercetina es capaz de reducir los niveles de estrés oxidativo inducido por la rotenona, esto no es suficiente para ejercer un efecto neuroprotector fuerte, quizás por su falta de acción sobre otros mecanismos de muerte inducidos por la toxina.

Uno de los mecanismos tóxicos de la rotenona independiente de la producción de ERO podría ser la formación de agregados proteicos tipo cuerpos de Lewy, ricos en α -sinucleína [12,19]. La rotenona también podría afectar la vía autofágica- lisosomal. Ha sido reportado que la rotenona reduce la expresión de una chaperona clave en este proceso, la Hsc70 [10,17]. Esta reducción podría ser uno de los mecanismos que conduciría a un aumento en los depósitos de α -sinucleína. Cabe destacar, que esta alteración en la expresión de Hsc70 no fue observada luego del tratamiento con H₂O₂ [17], por lo tanto, esta reducción no estaría directamente determinada por el aumento en la producción de ERO. El déficit bioenergético causado por la inhibición del complejo I también podría estar involucrado en la deficiencia del control de proteínas por autofagia [16]. Otro mecanismo que podría contribuir a la muerte neuronal por rotenona, es la inhibición del ensamblaje de microtúbulos, lo que afectaría, entre otras cosas, al transporte vesicular [14].

9 CONCLUSIÓN

Durante la realización de esta tesina, se logró poner a punto un modelo de EP en células PC12 naive y Pc12d por exposición a rotenona. La quercetina, en este modelo no mostró un efecto neuroprotector importante. Esto probablemente se deba a que, a pesar de que la quercetina disminuye el estrés oxidativo generado por la toxina, no logre contrarrestar otros de los mecanismos de muerte neuronal inducidos por rotenona.

10 PERSPECTIVAS

- Confirmar que la muerte neuronal inducida por rotenona no ocurre exclusivamente por aumento en la producción de ERO. Para estudiar esto se podría evaluar el efecto de un antioxidante clásico como Trolox (análogo a vitamina E) administrado concomitantemente con la toxina: si el antioxidante no es neuroprotector frente a la toxicidad de rotenona es probable que la muerte no sea exclusivamente por estrés oxidativo.
- Estudiar los otros posibles mecanismos de acción tóxicos en los que participa la rotenona:
 - Valorar el desbalance energético, evaluando el cociente $NAD^+/NADH$ utilizando técnicas cromatográficas como HPLC.
 - Estudiar la desestabilización de los microtúbulos inducida por rotenona. Para esto, se podrían realizar ensayos de sobrevivencia en células tratadas con rotenona, y estudiar si utilizando una droga estabilizadora de microtúbulos como taxol, se revierte el efecto.
 - Estudiar el efecto de rotenona en la expresión de la chaperona Hsc70 en nuestro modelo mediante ensayos de Western blot.
- Evaluar terapias combinadas para contrarrestar la toxicidad de rotenona, dirigidas a diferentes blancos celulares, por ejemplo quercetina con nicotinamida o quercetina con taxol.
- Estudiar los efectos de la quercetina en otros modelos de EP, como por ejemplo con 6-OHDA, cuyo mecanismo de muerte neuronal es principalmente por aumento en la producción de ERO, o MPP⁺ cuyo mecanismo de muerte neuronal se asemeja más al de la rotenona, ya que involucra la inhibición del complejo I mitocondrial.

11 REFERENCIAS

- [1] MC de R, MB B, JH den B, al et. Dietary antioxidants and parkinson disease: The rotterdam study. *Arch Neurol* 1997;54:762–5.
- [2] Singh N, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81:29–44. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.11.009.
- [3] Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2012;211:51–76. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.057.
- [4] Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease

- mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013;62:132–44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018.
- [5] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909. doi:S0896627303005683 [pii].
- [6] Tsang AHK, Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2009;1792:643–50. doi:10.1016/j.bbadis.2008.12.006.
- [7] Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2003;23:10756–64. doi:23/34/10756 [pii].
- [8] Vera Dias, Eunsung Junn MMM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J Park Dis* 2014;3:461–91. doi:10.3233/JPD-130230.The.
- [9] McNaught KSP, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;297:191–4. doi:10.1016/S0304-3940(00)01701-8.
- [10] Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso J a, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol* 2010;67:1464–72. doi:10.1001/archneurol.2010.198.
- [11] Wang BS, Yang Y, Yang H, Liu YZ, Hao JJ, Zhang Y, et al. PKC?? counteracts oxidative stress by regulating Hsc70 in an esophageal cancer cell line. *Cell Stress Chaperones* 2013;18:359–66. doi:10.1007/s12192-012-0389-4.
- [12] Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics* 2014;11:92–110. doi:10.1007/s13311-013-0234-1.
- [13] Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2010;1802:167–85. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.004.
- [14] Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem* 2005;280:34105–12. doi:10.1074/jbc.M503483200.
- [15] Srivastava P, Panda D. Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J* 2007;274:4788–801. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06004.x.
- [16] Yap YW, Llanos RM, La Fontaine S, Cater MA, Beart PM, Cheung NS. Comparative Microarray Analysis Identifies Commonalities in Neuronal Injury: Evidence for Oxidative Stress, Dysfunction of Calcium Signalling, and Inhibition of Autophagy–Lysosomal Pathway. *Neurochem Res* 2016;41:554–67. doi:10.1007/s11064-015-1666-2.
- [17] Sala G, Marinig D, Riva C, Arosio A, Stefanoni G, Brighina L, et al. Rotenone down-regulates HSPA8/hsc70 chaperone protein in vitro: A new possible toxic mechanism contributing to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2016;54:161–9. doi:10.1016/j.neuro.2016.04.018.
- [18] Arduino DM, Esteves AR, Cortes L, Silva DF, Patel B, Grazina M, et al. Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum Mol Genet* 2012:dds309.

- [19] Sai Y, Wu Q, Le W, Ye F, Li Y, Dong Z. Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicol Vitro* 2008;22:1461–8. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.019.
- [20] Porcal W, Hernández P, González M, Ferreira A, Olea-Azar C, Cerecetto H, et al. Heteroarylnitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *J Med Chem* 2008;51:6150–9.
- [21] Koppula S, Kumar H, More SV, Kim BW, Kim IS, Choi D-K. Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 2012;13:10608–29.
- [22] Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1407–35.
- [23] Magalingam KB, Radhakrishnan AK, Haleagrahara N. Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson ' s Disease. *Hindawi Publ Corp* 2015;2015.
- [24] Cooper-Driver GA, Bhattacharya M. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 1998;49:1165–74.
- [25] Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2900–16.
- [26] Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr* 2002;76:93–9.
- [27] Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hertog MGL, Hollman PCH, Hertog MGL, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007–11. doi:10.1016/0140-6736(93)92876-U.
- [28] Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 1996;156:637–42.
- [29] Dajas F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Echeverry C, Andrés A-CJ, Florencia A, et al. Neuroprotective Actions of Flavones and Flavonols: Mechanisms and Relationship to Flavonoid Structural Features. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2013;13:1–6. doi:10.2174/1871524911313010005.
- [30] Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673–751.
- [31] Dajas F, Arredondo F, Echeverry C, Ferreira M, Morquio A, Rivera F. Flavonoids and the brain: Evidences and putative mechanisms for a protective capacity. *Curr Neuropharmacol* 2005;3:193–205. doi:10.2174/1570159054368303.
- [32] Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radic Biol Med* 2001;30:583–94.
- [33] Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 2003;78:517S–520S.

- [34] Shen LI. Neuroprotective Effect of Kaempferol against a 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson ' s Disease. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1291–6.
- [35] Yu X, He GR, Sun L, Lan X, Shi LL, Xuan ZH, et al. Assessment of the treatment effect of baicalein on a model of Parkinsonian tremor and elucidation of the mechanism. *Life Sci* 2012;91:5–13. doi:10.1016/j.lfs.2012.05.005.
- [36] Li X, He G, Mu X, Xu B, Tian S, Yu X, et al. Protective effects of baicalein against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells and isolated rat brain mitochondria. *Eur J Pharmacol* 2012;674:227–33. doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.181.
- [37] NAGATA H, TAKEKOSHI S, TAKAGI T, HONMA T, WATANABE K. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med* 1999;24:1–11.
- [38] Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992;40:2379–83.
- [39] Ahn TB, Jeon BS. The role of quercetin on the survival of neuron-like PC12 cells and the expression of α -synuclein. *Neural Regen Res* 2015;10:1113–9. doi:10.4103/1673-5374.160106.
- [40] Kääriäinen TM, Piltonen M, Ossola B, Kekki H, Lehtonen Š, Nenonen T, et al. Lack of robust protective effect of quercetin in two types of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian models in rats and dopaminergic cell cultures. *Brain Res* 2008;1203:149–59. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.089.
- [41] Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf* 2009;8:397–409. doi:10.1517/14740330903026944.
- [42] Karuppagounder SS, Madathil SK, Pandey M, Haobam R, Rajamma U, Mohanakumar KP. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 2013;236:136–48. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.01.032.
- [43] Bournival J, Quessy P, Martinoli MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺ -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:1169–80. doi:10.1007/s10571-009-9411-5.
- [44] Zhu M, Han S, Fink AL. Oxidized quercetin inhibits α -synuclein fibrillization. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2013;1830:2872–81. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.027.
- [45] Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, et al. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian J Med Biol Res* 2003;36:1613–20.
- [46] Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, et al. Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: A structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem* 2010;58:2111–5. doi:10.1021/jf902951v.
- [47] Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antúnez K, Jones DP, et al. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative

- insult. *Free Radic Biol Med* 2010;49:738–47. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020.
- [48] Zeng B-Y, Medhurst AD, Jackson M, Rose S, Jenner P. Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech Ageing Dev* 2005;126:760–6.
- [49] Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 2006;26:5256–64.
- [50] Greene LA, Tischler AS, Kuffler SW. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (sympathetic neurons/cell culture catecholamines/differentiation/neurites). *Cell Biol* 1976;73:2424–8. doi:10.1073/pnas.73.7.2424.
- [51] Siddiqui MA, Kashyap MP, Khanna VK, Yadav S, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, et al. Association of dopamine DA-D2 receptor in rotenone-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Toxicol Ind Health* 2010;26:533–42. doi:10.1177/0748233710377776.
- [52] Greene LA, Rein G. Release of [3H] norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. *Brain Res* 1977;138:521–8.
- [53] Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett* 2005;579:4005–11. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.013.
- [54] Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3:1125–31. doi:10.1038/nprot.2008.75.
- [55] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612–6. doi:10.1016/S0891-5849(99)00107-0.
- [56] Kann R O. Mitochondria and Neuronal Activity. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2010;292. doi:10.1152/ajpcell.00222.2006.
- [57] Chen H, Chan DC. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:453–9. doi:10.1016/j.ceb.2006.06.004.
- [58] Ferreira LMR. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Exp Mol Pathol* 2010;89:372–80. doi:10.1016/j.yexmp.2010.08.006.
- [59] Dajas F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Blasina F, Echeverry C, Martínez M, et al. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochem Int* 2015;89:140–8. doi:10.1016/j.neuint.2015.07.002.
- [60] Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, et al. Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2004;91:13–20. doi:10.1016/j.jep.2003.11.012.