



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS.

La cloroquina induce la depleción de zinc en
Drosophila melanogaster y en las células MDCK

TESIS

Que presenta

M. en C. JESSICA PAULINA CAMPOS BLÁZQUEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la tesis: Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Ciudad de México

Abril, 2023

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el laboratorio del Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

Índice

<i>Índice de figuras</i>	4
<i>Resumen</i>	6
<i>Abstract</i>	7
<i>Introducción</i>	8
El zinc en el organismo	8
Homeostasis celular de zinc	10
Almacenamiento de zinc sistémico	12
El zinc se almacena en organelos relacionados a los lisosomas	15
Cloroquina	18
Cloroquina en el almacenamiento de zinc	20
<i>Planteamiento del problema</i>	22
<i>Hipótesis</i>	22
<i>Objetivos</i>	23
<i>Resultados</i>	24
<i>Discusión</i>	34
<i>Conclusiones</i>	38
<i>Materiales y métodos</i>	39
<i>Bibliografía</i>	42

Índice de figuras

Figura 1. Efectos de la deficiencia de zinc sobre las células del sistema inmune.	9
Figura 2. Homeostasis celular de zinc.	11
Figura 3. Los túbulos de Malpighi son el principal reservorio de zinc en <i>Drosophila melanogaster</i> .	13
Figura 4. Localización y anatomía de los túbulos de Malpighi en <i>Drosophila melanogaster</i> .	14
Figura 5. El zinc se almacena en organelos relacionados a los lisosomas.	16
Figura 6. Los agentes lisosomotrópicos se acumulan en los organelos ácidos.	19
Figura 7. La intensidad de fluorescencia de FluoZin-3 incrementa con el tratamiento de cloroquina en células A2780.	21
Figura 8. El tratamiento de cloroquina durante el crecimiento larval disminuye el almacenamiento de zinc en <i>D. melanogaster</i> .	25
Figura 9. El efecto de la cloroquina sobre el almacenamiento de zinc es dosis-dependiente.	27
Figura 10. La cloroquina intensifica la fluorescencia de FluoZin-3 en compartimentos intracelulares.	29

Figura 11. La fluorescencia de FluoZin-3 no correlaciona con los cambios en la concentración de zinc en células MDCK tratadas con cloroquina. 31

Figura 12. La suplementación de zinc en la dieta de *Drosophila* revierte la pérdida de zinc intracelular inducida por cloroquina. _____ 33

Resumen

El zinc es un metal iónico que se distribuye de manera ubicua en todas las células de los eucariontes y se une al 10% de las proteínas codificadas en el genoma humano. El zinc es indispensable para la comunicación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Además, las funciones del sistema inmune dependen del zinc, ya que su deficiencia por desnutrición disminuye las respuestas innata y adquirida, haciendo a los pacientes más propensos a las infecciones. Durante la pandemia por SARS-Cov2, se usó hidroxiclороquina en combinación con zinc, en pacientes hospitalizados, con base en un reporte que proponía que la cloroquina es un ionóforo de zinc, y donde se usaba FluoZin-3 como indicador de su concentración. Nosotros demostramos que las *Drosophila* que crecen en una dieta suplementada con cloroquina pierden hasta un 45% del zinc almacenado y 10% del contenido de potasio, mientras que en las células MDCK, la cloroquina promueve la disminución del 36% de zinc y 48% del potasio. A pesar de que la cloroquina disminuye el zinc intracelular, la señal de FluoZin-3 aumenta debido a que la cloroquina incrementa el pH de los organelos ácidos, dando así un falso positivo. Por lo tanto, la cloroquina no debería considerarse como un ionóforo de zinc. Por otro lado, encontramos que la suplementación con zinc evita su depleción inducida por cloroquina en *Drosophila* y en células MDCK.

Abstract

Zinc is an ionic metal ubiquitously distributed in all eukaryotic cells that binds to 10% of proteins encoded in the human genome. It is essential for cell communication, proliferation, differentiation, and survival. In addition, the immune system depends on zinc because its deficiency due to malnutrition decreases the innate and acquired responses, making patients prone to infections. During the SARS-Cov2 pandemic, hydroxychloroquine was used in combination with zinc supplementation in hospitalized patients, based on a report that proposed that chloroquine is a zinc ionophore, where FluoZin-3 was used as an indicator of its concentration. Here, we show that *Drosophila* growing on a chloroquine-supplemented diet lose up to 45% of their stored zinc and 10% of their potassium content, while in MDCK cells, chloroquine promotes a 36% decrease in zinc and 48% in potassium. Although chloroquine decreases intracellular zinc, the FluoZin-3 signal increases because it also increases the pH of acidic organelles, giving a false positive signal. Therefore, chloroquine should not be considered a zinc ionophore. Furthermore, zinc supplementation prevents chloroquine-induced depletion in *Drosophila* and MDCK cells.

Introducción

El zinc en el organismo

La relevancia del zinc en los organismos se conoce desde 1869, cuando Jules Raulin descubrió que este ion metálico es esencial para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* (Raulin, 1869). Posteriormente, en la década de 1920 se encontró que el zinc es un elemento endógeno y ubicuo en los tejidos humanos, y por lo tanto se propuso que podría tener diversas funciones biológicas (Drinker & Collier, 1926; Maret, 2013). Ahora sabemos que el zinc tiene funciones celulares catalíticas, estructurales y reguladoras. Por una parte, es el cofactor de más de 300 enzimas de diferentes clases (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas) (Vallee & Galdes, 1984), y por lo tanto todas las reacciones en las que éstas participan dependen de la presencia de zinc endógeno. Por otra parte, el zinc juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, ya que promueve la interacción entre el ADN y los factores de transcripción, por medio de los dominios denominados 'dedos de zinc'. La relevancia del zinc en el organismo es tal, que este elemento puede unirse potencialmente a aproximadamente un 10% de las proteínas codificadas por el genoma humano (Andreini et al., 2006) y está involucrado en la comunicación, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Prasad, 2012). Es decir, el zinc endógeno impacta en todos los aspectos de la biología celular.

La importancia de este elemento para la salud humana se puso en evidencia en personas con deficiencia de zinc debida a la desnutrición, que afecta a un 20-25% de la población mundial (Maret & Sandstead, 2006; Sanna et al., 2018). De

hecho, la organización mundial de la salud reporta que la deficiencia de zinc es uno de los cinco factores de riesgo en los países en vías de desarrollo (WHO, 2017). Numerosos estudios demuestran que esta deficiencia se asocia con enfermedades crónicas y metabólicas como la diabetes y el cáncer, y con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Maywald & Rink, 2022).

Además, la deficiencia de zinc compromete las funciones del sistema inmune, tanto la respuesta innata, como la adquirida; ya que disminuye la proliferación, actividad y quimiotaxis de las células que participan en estas respuestas (Figura 1). Por lo tanto, los pacientes con déficit de zinc son más propensos a las infecciones virales, bacterianas y parasitarias (Hojyo & Fukada, 2016; Shankar & Prasad, 1998).

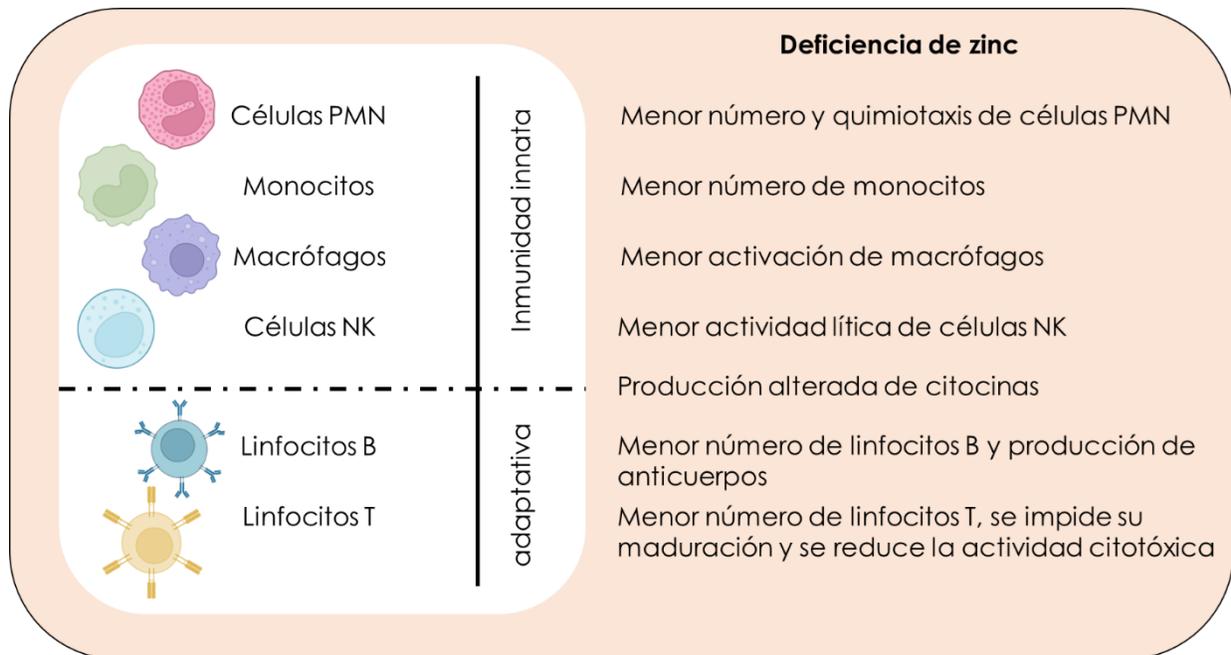


Figura 1. Efectos de la deficiencia de zinc sobre las células del sistema inmune. La deficiencia de zinc afecta tanto al número y actividad de las células del sistema inmune innato: células polimorfonucleadas (PMN), monocitos, macrófagos y células natural killer (NK), y a las del sistema inmune adaptativo: linfocitos B y linfocitos T.

Homeostasis celular de zinc

Ya que el zinc cumple funciones esenciales en el organismo, su concentración intracelular se regula finamente. Después de que se captura en las células, el zinc se distribuye de la siguiente manera: 50% en el citoplasma, 30-40% en el núcleo y 10% en las membranas (Thiers 1957). La homeostasis de zinc intracelular (Figura 2), depende de:

- 1) Transportadores:** El transporte de zinc a través de las membranas celulares se media por dos familias de proteínas integrales: 1) los transportadores ZIP, (similares a las proteínas ZR e IRT, ZRT/IRT-like protein) que mueven al zinc desde el líquido extracelular, el lumen de los organelos o el lumen de los gránulos de almacenamiento de zinc hacia el citosol; y 2) los transportadores ZnT (Zinc Transporters) que lo movilizan en el sentido opuesto (Fukada & Kambe, 2011; Lichten & Cousins, 2009). Éstos se regulan transcripcional, traduccional y post-traduccionalmente por ubiquitinación, fosforilación y proteólisis (Gaither & Eide, 2001). Dichos transportadores son responsables de la compartimentalización intracelular de zinc en organelos y vesículas de almacenamiento, conocidas como zincosomas. Se estima que en los zincosomas la concentración de zinc es de 1-100 $\mu\text{M/L}$ (Vinkenborg et al., 2009).
- 2) Proteínas de unión a zinc:** El zinc se puede encontrar como un componente estructural de metaloproteínas; estar unido a metaloenzimas como un cofactor; o bien, atrapado por metalotioneínas (MT). Éstas últimas son proteínas constituidas por 60 a 68 aminoácidos, de los cuales 20-21 son cisteínas (Li & Maret, 2008). Las MT atrapan y almacenan zinc, ya que éste se une al azufre del grupo tiol de las

cisteínas (Arseniev et al., 1988; Robbins et al., 1991). Este amortiguamiento de zinc responde a cambios en el estado oxidativo de la célula que modifica la estabilidad de los complejos. La oxidación del azufre lleva a la liberación del zinc, mientras que la reducción favorece su unión.

3) Detección: El factor de transcripción de respuesta a metales 1, MTF-1 (por sus siglas en inglés Metal-response element-binding Transcription Factor-1), es el único sensor de zinc que se conoce en las células eucariotas (Maret, 2013). Se activa con un incremento del zinc libre intracelular y promueve la expresión de proteínas de unión a zinc.

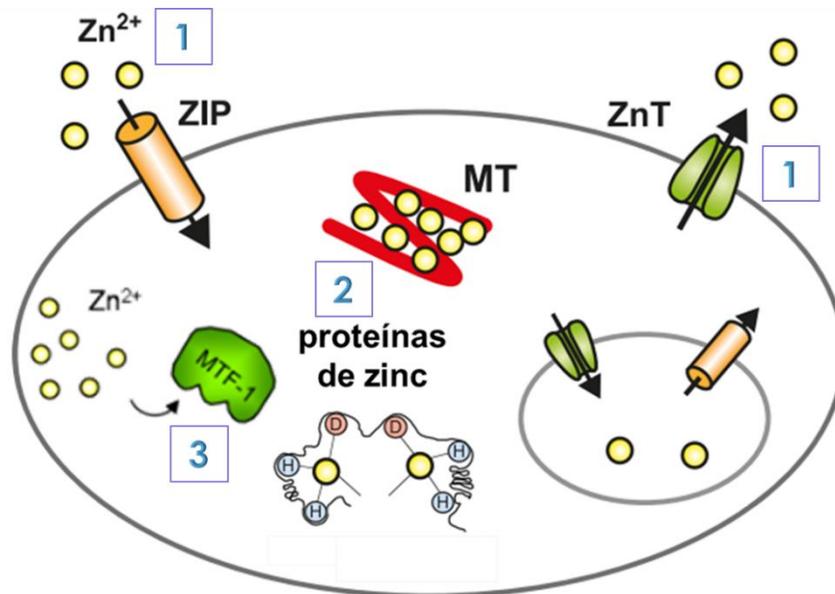


Figura 2. Homeostasis celular de zinc. La homeostasis de zinc depende de: 1) transportadores ZIP y ZnT; 2) proteínas de unión a zinc como metaloproteínas, metaloenzimas y metalotioneínas (MT) y 3) del factor de transcripción MTF1 (modificado de Kimura & Kambe, 2016).

Almacenamiento de zinc sistémico

A pesar de que conocemos los mecanismos de la regulación celular de zinc, es poco lo que se sabe sobre su homeostasis a nivel sistémico, por ejemplo, no se conoce algún factor humoral que responda a la deficiencia o al incremento de éste, pero sí existe información respecto a su almacenamiento. Tejeda-Guzmán y colaboradores (Tejeda-Guzmán et al., 2018), utilizando el modelo de *Drosophila melanogaster*, disecaron distintas partes del organismo de moscas hembra y macho (los túbulos de Malpighi, los intestinos, los ovarios, los testículos y la cabeza), de moscas control (w^+) y mutantes con defectos en el almacenamiento de zinc (w^*). Analizaron el contenido de zinc en estas muestras por medio de Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) y demostraron que el principal reservorio se localiza en las células epiteliales de los túbulos de Malpighi (Figura 3).

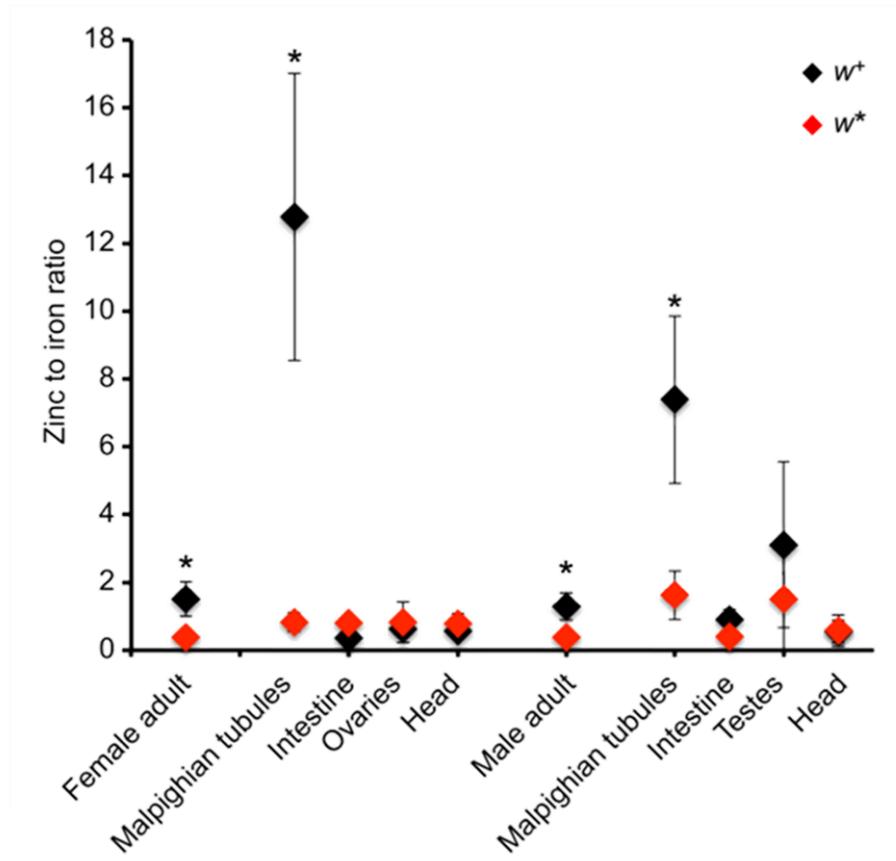


Figura 3. Los túbulos de Malpighi son el principal reservorio de zinc en *Drosophila melanogaster*. Se midió la cantidad de zinc por medio de ICP-OES y se normalizó considerando la cantidad de hierro, en distintas partes del cuerpo de moscas adultas control (w^+) en negro o con una mutación que impide el almacenamiento de zinc (w^*) en rojo (Tejeda-Guzmán et al., 2018).

Los túbulos de Malpighi o túbulos Malpighianos son órganos análogos a las nefronas en los vertebrados, que promueven la producción de orina y modulan la osmorregulación, ya que reabsorben selectivamente agua, iones y solutos. En *Drosophila*, son dos pares de ductos ciegos, formados por una sola capa de células epiteliales, que se encuentran suspendidos en la hemolinfa y que se insertan en el límite entre el intestino medio y el posterior, hacia donde vacían sus secreciones (Figura 4A) (Farina et al., 2022). Están formados por dos tipos de células: las células principales, 5 veces más numerosas, que proyectan

microvellosidades hacia el lumen y que participan en el transporte activo de solutos y iones (Klowden, 2002); y las células secundarias que modulan el transporte de cloruro y contienen acuaporinas (Chapman, 2012). Éstas últimas tienen una forma estelar en las moscas adultas como se observa en la figura 4B.

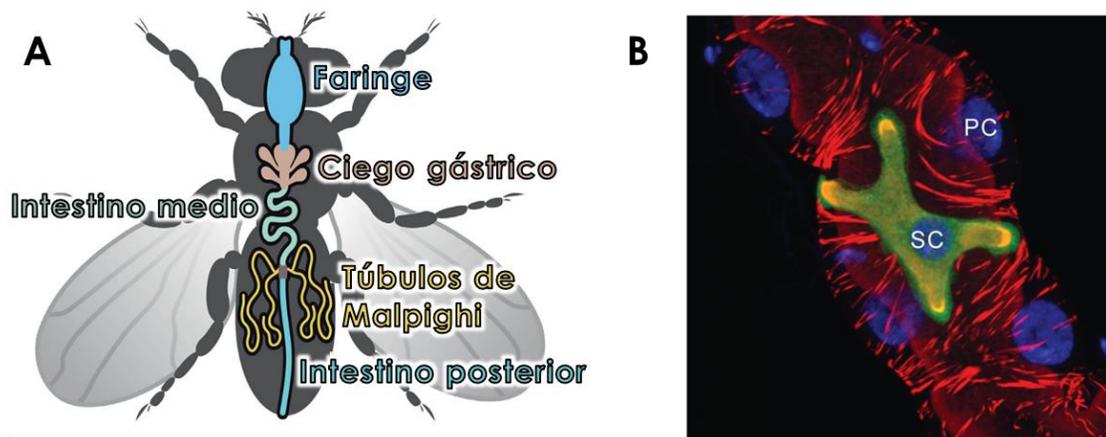


Figura 4. Localización y anatomía de los túbulos de Malpighi en *Drosophila melanogaster*. A) Tracto excretor de *D. melanogaster*, se muestran los dos pares de túbulos Malpighianos conectados al intestino (modificado de Miller et al., 2013). B) Sección de un túbulo de mosca adulta, donde se observan las células secundarias (SC) en verde y las células principales (PC), con una tinción de faloidina para denotar al citoesqueleto de actina. Los núcleos están marcados en azul (Denholm, 2013).

El zinc se almacena en organelos relacionados a los lisosomas

Tejeda y colaboradores también evaluaron el almacenamiento de zinc por medio de microscopía confocal, utilizando el indicador fluorescente FluoZin-3. Éste es el marcador de zinc más utilizado (Marszałek et al., 2016); cuando se une con el zinc, genera una estructura resonante que incrementa su intensidad de fluorescencia hasta 50 veces en respuesta a la cantidad de zinc libre (Figura 5A). Se encontró que este ion metálico se almacena en forma de gránulos dentro de las células principales de los túbulos de Malpighi (Figura 5B, flechas). Además, cuando las moscas presentan mutaciones en las proteínas de los complejos BLOC y HOPS, como BLOC2, HOPS, AP3, Rab32, y la GEF de Rab32, los gránulos ya no se forman y se genera un fenotipo de moscas que no pueden almacenar zinc (Figura 5C). Todas estas proteínas son esenciales en la biogénesis de los organelos relacionados a los lisosomas (ORLs). Por lo tanto, se concluye que el zinc se almacena en el interior de las células de los túbulos de Malpighi, en los ORLs.

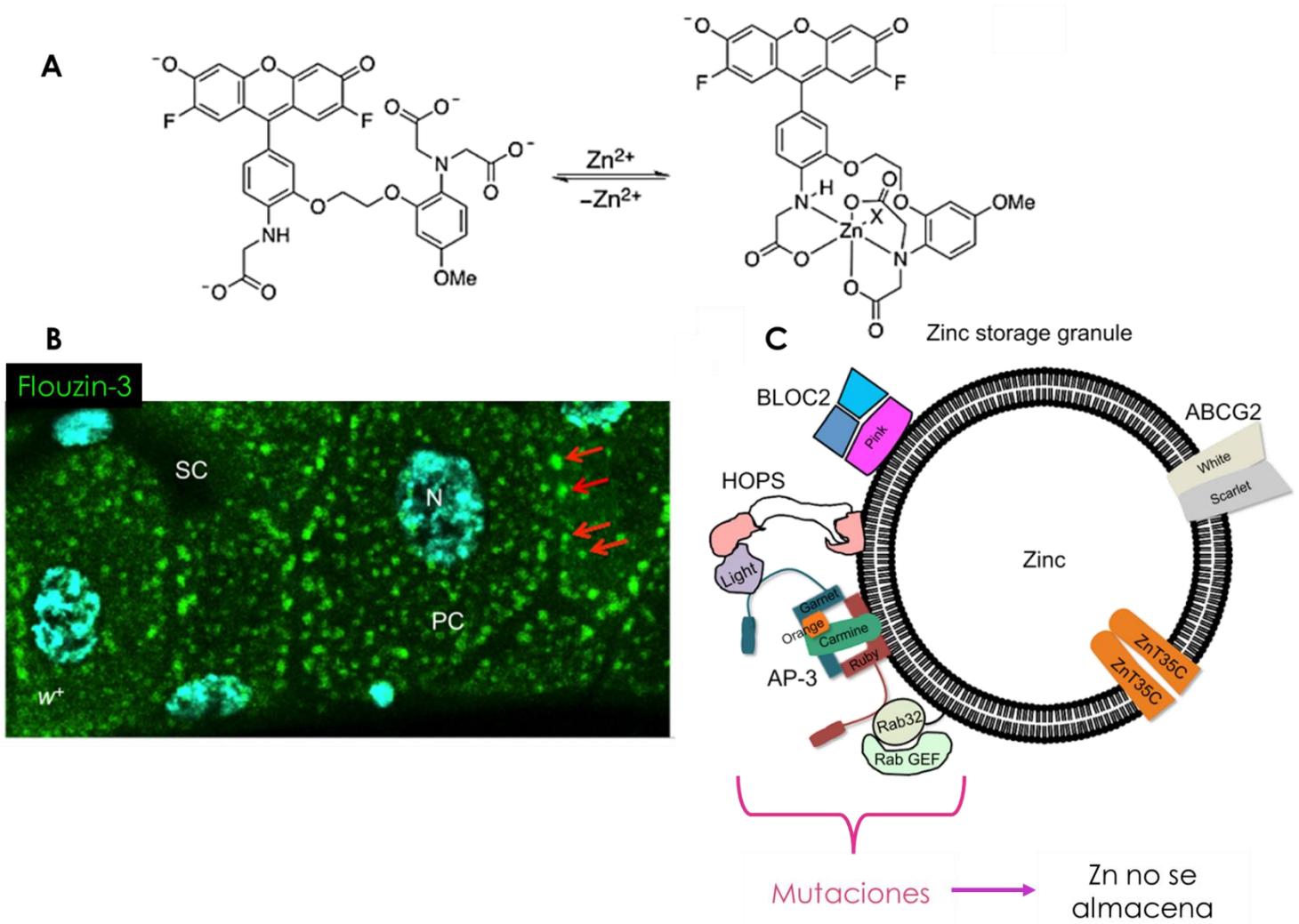


Figura 5. El zinc se almacena en organelos relacionados a los lisosomas. A) Molécula de Flouzin-3, y complejo Flouzin-3-zinc. B) Imágenes de microscopía confocal de la fluorescencia del indicador Flouzin-3 en las células principales (PC) de los túbulos de Malpighi, las flechas rojas señalan los gránulos de almacenamiento de zinc. N: núcleo; SC: Célula secundaria. B) La biogénesis de los gránulos depende las proteínas mostradas, alguna mutación en cualquiera de ellas, genera un fenotipo de mosca que no almacena zinc (Tejeda-Guzmán et al., 2018).

Los lisosomas son el principal organelo degradativo de las células eucariotas y tienen un lumen ácido (pH 4.5-5.0) por la acción de la H⁺-ATPasa presente en su membrana. Este pH es necesario para la hidrólisis de materiales de desecho y reciclaje, como carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y lípidos (Lawrence & Zoncu, 2019). Los ORLs se denominan de esta manera porque su biogénesis depende del sistema endosomal, tienen un contenido variable de proteínas lisosomales y un pH ácido que requiere de la actividad de la H⁺-ATPasa vacuolar, además se marcan con el indicador de lisosomas LysoTracker (Bowman et al., 2019). Cada componente y función de los ORLs es tejido específico, entre ellos se encuentran los gránulos citolíticos de los linfocitos T, los melanosomas, los gránulos densos, las vesículas pre-sinápticas (Dell'Angelica et al., 2000) y los gránulos de almacenamiento de zinc (Tejeda-Guzmán et al., 2018).

El zinc es tan importante para distintas funciones del organismo, que se han identificado moléculas para incrementar su concentración intracelular, que se conocen como ionóforos de zinc. Un ionóforo es una molécula que se une reversiblemente a algún ion y lo transporta a través de las membranas biológicas. Se ha propuesto a la cloroquina como una sustancia que modula el almacenamiento de zinc intracelular e incluso como un ionóforo de zinc.

Cloroquina

La cloroquina se descubrió como un fármaco para el tratamiento de la malaria (Loeb et al., 1946), y durante mucho tiempo fue el principal agente utilizado tanto para tratar como para prevenir esta enfermedad. Actualmente dejó de utilizarse debido a que el patógeno *Plasmodium* que causa esta enfermedad, generó resistencia. Sin embargo, sus análogos aún se utilizan en México, Corea, China, Turquía y Paraguay como tratamiento profiláctico contra esta enfermedad (CDC, 2021). Durante la segunda guerra mundial, los soldados que tomaban cloroquina o alguno de sus derivados como tratamiento preventivo, mejoraban sus síntomas de artritis inflamatoria, este hallazgo llevó a descubrir su función en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide. En la actualidad, los análogos de cloroquina, como la hidroxicloroquina, se utilizan para tratar desórdenes reumáticos, y una gran variedad de enfermedades dermatológicas e inmunológicas (Al-Bari, 2014).

Se han propuesto distintos mecanismos de acción para entender el efecto de la cloroquina sobre estas enfermedades, el más común se basa en la propiedad conocida como 'lisosomotropismo', en la que una base débil como la cloroquina y sus análogos, desprotonada puede difundir libremente a través de las membranas celulares hasta los organelos ácidos como el lisosoma y los ORLs. Una vez que entra a estas estructuras, al encontrarse en un pH bajo se protona, y, en consecuencia, ya no puede difundir hacia otro lado. Esto lleva a una acumulación irreversible y un incremento en la concentración de la molécula de más de 100 veces en estos organelos (Figura 6), lo que a su vez provoca el incremento del pH debido al atrapamiento de H^+ (Kaufmann & Krise, 2007). Es decir que los agentes lisosomotrópicos como la cloroquina, ejercen

su efecto al interferir con la acidificación de los lisosomas y ORLs, por lo tanto inhiben la proteólisis, la quimiotaxis, la fagocitosis y la presentación de antígenos en las células del sistema inmune (Taherian et al., 2013). La cloroquina también se utiliza como una herramienta en el estudio de la autofagia, ya que impide la fusión del lisosoma con el autofagosoma, bloqueando así el flujo autofágico (Mauthe et al., 2018).

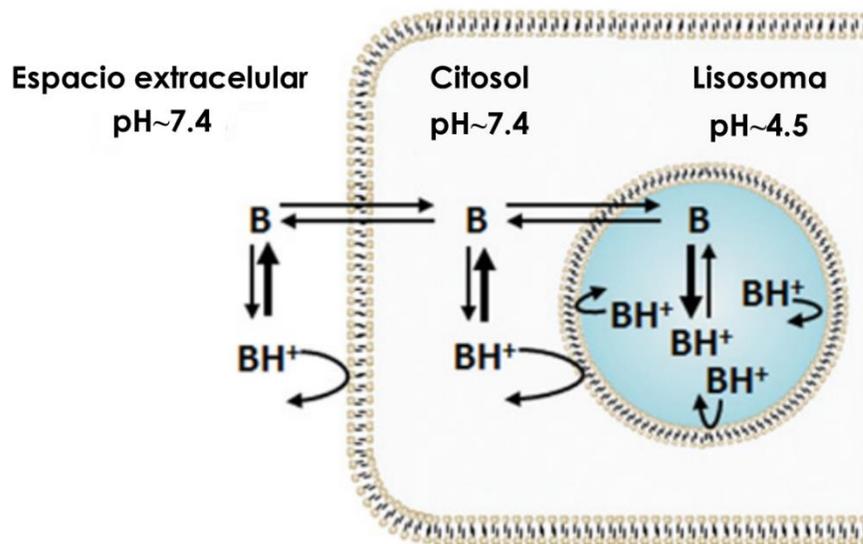


Figura 6. Los agentes lisosomotrópicos se acumulan en los organelos ácidos. Éstos son bases débiles (B) que en su forma no protonada, difunden pasivamente a través de las membranas celulares. En el ambiente ácido de algunos organelos como el lisosoma, se protonan (BH⁺) y al estar cargadas, ya no pueden difundir a través de las membranas, quedando atrapadas en estos compartimentos (Villamil Giraldo et al., 2014).

Debido a que los gránulos de almacenamiento de zinc son ORLs, y que tienen un pH ácido, cabe esperar que éstos y por lo tanto el zinc intracelular se vean afectados con el tratamiento de cloroquina. De hecho, se ha propuesto que ésta puede modificar la concentración de zinc intracelular.

Cloroquina en el almacenamiento de zinc

Para probar el efecto de la cloroquina sobre el almacenamiento de zinc, Xue y colaboradores incubaron células epiteliales cancerosas de ovario humano, A2780, en presencia y ausencia de cloroquina 300 μM y/o ZnCl_2 50 μM como fuente exógena de zinc y midieron la concentración intracelular de zinc utilizando el indicador FluoZin-3. Adicionalmente usaron LysoTracker para marcar organelos ácidos. Encontraron que la adición de ZnCl_2 por sí solo no modifica la intensidad de fluorescencia de FluoZin-3, mientras que la combinación de ZnCl_2 con cloroquina incrementa notablemente la señal fluorescente y que ésta colocaliza con la señal de LysoTracker. Esto los llevó a concluir que la cloroquina es un ionóforo de zinc, ya que promueve la internalización del zinc exógeno (Figura 7).

Durante la pandemia por COVID-19, un estudio piloto con una $n=30$ reportó que el tratamiento con hidroxicloroquina ofrecía una "eficacia y seguridad aparente ante el COVID-19" (Gao et al., 2020), semanas después se publicó que la hidroxicloroquina en combinación con el antibiótico azitromicina reducía la carga viral en los pacientes (Gautret et al., 2020). Después, considerando la relevancia del zinc en la respuesta inmune, y la afirmación de que la cloroquina es un ionóforo para este ion, se propuso la combinación de hidroxicloroquina con aditivos de zinc (Olushola & Ifeoluwa, 2020), que llevó a demostrar cierto nivel de protección en la letalidad de la enfermedad (Carlucci et al., 2020)..

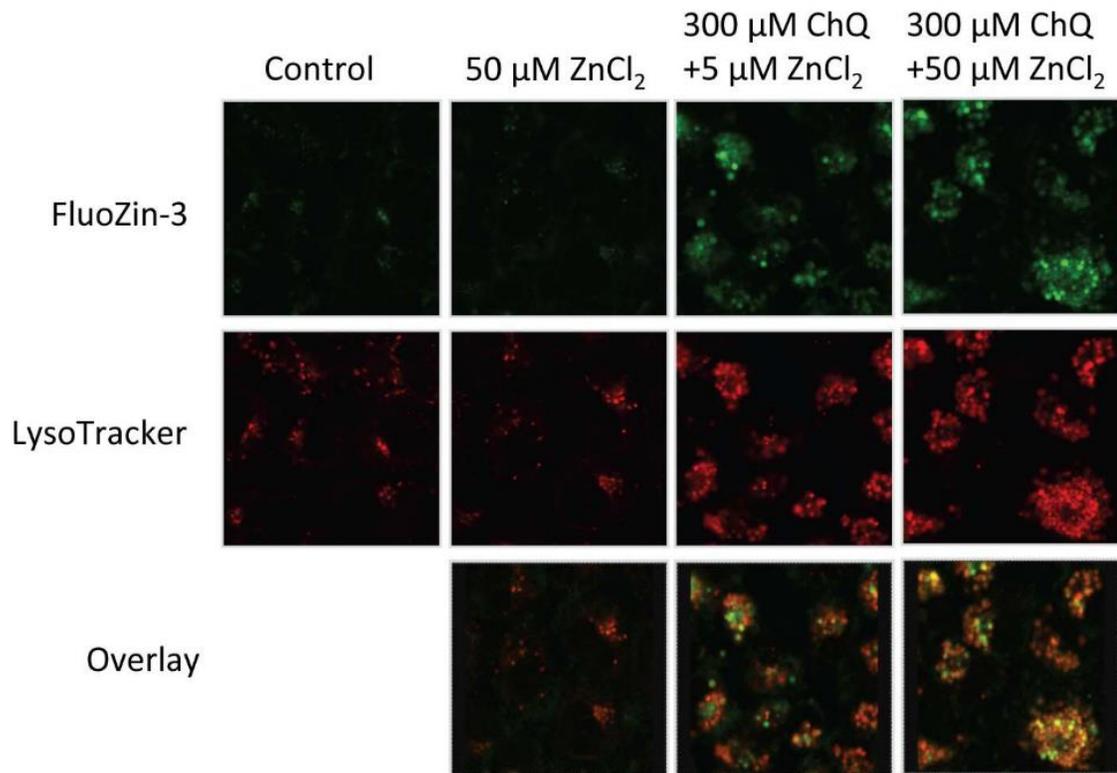


Figura 7. La intensidad de fluorescencia de FluoZin-3 sube con el tratamiento de cloroquina en las células A2780. Las células se trataron con cloroquina (ChQ) y ZnCl_2 a las concentraciones indicadas durante 1 hora. Después se incubaron con los marcadores FluoZin-3 (indicador de zinc) y LysoTracker (indicador de organelos ácidos) y se examinaron por microscopía confocal.

Tomando en consideración lo siguiente:

- El almacenamiento de zinc en *D. melanogaster* ocurre en ORLs en los túbulos de Malpighi.
- La cloroquina se propuso como un ionóforo de zinc.
- La relevancia del zinc para la respuesta inmune.
- Durante la pandemia por SARS-CoV2 se propuso el uso de la hidroxicloroquina en pacientes hospitalizados.
- Los pacientes de covid-19 tenían mejores resultados cuando se les administraba hidroxicloroquina en combinación con una dieta alta en zinc.

Decidimos contribuir al conocimiento sobre el mecanismo de acción de la cloroquina en el almacenamiento de zinc y por lo tanto nos planteamos el siguiente problema.

Planteamiento del problema

¿Cuál es el efecto de la cloroquina sobre el almacenamiento de zinc en *D. melanogaster* y en las células MDCK?

Hipótesis

La cloroquina incrementa el almacenamiento de zinc intracelular en *D. melanogaster* y en las células MDCK

Objetivos

- 1) Evaluar el efecto de la cloroquina sobre la cantidad de zinc en *D. melanogaster*.
- 2) Investigar si el efecto de la cloroquina sobre la concentración de zinc es dependiente de la dosis.
- 3) Evaluar el efecto del tratamiento con cloroquina sobre la concentración de zinc en las células de mamífero MDCK, utilizando el reportero Fluzin-3.
- 4) Averiguar el efecto que ejerce el tratamiento con cloroquina sobre la concentración de distintos iones metálicos en células MDCK, por medio de ICP-OES.
- 5) Investigar si la suplementación con zinc previene el efecto de la cloroquina sobre el almacenamiento de zinc en *D. melanogaster*.

Resultados

1) El tratamiento de cloroquina disminuye el almacenamiento de zinc *D. melanogaster* de manera dosis-dependiente

Para este objetivo, analizamos distintos elementos en el cuerpo completo de moscas adultas, alimentadas durante su desarrollo larvario con una dieta control (CTL) o enriquecida con 2.5 mg/ml de cloroquina (CQ). La elección de esta concentración se basó en reportes previos de la administración CQ por medio de la dieta al modelo de *Drosophila* (Zirin et al., 2013). Se midió la cantidad total de los iones zinc, potasio, hierro y magnesio por medio de ICP-OES. Sorprendentemente, los resultados de este experimento no muestran el incremento de zinc esperado en la dieta con cloroquina, por el contrario, se presenta una disminución del 37% (Figura 8A). El hierro y el potasio disminuyeron ligeramente con el tratamiento, un 7 y 5%, respectivamente, mientras que el magnesio no se afectó (Figura 8B, C, D). Esto sugiere que la cloroquina afecta diferencialmente el almacenamiento de zinc. Para entender si este efecto se debía a la dosis de CQ utilizada, nos planteamos el siguiente objetivo.

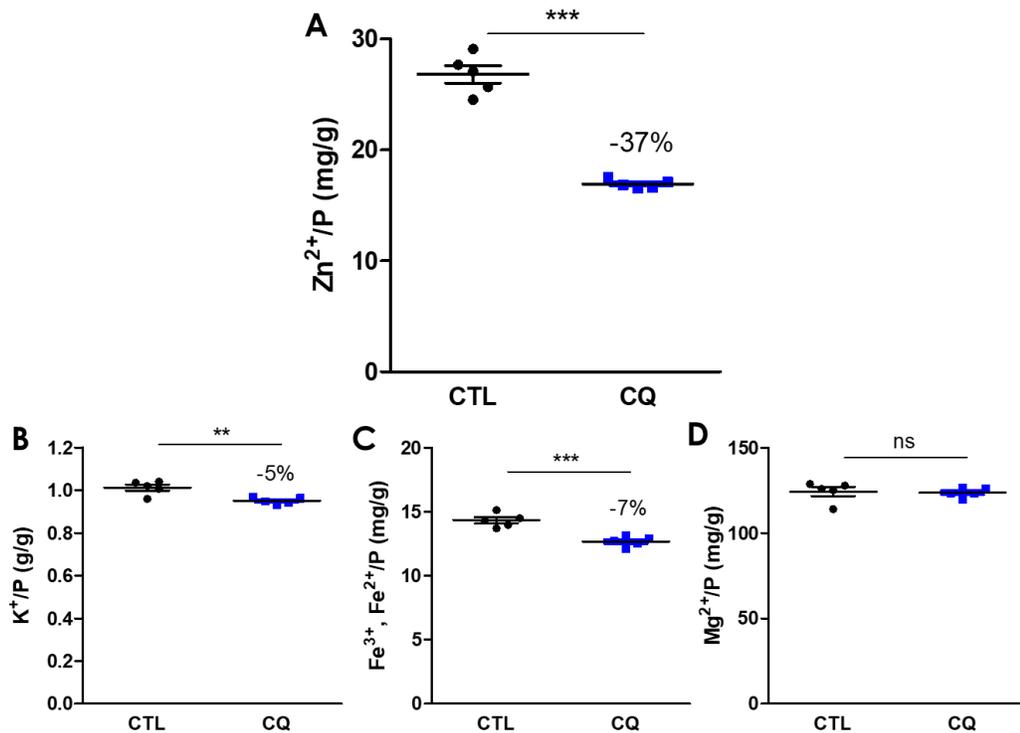


Figura 8. El tratamiento de cloroquina durante el crecimiento larval disminuye el almacenamiento de zinc en *D. melanogaster*. Análisis de ICP-OES del cuerpo completo de moscas adultas que crecieron en una dieta estándar (CTL), o con la adición de 2.5 mg/ml de cloroquina (CQ). Se normalizó la proporción de metales evaluados con la cantidad de fósforo presente. A) El zinc disminuye un 37% con el tratamiento de cloroquina. B) El hierro disminuye un 7% en las moscas tratadas con cloroquina. C) El potasio disminuye un 5% en las moscas tratadas con cloroquina. D) El magnesio no se afecta con el tratamiento. Se muestran los resultados provenientes de lotes de moscas independientes. La diferencia entre los grupos se analizó utilizando una prueba t no pareada *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Para saber si la respuesta a la CQ que se observa previamente es dosis-dependiente, alimentamos a las larvas con concentraciones crecientes de cloroquina (0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/ml) y realizamos las mismas mediciones que en el experimento anterior. Nuestros resultados muestran que la concentración de zinc disminuye a medida que se aumenta la de CQ, con un coeficiente de correlación de 0.92 (Figura 9A). Además, estos experimentos son un replicado biológico independiente de la concentración de 2.5 mg/ml de CQ reportada en la figura 8A, en este caso se presenta una disminución de zinc del 34%. Por otro lado, el potasio también tiende a disminuir, con un coeficiente de correlación de 0.81, esta disminución alcanza el 18% con 2.5 mg/ml de CQ (Figura 8B). Los iones hierro y magnesio no muestran cambios significativos en función de la dosis de cloroquina (Figura 8C, D). Todos estos resultados confirman que el contenido de zinc en el cuerpo completo de *D. melanogaster* es altamente sensible a la concentración de cloroquina en la dieta, y que los iones potasio también tienden a disminuir.

Para entender por qué la CQ disminuye el contenido de zinc, en lugar de aumentarlo, como se esperaba, replicamos el experimento de Xue y colaboradores (Xue et al., 2014) utilizando a las células de mamífero Madin Darby Canine Kidney (MDCK).

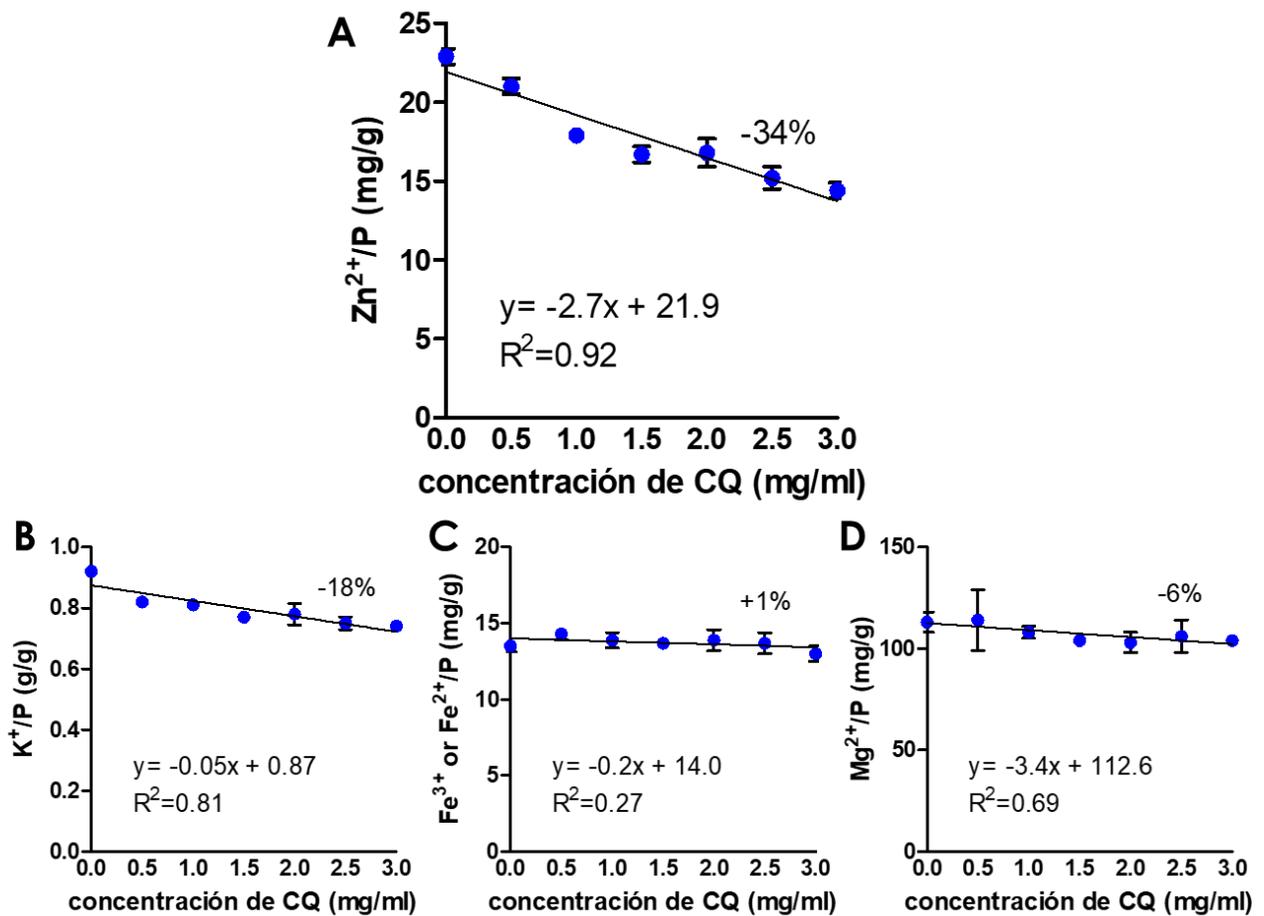


Figura 9. El efecto de la cloroquina sobre el almacenamiento de zinc es dosis-dependiente. Análisis de ICP-OES del cuerpo completo de moscas adultas que crecieron en una dieta estándar con concentraciones crecientes de cloroquina. Se muestran las ecuaciones de la recta y los valores de R^2 del análisis de regresión lineal. El porcentaje indicado muestra el cambio en la dieta con 2.5 mg/ml de cloroquina (CQ). Se normalizó la proporción de metales evaluados con la cantidad de fósforo presente A) Zinc. B) Hierro. C) Potasio. D) Magnesio.

2) La cloroquina intensifica la fluorescencia de FluoZin-3 en los compartimentos intracelulares de las células MDCK

Debido a que los túbulos de Malpighi son el órgano análogo a los riñones en mamíferos, en el siguiente experimento utilizamos a las MDCK, que son células epiteliales de riñón de perro. Seguimos el mismo protocolo experimental reportado previamente (Xue et al., 2014), en el que se incubaron a las células en presencia o ausencia de CQ 300 μM y/o ZnCl_2 50 μM como fuente exógena de zinc durante 1 h. Posteriormente se incubaron con el marcador de zinc FluoZin-3 1 μM y el marcador de organelos ácidos LysoTracker 50 μM . Nuestros resultados confirman lo reportado anteriormente, es decir, el tratamiento con ZnCl_2 tuvo un efecto mínimo sobre la fluorescencia de FluoZin-3 (Figura 10, ZnCl_2); en contraste, la combinación de CQ y ZnCl_2 incrementa significativamente la fluorescencia. Sin embargo, también analizamos el efecto de la CQ sin la adición de zinc exógeno y encontramos que ésta por sí sola incrementa la señal de FluoZin-3 en un 80% (Figura 10, CQ). Es decir que la intensidad de fluorescencia de FluoZin-3 depende de la cloroquina, y no del zinc exógeno. Para confirmar este hallazgo y entender la discrepancia con los resultados en *D. melanogaster*, medimos el zinc en las células MDCK por medio de ICP-OES.

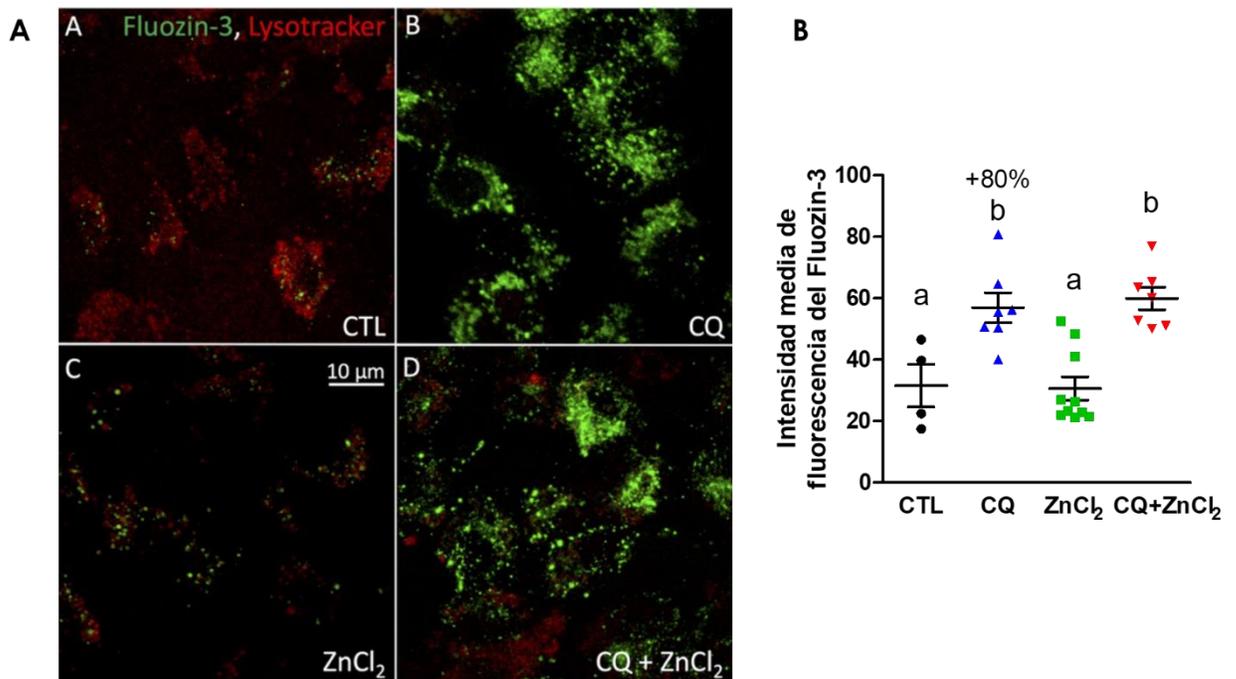


Figura 10. La cloroquina intensifica la fluorescencia de FluoZin-3 en los compartimentos intracelulares. A) Las células MDCK se incubaron con los tratamientos correspondientes durante 1 hora y posteriormente con Lysotracker (rojo) que tiñe organelos ácidos, y FluoZin-3 (verde) como marcador indirecto de zinc. B) Intensidad media de la fluorescencia de FluoZin-3 en los distintos tratamientos. La diferencia entre los grupos se analizó por ANOVA de una vía, seguido de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran como letras diferentes.

3) En las células MDCK la cloroquina disminuye la cantidad de zinc, medida con ICP-OES

Para evaluar objetivamente los cambios en el almacenamiento de zinc inducidos por la cloroquina, hicimos un análisis de elementos en las células MDCK con el mismo tratamiento de CQ 300 μM y ZnCl_2 50 μM , utilizando ICP-OES. Demostramos que la cloroquina disminuye en un 36% la concentración intracelular de zinc (Figura 11B), a pesar de que la intensidad de fluorescencia de FluoZin-3 se incrementa en un 80% en la misma condición (Figura 11A). Es decir que la señal de FluoZin-3 no se correlaciona con la cantidad de zinc presente en las células. Esto se debe a que la fluorescencia del complejo FluoZin-3-zinc, se apaga con un pH por debajo de 6 (Marszałek et al., 2016), que es característico de los ORLs. Un efecto conocido de la cloroquina es el de alcalinizar compartimentos ácidos (Ginsburg et al., 1989; Krogstad et al., 1985), de modo que al hacerlo, llevaría a estos compartimentos a un pH óptimo que incrementa la fluorescencia de FluoZin-3, independientemente de los cambios en la concentración zinc. Estos resultados demuestran que la cloroquina no es un ionóforo de zinc y que el FluoZin-3 no es un marcador adecuado cuando se usa en conjunto con agentes lisosomotrópicos, como la CQ.

El análisis de elementos reveló que la cloroquina también induce la disminución de potasio intracelular en un 48%, (Figura 11C). Mientras que los iones de magnesio y hierro no se ven afectados (Figura 11D, E). Estos resultados demuestran que la cloroquina tiene un efecto deletéreo sobre el almacenamiento de zinc y la concentración intracelular de potasio, por lo tanto, se debe reconsiderar el uso de sus derivados.

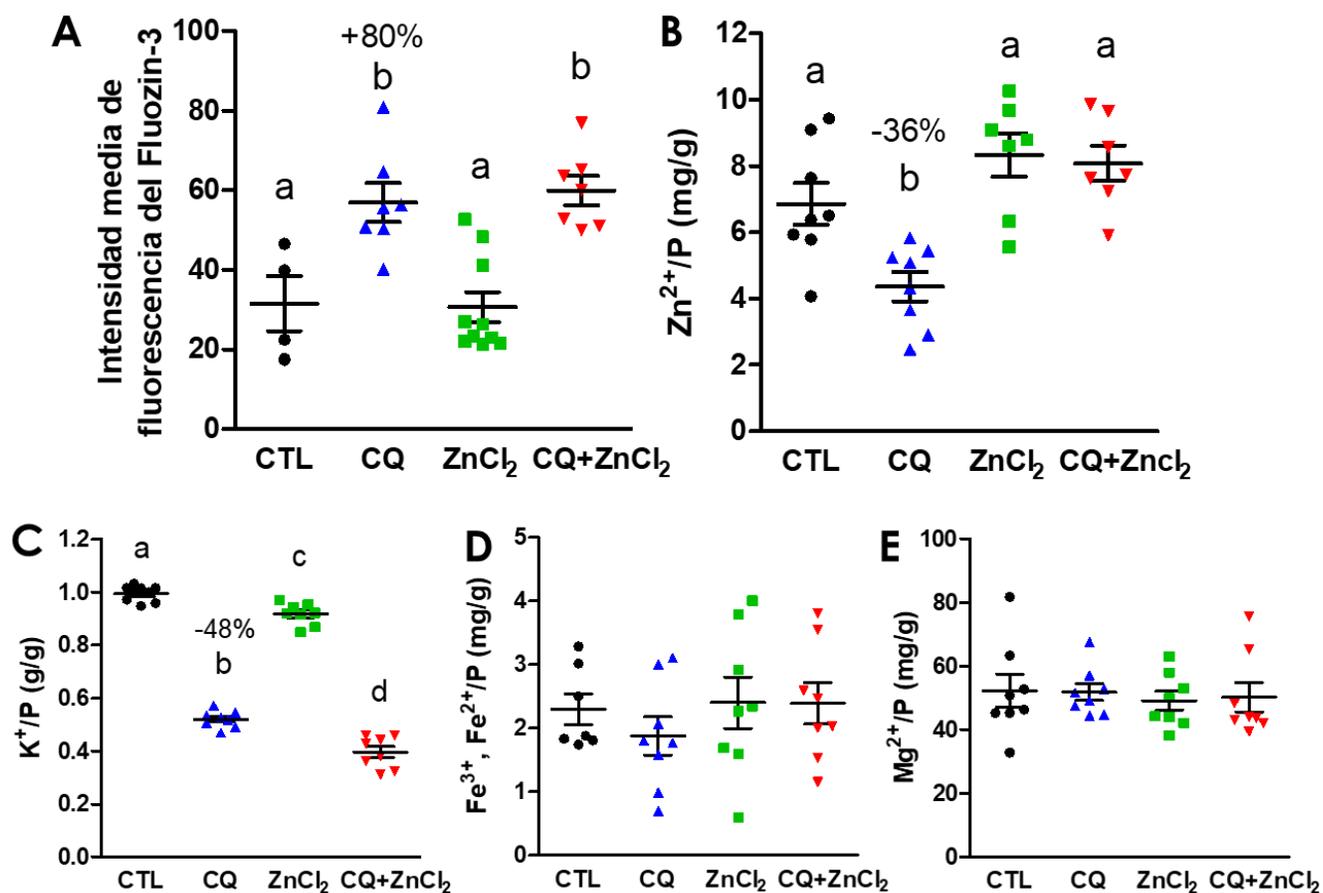


Figura 11. La fluorescencia de Fluozin-3 no correlaciona con los cambios en la concentración de zinc en las células MDCK tratadas con cloroquina. A) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Fluozin-3 del experimento mostrado en la Figura 10. Cuantificación de B) Zinc, C) Hierro, D) Potasio, E) Magnesio, en pastillas de células MDCK por ICP-OES. La diferencia entre los grupos se analizó por ANOVA de una vía, seguido de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran como letras diferentes.

4) La suplementación con zinc evita la depleción de este ion inducida por la cloroquina en *D. melanogaster*.

Una vez que demostramos que la cloroquina disminuye el almacenamiento de zinc en *D. melanogaster* y en células MDCK, y considerando que sus derivados se usan comúnmente como fármacos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, evaluamos si este efecto se puede revertir con la suplementación de zinc en la dieta. Para ello repetimos los tratamientos previos en los que las larvas crecieron en una dieta estándar, en presencia o ausencia de cloroquina 2.5 mg/ml. Esta vez además adicionamos cloruro de zinc 1 mM a la dieta. Posteriormente se colectaron las muestras del cuerpo completo de las moscas adultas y se analizaron por ICP-OES. Como se esperaba, el zinc disminuye en el grupo alimentado con cloroquina en un 46%, mientras que se observa un incremento del almacenamiento de zinc de 74% en el grupo con la dieta enriquecida de zinc (Figura 12). Llama la atención que la combinación CQ y ZnCl₂ promueve un almacenamiento de zinc similar al control. Esto significa que la suplementación de zinc revierte la pérdida de zinc intracelular inducida por cloroquina; esto también ocurre en las células MDCK (Figura 11B, CQ+ZnCl₂).

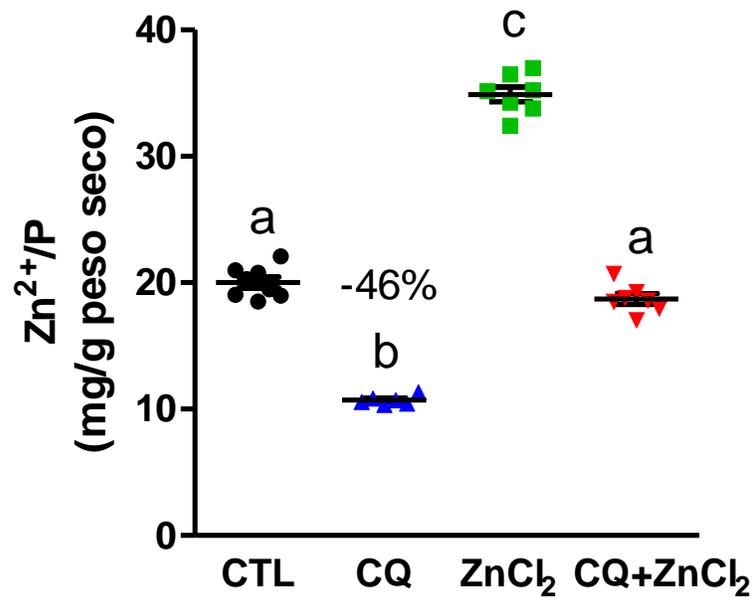


Figura 12. La suplementación de zinc en la dieta de *Drosophila* revierte la pérdida de zinc intracelular inducida por la cloroquina. El tratamiento con cloroquina (2.5 mg/ml) disminuye la cantidad de zinc en todo el cuerpo en un 46%, pero este efecto se revierte en animales que también se alimentaron con cloruro de zinc 1 mM. La diferencia entre los grupos se analizó por ANOVA de una vía, seguido de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran como letras diferentes.

Discusión

La cloroquina no es un ionóforo de zinc

La propuesta original de que la cloroquina incrementa el zinc intracelular se basa en el aumento de la fluorescencia del FluoZin-3 (Xue et al., 2014). Éste es el reportero de zinc intracelular más utilizado, pero como muchas sondas fluorescentes que se usan para cuantificar metales iónicos, su uso requiere de consideraciones precautorias. Por ejemplo, la afinidad de la sonda, la especificidad por el ion metálico, si la fluorescencia depende de la concentración del ion o de otras interferencias químicas, como en este caso, cambios en el pH (Marszałek et al., 2016).

En este sentido, hay una serie de resultados contrastantes entre los efectos de la cloroquina y del ionóforo de zinc clioquinol. Por ejemplo, el tratamiento con cloroquina arresta el flujo autofágico en células epiteliales pigmentarias de la retina, mientras que el clioquinol atenúa la formación de autofagolisosomas de una manera dependiente de zinc (Seo et al., 2015). Además, en células de epitelio pulmonar, la incubación de zinc extracelular junto con clioquinol fue letal, pero el tratamiento con hidroxiclороquina no presentó efectos adversos (Kavanagh et al., 2022). Asimismo, la cloroquina no podría ser un ionóforo de zinc ya que se une a él con baja afinidad, y su coordinación depende del ambiente químico (Paulikat et al., 2022). Los experimentos con liposomas purificados tampoco muestran evidencia de actividad ionófora para la hidroxiclороquina ya que no promueve que el zinc atraviese la bicapa lipídica, llevando a otros a concluir que la CQ no es un ionóforo de zinc (Kavanagh et al., 2022).

La cuantificación real del ion metálico zinc en las células tratadas con cloroquina que se presenta aquí, resuelve este problema concluyentemente, ya que el tratamiento con cloroquina causa, de hecho, una pérdida significativa del zinc intracelular almacenado; éste es un resultado inconsistente con la propuesta de que la cloroquina es un ionóforo de zinc. Sin embargo, nuestros hallazgos son consistentes con todos los experimentos reportados, si se consideran las propiedades fluorescentes del complejo FluoZin-3-zinc, en el que un pH ácido promueve la protonación de los oxígenos de la molécula, impidiendo su unión con el zinc y por lo tanto, previniendo el incremento de la fluorescencia (Marszałek et al., 2016).

El tratamiento con cloroquina modifica el almacenamiento intracelular de zinc y otros iones

Las moscas adultas de *Drosophila melanogaster* que durante su desarrollo larvario se alimentaron con CQ, tenían invariablemente menos contenido de zinc en todo el cuerpo. La magnitud de esta pérdida varía entre 34 y 45% entre experimentos independientes. Es de notar que el tratamiento con CQ durante 1 h en células MDCK también resultó en una pérdida similar del 36% del zinc total. Con base en estos resultados podemos proponer un nuevo mecanismo de acción para la cloroquina en enfermedades autoinmunes, tomando como evento central la disminución del zinc, y considerando que en estos padecimientos se necesita disminuir la reactividad del sistema inmune.

Además, en las células MDCK también se afectó significativamente el contenido de potasio, incluso a un nivel más alto que el zinc, en un 48%. Este es un efecto ya documentado de la cloroquina (Clemessy et al., 1995). También existe un caso médico reciente de un niño que accidentalmente ingirió 10 g de

hidroxicloroquina y resultó con hipocalcemia (Srihari et al., 2022). Un mecanismo propuesto para explicar la acción de la cloroquina sobre el potasio es su unión directa e inhibición de canales de potasio (Rodríguez-Menchaca et al., 2008; Szendrey et al., 2021; Takemoto et al., 2018). Aunque también podría deberse a la inhibición de la bomba Na^+/K^+ (Chandra et al., 1992; Huang et al., 2009). Con respecto a este mecanismo, se ha demostrado que la cloroquina afecta la unión de la ouabaína con la bomba, así como la recuperación de las células tras el tratamiento con ouabaína (Contreras et al., 1989, 1995). En este estudio, no nos enfocamos en el efecto de la cloroquina sobre los iones potasio, pero sería importante hacer notar que, junto con el zinc, el potasio fue el único otro ion que disminuyó en 3 experimentos distintos de un modelo *in vivo*, consistente con lo que ya se sabía en la experiencia médica.

El tratamiento de hidroxicloroquina podría llevar al vaciamiento de los almacenamientos intracelulares de zinc

El principal resultado de este estudio es que el tratamiento con cloroquina conlleva a la depleción de zinc de los almacenes intracelulares. Esta conclusión tiene implicaciones para el mecanismo de acción de este fármaco en distintas enfermedades. Durante la pandemia por COVID-19, un estudio piloto con una $n=30$ reportó que el tratamiento con hidroxicloroquina ofrecía una “eficacia y seguridad aparente ante el COVID-19” (Gao et al., 2020), semanas después se publicó que la hidroxicloroquina en combinación con el antibiótico azitromicina reducía la carga viral en los pacientes (Gautret et al., 2020). A pesar de que los métodos y la conclusión de este estudio fue cuestionada severamente (Rosendaal, 2020), en Estados Unidos se incrementó el consumo de hidroxicloroquina como tratamiento profiláctico, a tal grado que hubo un desabasto del fármaco. Después, considerando la afirmación de que la

cloroquina es un ionóforo de zinc, se propuso la combinación de hidroxicloroquina con aditivos de zinc (Olushola & Ifeoluwa, 2020). La gravedad de estos estudios radica en el hecho de que esta afirmación se basa en un artefacto del método de medición de zinc y por lo tanto resalta la importancia del rigor científico y del uso adecuado de controles en cada experimento. Actualmente, por medio de análisis más intensivos, se ha concluido que la hidroxicloroquina no tiene un efecto en prevenir el riesgo de muerte, la progresión de la enfermedad ni la necesidad de ventilación mecánica, e incluso se triplican los efectos adversos en comparación con el placebo (Gould & Norris, 2021; Singh et al., 2021).

En resumen

En *D. melanogaster*:

1. La cloroquina disminuye la cantidad de zinc de manera-dosis dependiente.

En MDCK:

2. La cloroquina disminuye la concentración de zinc intracelular determinada por ICP-OES, pero por ser un agente lisosomotrópico aumenta el pH de los organelos ácidos (como el lisosoma) e intensifica la señal de Fluozin-3, dando un falso positivo.

En *D. melanogaster* y MDCK:

3. La suplementación con zinc evita la depleción de este ion inducida por cloroquina.
4. La cloroquina disminuye el potasio intracelular.

Conclusiones

1. La cloroquina disminuye el almacenamiento de zinc en los modelos de *D. Melanogaster* y en las células MDCK.
2. No se debe usar Fluozin-3 como marcador de zinc en conjunto con agentes que alcalinizan a los organelos ácidos.
3. Es necesario que el uso clínico de los derivados de cloroquina se acompañe del monitoreo de las concentraciones de zinc y potasio en los pacientes.

Materiales y métodos

Reactivo	Marca	Número de catálogo
Difosfato de cloroquina	Sigma-Aldrich	C6628
Cloruro de zinc	Sigma-Aldrich	229 997
Fluozin™-3, AM	Invitrogen	F24195
Lysotracker™ Deep Red	Invitrogen	L7528
Penicilina y estreptomicina	Invitrogen	190846
Tripsina-verseno	Invitrogen	190 510
Ácido nítrico concentrado (65%) libre de metales	Merck	1 0004 411 000
Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Life Technologies	31600-083
Suero fetal bovino con hierro	Life Technologies	21300-058

Material vivo

Todos los experimentos se realizaron con una cepa isogénica de *D. melanogaster w⁺*, sin mutaciones conocidas (25). Las larvas crecieron en medio con melaza al 12.5%, levadura 10%, agar 1.6%, gelatina 0.3%, y ácido propiónico al 1% en agua. Las sales de difosfato de cloroquina y cloruro de zinc se añadieron a concentraciones finales de 2.5 mg/ml y 1 mM, respectivamente, donde se indica.

Las células MDCK crecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (suplementado con penicilina (10,000 unidades/ml) mezclada con estreptomicina (10 mg/ml)) y suero fetal bovino 10% con hierro. Después de resuspender a las células utilizando tripsina-verseno, se transfirieron a placas multi-pozo (área de crecimiento de 9.6 cm²) y se incubaron durante 48 horas en DMEM suplementado que después se reemplazó con medio fresco que contenía cloruro de zinc 50 µM y/o cloroquina 300 µM y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación continua.

Medición de iones metálicos

La cantidad de iones metálicos se midió usando espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES por sus siglas en inglés "inductively coupled plasma optical emission spectrometry"). Este método se basa en excitar a los átomos en su estado fundamental, por medio de la energía proveniente de un gas altamente ionizado (o plasma). La aplicación de esta energía generará que los electrones salten a orbitales energéticos mayores, que al regresar a su posición inicial liberan fotones con un espectro de longitudes de onda específico para cada elemento, como una huella digital.

Las larvas crecieron con dietas control con tratamiento como se indica, y las moscas adultas de distintos sexos se colectaron entre 4 y 7 días después de la eclosión de la pupa. Los insectos se liofilizaron durante 8 horas para quitar el agua. Las células MDCK se sembraron en un área de 9.6 cm² (250 000 células/cm²), donde se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés "phosphate-buffered saline") libre de

calcio, después de la incubación con cloruro de zinc 50 μM y/o cloroquina 300 μM , y se extrajeron en 0.2 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%.

Se digirieron 20 mg de una muestra seca de cuerpos de insecto o 0.2 ml de lisado celular en 1 ml de ácido nítrico concentrado (65%) libre de metales a 200 °C durante 15 minutos en frascos cerrados del sistema de digestión por microondas MARS6 (CEM Corporation). Las muestras se diluyeron con agua Milli-Q hasta 5 ml. El blanco consistió en 0.2 ml de SDS 1%. Las concentraciones de metales iónicos se midieron usando una de calibración y un blanco digerido, en un instrumento PerkinElmer Optima 8300. Las curvas de calibración para hierro y zinc se realizaron entre 0.1 y 5 ppm, para magnesio entre 0.5 y 23 ppm, y para potasio entre 2 o 100 ppm, de manera que las mediciones cayeron dentro de un intervalo lineal verificado de la respectiva curva de calibración.

Imágenes de fluorescencia

Las células MDCK crecieron sobre cubreobjetos en placas multi-pozos, después de la incubación con cloruro de zinc 50 μM y/o cloroquina 300 μM , se incubaron con medio fresco que contenía LysoTracker 50 μM y Fluozin-3 1 μM durante 30 minutos a 37 °C. Después, las células se lavaron dos veces con PBS y se montaron en este medio para obtener imágenes en directo en un microscopio de laser confocal TCS SP8 (Leica Microsystems). El procesamiento de las imágenes se realizó en la plataforma ImageJ.

Bibliografía

- Al-Bari, A. A. (2014). Chloroquine analogues in drug discovery: New directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(6), 1608–1621. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv018>
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1), 196–201. <https://doi.org/10.1021/PR050361J>
- Arseniev, A., Schultze, P., Wörgötter, E., Braun, W., Wagner, G., Vašák, M., Kägi, J. H. R., & Wüthrich, K. (1988). Three-dimensional structure of rabbit liver [Cd7]metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Biology*, 201(3), 637–657. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90644-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90644-4)
- Bowman, S. L., Bi-Karchin, J., Le, L., & Marks, M. S. (2019). The road to lysosome-related organelles: Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic*, 20(6), 404–435. <https://doi.org/10.1111/tra.12646>
- Carlucci, P. M., Ahuja, T., Petrilli, C., Rajagopalan, H., Jones, S., & Rahimian, J. (2020). Zinc sulfate in combination with a zinc ionophore may improve outcomes in hospitalized COVID-19 patients. *Journal of Medical Microbiology*, 69(10), 1228–1234. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001250>
- Chandra, S., Adhikary, G., Sikdar, R., & Sen, P. C. (1992). The in vivo inhibition of transport enzyme activities by chloroquine in different organs of rat is reversible. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 118(1), 15–21.

<https://doi.org/10.1007/BF00249690>

Chapman, R. (2012). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.

Clemessy, J. L., Borron, S. W., Baud, F. J., Favier, C., Hantson, P. E., & Vicaut, E. (1995). Hypokalaemia related to acute chloroquine ingestion. *Lancet (London, England)*, *346*(8979), 877–880. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92711-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92711-5)

Contreras, R. G., Avila, G., Gutierrez, C., J.J., B., González-Mariscal, L., Darzon, A., Beaty, G., Rodriguez-Boulan, E., & Cereijido, M. (1989). Repolarization of Na⁺ + K⁺ pumps during establishment of epithelial monolayers. *The American Physiological Society*, *257*(5 Pt 1), C896-905.

Contreras, R. G., Lázaro, A., Mújica, A., González-Mariscal, L., Valdés, J., García-Villegas, M. R., & Cereijido, M. (1995). Ouabain resistance of the epithelial cell line (Ma104) is not due to lack of affinity of its pumps for the drug. *The Journal of Membrane Biology*, *145*(3), 295–303. <https://doi.org/10.1007/BF00232721>

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S., & Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-Related Organelles. *FASEB Journal*, *14*(10), 1265–1278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20020-5>

Denholm, B. (2013). Shaping up for action: The path to physiological maturation in the renal tubules of *Drosophila*. *Organogenesis*, *9*(1), 40–54. <https://doi.org/10.4161/org.24107>

Drinker, K., & Collier, E. (1926). The significance of zinc in the living organism. *Journal of Industrial Hygiene*, *8*, 257.

- Farina, P., Bedini, S., & Conti, B. (2022). Multiple Functions of Malpighian Tubules in Insects: A Review. *Insects*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/insects13111001>
- Fukada, T., & Kambe, T. (2011). Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 3(7), 662–674. <https://doi.org/10.1039/C1MT00011J>
- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 14(3–4), 251–270. <https://doi.org/10.1023/A:1012988914300>
- Gao, J., Tian, Z., & Yang, X. (2020). Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Bioscience Trends*, 14(1). <https://doi.org/10.5582/BST.2020.01047>
- Gautret, P., Lagier, J. C., Parola, P., Hoang, V. T., Meddeb, L., Mailhe, M., Doudier, B., Courjon, J., Giordanengo, V., Vieira, V. E., Tissot Dupont, H., Honoré, S., Colson, P., Chabrière, E., La Scola, B., Rolain, J. M., Brouqui, P., & Raoult, D. (2020). Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1), 105949. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.105949>
- Ginsburg, H., Nissani, E., & Krugliak, M. (1989). Alkalinization of the food vacuole of malaria parasites by quinoline drugs and alkylamines is not correlated with their antimalarial activity. *Biochemical Pharmacology*, 38(16), 2645–2654. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90550-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90550-9)

- Gould, S., & Norris, S. L. (2021). Contested effects and chaotic policies: the 2020 story of (hydroxy) chloroquine for treating COVID-19. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, ED000151. <https://doi.org/10.1002/14651858.ED000151>
- Hojyo, S., & Fukada, T. (2016). Roles of Zinc Signaling in the Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6762343>
- Huang, B., Meng, N., Zhao, B. X., Zhao, J., Zhang, Y., Zhang, S. L., & Miao, J. Y. (2009). Protective effects of a synthesized butyrolactone derivative against chloroquine-induced autophagic vesicle accumulation and the disturbance of mitochondrial membrane potential and Na⁺, K⁺-ATPase activity in vascular endothelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(3), 471–475. <https://doi.org/10.1021/tx8002824>
- Kaufmann, A. M., & Krise, J. P. (2007). Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: analysis and therapeutic implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(4), 729–746. <https://doi.org/10.1002/JPS.20792>
- Kavanagh, O. N., Bhattacharya, S., Marchetti, L., Elmes, R., O'sullivan, F., Farragher, J. P., Robinson, S., Thompson, D., & Walker, G. M. (2022). Hydroxychloroquine Does Not Function as a Direct Zinc Ionophore. *Pharmaceutics*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14050899>
- Kimura, T., & Kambe, T. (2016). The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 10–12. <https://doi.org/10.3390/ijms17030336>

- Klowden, M. (2002). Excretory Systems. In *Physiological System in Insects* (pp. 403–431). Academic Press.
- Krogstad, D. J., Schlesinger, P. H., & Gluzman, I. Y. (1985). Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Cell Biology*, *101*(6), 2302–2309. <https://doi.org/10.1083/JCB.101.6.2302>
- Lawrence, R. E., & Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0244-7>
- Li, Y., & Maret, W. (2008). Human metallothionein metallomics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *23*(8), 1055–1062. <https://doi.org/10.1039/B802220H>
- Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual Review of Nutrition*, *29*, 153–176. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NUTR-033009-083312>
- Loeb, R. F., McCoy, O. R., Clark, W. M., Coatney, G. R., Coggeshall, L. T., Dieuaide, F. R., Dochez, A. R., Hakansson, E. G., Marshall, E. K., Marvel, C. S., Saper, J. J., Sebrell, W. H., Shannon, J. A., & Carden, G. A. (1946). Activity of a new antimalarial agent, chloroquine (SN 7618): Statement Approved by the Board for Coordination of Malarial Studies. *Journal of the American Medical Association*, *130*(16), 1069–1070. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1946.02870160015006>
- Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in Nutrition*, *4*(1), 82–91. <https://doi.org/10.3945/AN.112.003038>

- Maret, W., & Sandstead, H. H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 20(1), 3–18. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2006.01.006>
- Marszałek, I., Krężel, A., Goch, W., Zhukov, I., Paczkowska, I., & Bal, W. (2016). Revised stability constant, spectroscopic properties and binding mode of Zn(II) to FluoZin-3, the most common zinc probe in life sciences. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 161(li), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.05.009>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- Maywald, M., & Rink, L. (2022). Zinc in Human Health and Infectious Diseases. *Biomolecules*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/BIOM12121748>
- Miller, J., Chi, T., Kapahi, P., Kahn, A. J., Kim, M. S., Hirata, T., Romero, M. F., Dow, J. A. T., & Stoller, M. L. (2013). *Drosophila melanogaster* as an emerging translational model of human nephrolithiasis. *Journal of Urology*, 190(5), 1648–1656. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.03.010>
- Olushola, M. O., & Ifeoluwa, O. I. (2020). Improving the efficacy of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 may require zinc additives- A better synergy for future COVID-19 clinical trials. *Le Infezioni in Medicina*, 2, 192–197.

- Paulikat, M., Vitone, D., Schackert, F. K., Schuth, N., & Barbanente, A. (2022). *Molecular Dynamics and Structural Studies of Zinc Chloroquine Complexes*. 12–14.
- Prasad, A. S. (2012). Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 26(2–3), 66–69. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2012.04.004>
- Raulin, J. (1869). Ethudes chimiques sur la vegetation. *Annals Science Nature Bothanical Biology Vegetal*, 11, 92–299.
- Robbins, A. H., McRee, D. E., Williamson, M., Collett, S. A., Xuong, N. H., Furey, W. F., Wang, B. C., & Stout, C. D. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(4), 1269–1293. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90933-W](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90933-W)
- Rodríguez-Menchaca, A. A., Navarro-Polanco, R. A., Ferrer-Villada, T., Rupp, J., Sachse, F. B., Tristani-Firouzi, M., & Sánchez-Chapula, J. A. (2008). The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), 1364–1368. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0708153105>
- Rosendaal, F. R. (2020). Review of: "Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial Gautret et al 2010, DOI:10.1016/j.ijantimicag.2020.105949. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1). <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106063>
- Sanna, A., Firinu, D., Zavattari, P., & Valera, P. (2018). Zinc Status and

- Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 10(68).
<https://doi.org/10.3390/nu10010068>
- Seo, B. R., Lee, S. J., Cho, K. S., Yoon, Y. H., & Koh, J. Y. (2015). The zinc ionophore clioquinol reverses autophagy arrest in chloroquine-treated ARPE-19 cells and in APP/mutant presenilin-1-transfected Chinese hamster ovary cells. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3228–3238.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2015.09.006>
- Shankar, A. H., & Prasad, A. S. (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2 Suppl). <https://doi.org/10.1093/AJCN/68.2.447S>
- Singh, B., Ryan, H., Kredo, T., Chaplin, M., & Fletcher, T. (2021). Chloroquine or hydroxychloroquine for prevention and treatment of COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 34(2), 305–307.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD013587>
- Srihari, P., Minns, A. B., Gao, H. T., & Kreshak, A. A. (2022). Massive Nonfatal Hydroxychloroquine Ingestion in a Pediatric Patient. *The Journal of Emergency Medicine*, 62(3), 332–336.
<https://doi.org/10.1016/J.JEMERMED.2021.10.043>
- Szendrey, M., Guo, J., Li, W., Yang, T., & Zhang, S. (2021). COVID-19 Drugs Chloroquine and Hydroxychloroquine, but Not Azithromycin and Remdesivir, Block hERG Potassium Channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 377(2), 265–272.
<https://doi.org/10.1124/JPET.120.000484>
- Taherian, E., Rao, A., Malemud, C. J., & Askari, A. D. (2013). The biological and

clinical activity of anti-malarial drugs in autoimmune disorders. *Current Rheumatology Reviews*, 9(1), 45–62.
<https://doi.org/10.2174/1573397111309010010>

Takemoto, Y., Slough, D. P., Meinke, G., Katnik, C., Graziano, Z. A., Chidipi, B., Reiser, M., Alhadidy, M. M., Ramirez, R., Salvador-Montañés, O., Ennis, S., Guerrero-Serna, G., Haburcak, M., Diehl, C., Cuevas, J., Jalife, J., Bohm, A., Yu-Shan, L. S., & Noujaim, S. F. (2018). Structural basis for the antiarrhythmic blockade of a potassium channel with a small molecule. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(4), 1778–1793.
<https://doi.org/10.1096/FJ.201700349R>

Tejeda-Guzmán, C., Rosas-Arellano, A., Kroll, T., Webb, S. M., Barajas-Aceves, M., Osorio, B., & Missirlis, F. (2018). Biogenesis of zinc storage granules in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 221(6).
<https://doi.org/10.1242/jeb.168419>

Vallee, B. L., & Galdes, A. (1984). The metallobiochemistry of zinc enzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 56, 283–430. <https://doi.org/10.1002/9780470123027.CH5>

Villamil Giraldo, A. M., Appelqvist, H., Ederth, T., & Öllinger, K. (2014). Lysosomotropic agents: Impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 42, Issue 5, pp. 1460–1464). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20140145>

Vinkenborg, J. L., Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Koay, M. S., Rutter, G. A., & Merx, M. (2009). Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. *Nature Methods*, 6(10), 737–740.

<https://doi.org/10.1038/NMETH.1368>

Xue, J., Moyer, A., Peng, B., Wu, J., Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2014). Chloroquine is a zinc ionophore. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109180>

Zirin, J., Nieuwenhuis, J., & Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biol*, 11(11), 1001708. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001708>