

UCH-FC
MAG-B
E773
C.1



ESTÍMULOS INFLAMATORIOS MODIFICAN LA
HOMEOSTASIS DE HIERRO EN LÍNEAS
CELULARES DE ORIGEN CEREBRAL Y PROVOCAN
DAÑO OXIDATIVO QUE ES INHIBIDO POR UN
QUELANTE DE HIERRO MULTIFUNCIONAL

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Andrés L. Esparza Martínez

Noviembre, 2016

Director de Tesis Dr.: Marco Tulio Núñez



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

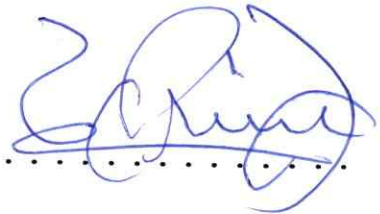
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ANDRÉS L. ESPARZA MARTÍNEZ

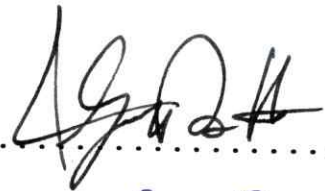
Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de Septiembre del año 2016.

Director de Tesis:
Dr. Marco Tulio Núñez



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth



Dr. Miguel Arredondo





Mi nombre es Andrés Esparza Martínez. Nací en Santiago el 16 de Febrero de 1979. Mis primeros recuerdos académicos transcurren en el Colegio El Greco de Pedro Aguirre Cerda y posteriormente en el Instituto Nacional, donde completé mi enseñanza media. Entré a la Universidad de Chile para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Buscando perfeccionamiento, ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas, pudiendo hoy felizmente dar por terminada esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Marco Tulio Núñez por la confianza depositada en mí, por guiarme y siempre apoyarme a lo largo de todos estos años.

También a todos los miembros del laboratorio, actuales y pasados, con quienes siempre pude contar.

Agradezco a los profesores Alejandro Roth y Miguel Arredondo, por sus críticas y sugerencias, que ayudaron a mejorar este trabajo.

Finalmente a todos quienes siempre estuvieron junto a mí en los momentos complicados, en especial a mis hijos Lorenzo y Helena que con su alegría y energía contribuyeron de manera fundamental en la concreción de esta tesis.

ÍNDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE MATERIAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Reactivos generales.....	13
Equipos utilizados.....	13
Reactivos usados en los tratamientos.....	13
Tratamientos.....	13
Quelantes.....	13
Sonda fluorescente.....	13
Preparación de la soluciones de Fe ⁺² y Fe ⁺³	14
Anticuerpos.....	14

Células.....	15
Cultivo celular.....	15
Viabilidad.....	16
Niveles de mRNA.....	16
Preparación de extractos celulares.....	18
Determinación de la concentración de proteínas.....	18
Geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	19
Inmunodetección.....	19
<i>Stripping</i> de las membranas de nitrocelulosa.....	20
Determinación de la producción de ROS intracelulares inducida por hierro.....	21
Daño oxidativo.....	22
Programas utilizados.....	22
Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	23
1. Establecimiento de los cultivos celulares y estandarización del RT-PCR. Estudios sobre concentración y actividad de los estímulos inflamatorios y hepcidina. Validación del anticuerpo para DMT1.....	23
1.1 Líneas celulares de neuronas (N2A), astrocitos (C8D1A) y microglías (BV2)...	23
1.2 Determinación del número de ciclos para verificar el rango lineal de amplificación del RT-PCR.....	25
1.3 Efecto del LPS e IL-6 sobre la viabilidad celular.....	27
1.4 Efecto de hepcidina sobre FPN1 en células J774.....	29
1.5 Validación del anticuerpo para DMT1.....	30
2. Determinación del o los tipos celulares que ante un estímulo inflamatorio modifican la expresión de los transportadores de hierro y de hepcidina.....	31

2.1 Efecto de LPS e IL-6 sobre los niveles de proteína y mRNA de DMT1 y FPN1 en células N2A, C8D1A y BV2.....	31
2.2 Efecto de LPS e IL-6 sobre la expresión de hepcidina en células N2A, C8D1A y BV2.....	36
2.3 Efecto de hepcidina sobre los niveles de mRNA y proteína de DMT1 y FPN1 en células N2A, C8D1A y BV2.....	39
3. Efecto de los quelantes de hierro Q1 y MT1 sobre el daño oxidativo asociado a estímulos inflamatorios.....	42
3.1 Efecto de Q1 y MT1 sobre la viabilidad de los cultivos celulares.....	43
3.2 Efecto de Q1 y MT1 sobre la producción de ROS asociada a la entrada de hierro.....	47
3.3 Efecto de Q1 y MT1 sobre el aumento en la peroxidación lipídica inducida por LPS células BV2.....	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Líneas celulares utilizadas.....	24
Figura 2.	Estandarización del número de ciclos y Tm para los RNA mensajeros de DMT1, FPN1, hepcidina y actina.....	26
Figura 3.	Efecto de LPS e IL-6 sobre la viabilidad de las líneas celulares.....	28
Figura 4.	Hepcidina disminuye los niveles proteicos de FPN1 en la línea celular de macrófagos J774.....	29
Figura 5.	La abundancia proteica de DMT1 responde a la concentración de hierro celular en células BV2.....	30
Figura 6.	LPS aumenta los niveles proteicos de DMT1 en los tres linajes celulares de manera similar.....	32
Figura 7.	IL-6 aumenta los niveles proteicos de DMT1 en líneas celulares N2A y C8D1A, pero no tiene efecto sobre las células BV2.....	33
Figura 8.	Efecto de LPS sobre el mRNA de DMT1 y FPN1 en las líneas celulares.....	34
Figura 9.	Efecto de IL-6 sobre el mRNA de DMT1 y FPN1 en las líneas celulares.....	35
Figura 10.	LPS estimula significativamente la producción de hepcidina exclusivamente en células BV2.....	37
Figura 11.	IL-6 estimula la producción de hepcidina en células C8D1A y BV2, pero no en N2A.....	38
Figura 12.	Hepcidina no tiene efecto sobre la abundancia de RNA mensajeros de DMT1 y FPN1.....	39
Figura 13.	Hepcidina disminuye los niveles proteicos de FPN1 en N2A y aumenta los niveles proteicos de DMT1 en BV2.....	41
Figura 14.	Estructuras de los quelantes Q1 y MT1.....	42
Figura 15.	Efecto de Q1 y MT1 sobre la viabilidad de las líneas celulares.....	44

Figura 16.	LPS disminuye la viabilidad de células BV2 exclusivamente.....	45
Figura 17.	MT1 y no Q1 protege de la pérdida de viabilidad asociada al tratamiento con LPS en BV2.....	46
Figura 18.	Q1 y MT1 disminuyen la producción de ROS inducida por hierro...	48
Figura 19.	MT1 y no Q1 inhibe la peroxidación lipídica inducida por LPS en células BV2.....	50
Figura 20.	Esquema resumen de los cambios en los niveles de DMT1, FPN1 y en la expresión de hepcidina observados en las líneas celulares, tras los tratamientos con LPS, IL-6 y hepcidina.....	52
Figura 21	Modelo de interacción entre los tres linajes celulares en un escenario de inflamación inducido por LPS.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias de los partidores utilizados en el estudio.....	17
Tabla 2.	Condiciones de los PCR realizados.....	26

ABREVIATURAS

BCA	ácido bicinconínico
BSA	albúmina de suero bovino
cAMP	adenosín monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
Cu ⁺²	cobre
dbcAMP	dibutiril adenosín monofosfato cíclico
DCDHF-DA	2',7'-diclorodihidro fluoresceína-diacetato
DEPC	dietyl pirocarbonato
dH ₂ O	agua des-ionizada
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DMT1	transportador de metales divalentes
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FAS	sulfato de amonio ferroso
FPN1	ferroportina 1
Fe	hierro
Hepc	hepcidina

HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
hrs	horas
IL-6	Interleuquina-6
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRE	elementos de respuesta a hierro de mRNA
IRP	Proteína regulatoria del hierro
kDa	kiloDalton
LIP	fracción de hierro redox-activo
LPS	Lipopolisacárido
mins	minutos
mRNA	RNA mensajero
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
NTA	ácido nitrilotriacético, N,N-bis[carboximetil]glicina
PBS	solución de amortiguador fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
RNA	ácido ribonucleico
RCF	fuerza gravitacional
ROS	especies reactivas del oxígeno
rpm	revoluciones por minuto



SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
Tween20	polioxietilen sorbitan monolaurato
Tm	temperatura de apareamiento
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal

RESUMEN

Dos características relevantes en varias enfermedades neurodegenerativas son la inflamación y la acumulación de hierro en células del SNC. La relación entre estos dos fenómenos es fundamental para entender la causa y progresión de estas enfermedades. En este trabajo comprobamos que la inflamación actúa como un putativo inductor de la acumulación de hierro, analizando el efecto de LPS y la citoquina pro-inflamatoria IL-6 en las principales proteínas que controlan la entrada y salida de hierro en linajes celulares de neuronas (N2A), astrocitos (C8D1A) y microglías (BV2). Encontramos que el efecto más significativo del tratamiento pro-inflamatorio fue el aumento de los niveles del transportador de entrada DMT1, consistente con un fenotipo orientado a acumular hierro. Además encontramos que LPS indujo la expresión del regulador de la homeostasis de hierro hepcidina en microglías (BV2), pero no en neuronas (N2A) ni en astrocitos (C8D1A). Adicionalmente encontramos que hepcidina disminuyó los niveles de FPN1 en N2A y aumentó los niveles de DMT1 en células BV2.

En relación al daño celular inducido por estímulos inflamatorios, encontramos que en células microgliales BV2, el LPS aumentó la muerte y el daño oxidativo. También observamos que el quelante multifuncional de hierro de distribución mitocondrial MT1 neutralizó el daño oxidativo y la muerte celular inducidos por LPS. Los resultados de esta tesis son consistentes con la hipótesis de que el mecanismo de muerte inducido por LPS en células microgliales BV2 involucra la desregulación de la homeostasis del hierro, un aumento del daño oxidativo y, finalmente, muerte. Este proceso puede ser neutralizado mediante quelantes de hierro con destinación mitocondrial.

ABSTRACT

Inflammation and iron accumulation are pathogenic signs in a variety of neurodegenerative diseases. The association between these two phenomena is fundamental in order to understand the cause and progression of these diseases. In this work, we tested if inflammation acts as a putative inductor of iron accumulation. We analysed the effect of LPS and IL-6 on the expression of the principal proteins controlling iron influx and exit, using N2A (neuronal), C8D1A (astrocytes) and BV2 (microglia) cells. We found that the most significant effect of pro-inflammatory treatment was the induction of the iron uptake transporter DMT1, consistent with a phenotype of iron accumulation. In addition we found that LPS treatment increased the expression of the iron homeostasis regulator hepcidin in BV2 cells but not in N2A cells or C8D1A cells. In addition, hepcidin reduced FPN1 protein levels in N2A cells and enhanced DMT1 protein levels in BV2 cells.

Additionally, we found that LPS increased oxidative damage and cellular death in BV2 cells. The multifunctional, mitochondria-tagged iron chelator MT1 was able to block both oxidative damage and death in LPS-treated BV2 cells.

Overall, the results of this thesis are consistent with the notion that LPS toxicity in BV2 cells involves iron homeostasis deregulation, increased oxidative damage and finally death, a process that can be ameliorated by mitochondria-tagged iron chelators.

INTRODUCCIÓN

Homeostasis de hierro en el sistema nervioso central

En el cerebro, el hierro forma parte esencial de diversas enzimas, proteínas estructurales, de transporte y almacenaje; además de otras proteínas involucradas en la mielinización, síntesis de neurotransmisores y procesos catabólicos en general (Beard y Connor 2003; Ke y Qian 2007). La distribución de hierro en el cerebro es bastante heterogénea, lo que sugiere que debe existir un sistema altamente regulado para la incorporación, distribución y almacenaje de hierro en el tejido cerebral (Beard y Connor 2003).

El hierro ingresa a las células cerebrales mediante dos rutas. La primera es la endocitosis de ferri-transferrina, donde el hierro ingresa unido a transferrina (TBI, transferrin bound iron) mientras que la segunda se lleva a cabo directamente por el transportador de Fe^{+2} , DMT1, mediante el proceso denominado incorporación de hierro no unido a transferrina (NTBI, non transferrin bound iron). El hierro incorporado se distribuye principalmente hacia las mitocondrias y hacia la proteína de almacenaje, ferritina. Una no despreciable fracción del hierro celular, se encuentra unido con baja afinidad a diversos componentes celulares de bajo peso molecular, constituyendo la fracción de hierro reactivo, o fracción de hierro redox-activo (LIP, labile iron pool), que puede alternar libremente entre sus estados de oxidación Fe^{+2} y Fe^{+3} , catalizando en presencia de O_2 , la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Dado el alto consumo de oxígeno del tejido cerebral (Jain y cols. 2010), la concentración de hierro debe ser mantenida en estrictos márgenes para evitar el daño que los ROS pueden potencialmente causar al DNA, proteínas y membranas biológicas (Inoue y Kawanishi 1987; Kruszewski 2003).

La fracción de hierro redox-activo celular

La fracción de hierro reactivo (LIP) se define como la fracción de hierro intracelular que se encuentra en las células unido con baja afinidad. Operacionalmente puede ser definido por su capacidad de apagar el fluoróforo calceína con una constante de afinidad para los complejos en el LIP de $<10^6$ (Epsztejn y cols. 1997). Debido al ambiente reductor celular, el hierro en el LIP se encuentra en su mayoría en el estado Fe^{+2} , aunque Fe^{+3} se produce transitoriamente como resultado de oxidaciones celulares. La naturaleza de los componentes que unen el hierro en el LIP es desconocida, aunque se piensa que podrían ser diversos componentes celulares de bajo peso molecular, como grupos fosfatos, nucleótidos, aminos, hidroxilos y sulfidrilos (Kakhlon y Cabantchik 2002; Petrat y cols. 2002). Normalmente el LIP representa sólo el 3-5% del hierro total de la célula, pero su proporción cambia con el status de hierro celular. Células de neuroblastoma cultivadas en medio alto en hierro contienen 3-4 veces más LIP que células cultivadas en medio bajo en hierro (Núñez y cols. 2004). Además, las células con elevados niveles de LIP, invariablemente presentan altos niveles de ROS. De esta forma, el LIP refleja no sólo los niveles totales de hierro celular sino que también determina el estado redox celular (Kruszewski 2003; Arredondo y Núñez 2005; Núñez y cols. 2012).

Varios procesos neurodegenerativos, que involucran la acumulación de hierro redox-activo, se hacen presentes al envejecer. Las razones por las cuales el hierro incrementa anormalmente en algunas regiones del cerebro, y si es que esta acumulación es un evento inicial o una consecuencia de la progresión de diversas patologías incluidas las enfermedades de Parkinson (PD) y la enfermedad de Alzheimer (AD), son objetos de activa investigación en la actualidad (Ke y Qian 2007; Liddell 2015; Schneider 2016).

DMT1

DMT1 (divalent metal transporter 1, también denominado SLC11A2 y Nramp2) media el transporte de Fe^{+2} al interior de las células mediante un mecanismo de co-transporte con H^{+} (Gunshin y cols. 1997).

El gen para DMT1 da origen a cuatro isoformas diferentes que difieren en sus extremos amino y carboxilo terminales. Las variantes del mRNA 1A y 1B se originan a través del uso alternativo de dos secuencias AUG en marco de lectura con el resto del gen, mientras que las variantes +IRE y -IRE surgen del procesamiento (*splicing*) alternativo de la región 3' (Hubert y Hentze 2002). Las cuatro isoformas de DMT1 transportan activamente Fe^{+2} (Tabuchi y cols. 2002). Además, las isoformas de DMT1 tienen distribuciones tejido-específicas (Hubert y Hentze 2002) y propiedades particulares de reciclaje y localización sub-celular (Lam-Yuk-Tseung y Gros 2006). Las isoformas 1A se encuentran preferentemente expresadas en duodeno, donde participan en la absorción intestinal de hierro, mientras que las isoformas 1B son expresadas ubicuamente (Hubert y Hentze 2002).

En la actualidad se encuentra aceptado que las dos isoformas +IRE de DMT1 son reguladas post-transcripcionalmente, mediante el sistema IRE/IRP. Este sistema regula traduccionalmente la expresión de las principales proteínas que controlan la homeostasis celular de hierro (receptor de transferrina, DMT1, FPN1 y ferritina) mediante la actividad de las IRPs (proteínas regulatorias del hierro, IRP1 e IRP2) y su unión a elementos IREs encontrados en las regiones no traducidas de los mRNAs que codifican estas proteínas. Por ejemplo, la unión de las IRPs a las variantes +IRE de DMT1 estabiliza sus mRNAs permitiendo una traducción aumentada. La actividad IRP responde a la concentración celular de hierro, inactivándose en condiciones de alto hierro y activando su unión al mRNA blanco en condiciones de bajo hierro (Wallander y cols. 2006).

Muy poco se conoce sobre la regulación transcripcional de DMT1. El factor de transcripción NFκB, asociado a la expresión de genes pro-inflamatorios, y el factor nuclear YA, el cual ejerce una regulación diferencial sobre una amplia variedad de genes a través de la interacción con las cajas CCAAT, regulan la expresión de las isoformas 1B de DMT1 (Paradkar y Roth 2006a; Paradkar y Roth 2006b; Paradkar y Roth 2007), mientras que la isoforma 1A incrementa su expresión en respuesta a hipoxia, presumiblemente a través de la unión de factores de transcripción a elementos de respuesta a hipoxia en la zona promotora de esta isoforma (Lis y cols. 2005). En macrófagos, los estímulos inflamatorios como Interferón-gama y LPS, también inducen la síntesis de DMT1 y promueven la incorporación de hierro (Wardrop y Richardson 2000).

En un trabajo reciente se demostró que MPTP, una droga que causa Parkinson experimental, incrementa la expresión de DMT1+IRE en el mesencéfalo ventral del ratón, donde aumenta la muerte neuronal, presumiblemente a través del aumento anormal del contenido de hierro (Salazar y cols. 2008). Debido a que las isoformas 1B responden a estímulos inflamatorios, la relación entre la inflamación y la acumulación de hierro mediado por DMT1 en cerebro es un proceso crucial que debe ser controlado estrictamente para evitar el desencadenamiento de procesos neurodegenerativos.

Ferroportina 1

Ferroportina 1 (FPN1; también denominado SLC40A1) es el único miembro de la familia de transportadores SLC40 y la primera proteína reportada que media la salida de hierro desde las células (McKie y cols. 2000). Estudios en el ratón *knockout* han mostrado que FPN1 es críticamente necesario para la transferencia de hierro placentario durante el desarrollo, absorción de hierro intestinal y salida de hierro desde los macrófagos (Donovan y cols. 2005). Una de las características más importantes de FPN1 es la regulación de sus niveles de proteína mediante hepcidina, como se discute más adelante.

Varios reportes han establecido la presencia de FPN1 en el sistema nervioso central. FPN1 se encuentra en células epiteliales del plexo coroideo, oligodendrocitos, astrocitos y células endoteliales; además de neuronas a través del cerebro en regiones que incluyen la corteza, hipocampo, estriado y sustancia nigra (Wu y cols. 2004; Moos y Rosengren Nielsen 2006).

El rol de FPN1 en el sistema nervioso central, en condiciones fisiológicas y en enfermedades neurodegenerativas, no ha sido suficientemente estudiado. Sin embargo, hemos encontrado en nuestro laboratorio que en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, las células que sobreviven a un protocolo de sobrecarga progresiva de hierro, invocan una respuesta adaptativa que consiste en la disminución en la síntesis de DMT1 y un aumento en la síntesis de FPN1 (Aguirre y cols. 2005). Este estudio establece la posibilidad que FPN1 sea un factor primordial en la capacidad de las células neuronales de revertir una sobrecarga de hierro y predice que una caída progresiva en los niveles de FPN1 pueda ser una causa primaria de acumulación anormal de hierro en cerebro.

Hepcidina

Hepcidina, un pequeño péptido antimicrobiano sintetizado por el hígado en respuesta al aumento en el hierro circulante y a otros factores (anemia, hipoxia e inflamación), es considerado el regulador maestro de la biodisponibilidad de hierro corporal (Nicolas y cols. 2001; Park y cols. 2001; Pigeon y cols. 2001; Ganz 2011). La primera evidencia que relacionó directamente a hepcidina con el metabolismo del hierro surge del ratón *knockout*, el cual presenta al nacer una severa sobrecarga de hierro (Nicolas y cols. 2001; Pigeon y cols. 2001). Estudios posteriores demostraron que ratones que sobreexpresan hepcidina presentan depósitos disminuidos de hierro y una severa anemia, la mayoría de los cuales muere poco tiempo después de nacer (Nicolas y cols. 2002a). Estos defectos sugieren que altas concentraciones de hepcidina bloquean la transferencia placentaria de hierro desde la madre al feto (Ganz 2011).

Estudios posteriores han establecido que hepcidina es un regulador negativo de la biodisponibilidad de hierro corporal, disminuyendo la incorporación intestinal y promoviendo el secuestro de hierro en el sistema retículo-endotelial.

El mecanismo mediante el cual hepcidina disminuye el hierro circulante es dependiente del tipo celular. En macrófagos, se une a FPN1, induciendo su internalización y posterior degradación en lisosomas (De Domenico y cols. 2007). En enterocitos, hepcidina inhibe la expresión de DMT1, disminuyendo la absorción intestinal de hierro (Chaston y cols. 2008; Mena y cols. 2008).

Los niveles de hepcidina circulante son además regulados estrictamente en respuesta a anemia e hipoxia. Además del aumento en eritropoyetina, la pérdida de eritrocitos resulta en hipoxia en los tejidos y en la consiguiente disminución de los niveles de hepcidina circulante (Nicolas y cols. 2002b), para promover el aumento de hierro necesario para sintetizar nuevos eritrocitos.

Hepcidina es también un intermediario esencial entre infección, inflamación y el metabolismo de hierro. Durante infección o inflamación, la síntesis de hepcidina es robustamente aumentada a través de un mecanismo independiente de los depósitos de hierro o la actividad eritropoyética (Ganz 2006). Durante inflamación de fase aguda, IL-6 es un importante inductor de la síntesis y liberación de hepcidina (Nemeth y cols. 2004). Pocas horas tras este estímulo, la excreción urinaria de hepcidina incrementa 7 veces, en voluntarios humanos inyectados con IL-6. Este aumento es acompañado por una marcada disminución de la concentración de hierro plasmático.

Experimentos posteriores han mostrado que estos cambios no ocurren en ratones deficientes en IL-6 o hepcidina (Nemeth y cols. 2004). Trabajo posterior ha revelado que IL-1, BMP2 4 y 9, además de TGF- β , también regulan la síntesis de hepcidina (Babitt y cols. 2006; Truksa y cols. 2006).

El rol de hepcidina en la homeostasis de hierro en el sistema nervioso central está comenzando a ser entendido. En el cerebro de ratón, transcritos de hepcidina han sido reportados en neuronas y glías positivas para GFAP en la corteza, hipocampo, mesencéfalo, amígdala, tálamo, bulbo olfatorio, hipotálamo y cerebelo (Zechel y cols. 2006). La administración de LPS mediante inyección intravenosa regula la expresión de mRNA y proteína de hepcidina no sólo en tejidos periféricos como el hígado, sino también en cerebro, estableciendo la posibilidad que cualquiera de los linajes celulares cerebrales pueda producir y secretar activamente hepcidina. Los resultados publicados por nuestro laboratorio indicaron que las neuronas de hipocampo no expresan hepcidina, mientras que los cultivos primarios de astrocitos y microglías expresan hepcidina y aumentan su expresión en presencia de estímulos inflamatorios (Urrutia y cols. 2013).

Los estímulos inflamatorios inducen la expresión de hepcidina en cerebro. La inyección intravenosa de LPS induce un aumento significativo en la expresión de mRNA y proteína de hepcidina en la corteza y sustancia nigra, pero no en hipocampo o estriado (Wang y cols. 2008a). Por otro lado, la inyección intra-cerebro-ventricular de hepcidina disminuye los niveles de mRNA y proteína de FPN1 en corteza e hipocampo, además de aumentar la proteína DMT1 evaluado mediante inmuno-histoquímica en estas zonas (Li y cols. 2011). Otros antecedentes interesantes son los aportados en el trabajo de Wang (Wang y cols. 2010), que muestra que la inyección de hepcidina en el ventrículo lateral

cerebral disminuye los niveles de proteína de FPN1 en corteza, estriado e hipocampo. Además en este trabajo se muestra que el tratamiento de hepcidina sobre cultivos primarios de neuronas disminuye los niveles de FPN1 y disminuye concordantemente la liberación de hierro evaluado en estos cultivos.

Si bien la acción primaria de hepcidina en cerebro parece ser la de degradar la proteína FPN1 y por lo tanto promover el secuestro de hierro al interior celular, no es claro en cerebro si el mecanismo de acción de hepcidina es similar en los tres linajes principales del cerebro o es linaje-dependiente. Los resultados publicados por nuestro laboratorio indicaron que en cultivos primarios de neuronas, astrocitos y microglías, hepcidina disminuyó los niveles proteicos de FPN1. Un efecto no esperado de hepcidina fue que en microglías además aumentó los niveles de DMT1 (Urrutia y cols. 2013).

Inflamación y homeostasis de hierro

Los resultados obtenidos por nuestro laboratorio acerca de que la inflamación modifica la homeostasis de hierro en el SNC (Urrutia y cols. 2013), han sido replicados en otros sistemas (Pelizzoni y cols. 2013; Wang y cols. 2013). En estos, las citoquinas pro-inflamatorias provocan una acumulación de hierro principalmente induciendo la expresión del transportador DMT1. Por otro lado, parece claro que el componente inflamatorio presente en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas provoca daño oxidativo que contribuye al desarrollo de la enfermedad. Este daño oxidativo podría ser una consecuencia de la acumulación de hierro. También podría ser un evento independiente, pero potenciado por la acumulación de hierro al interior celular.

Quelantes de hierro

En el laboratorio actualmente una importante línea de investigación la constituye el estudio de la quelación de hierro como una nueva terapia para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, las cuales invariablemente presentan un componente de acumulación de hierro (Oshiro y cols. 2011; Ward y cols. 2012; Weinreb y cols. 2013). Recientemente hemos descrito las propiedades celulares de Q1, un nuevo quelante de hierro con destinación mitocondrial, el cual ha mostrado ser efectivo en disminuir el daño celular en un modelo de enfermedad de Parkinson (Mena y cols. 2015). También hemos sintetizado un nuevo quelante, MT1, derivado de cumarinas, el cual ha mostrado promisorios resultados inhibiendo la peroxidación lipídica, y el daño oxidativo evaluado mediante la formación de aductos de HNE, asociados al tratamiento con rotenona y a la intoxicación con MPTP (ambos modelos de la enfermedad de Parkinson) (Núñez y cols. manuscrito en preparación).

Sobre la base de estos antecedentes, nos propusimos caracterizar los efectos de la inflamación sobre los transportadores DMT1 y FPN1, además de hepcidina, usando líneas celulares de neuronas, astrocitos y microglías. Adicionalmente también nos propusimos investigar el rol de hepcidina en este escenario. Por otro lado, quisimos caracterizar el daño celular asociado a estados inflamatorios en nuestro sistema celular y posteriormente investigar si el tratamiento con los quelantes Q1 y MT1 podía inhibir este daño celular.

HIPÓTESIS

Ante un estímulo inflamatorio las líneas celulares de neurona N2A, astrocito C8D1A y microglía BV2, modifican la expresión de proteínas de la homeostasis del hierro, induciendo la acumulación de hierro celular y promoviendo daño oxidativo. Este daño puede ser neutralizado utilizando quelantes de hierro que tienen destinación mitocondrial.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de LPS e IL-6 sobre la viabilidad y expresión de los transportadores DMT1 y FPN1 en líneas celulares de neuronas, astrocitos y microglías y estudiar el posible efecto protector de quelantes de hierro con destinación mitocondrial en este escenario.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el o los tipos celulares que ante un estímulo inflamatorio modifican la expresión de los transportadores de hierro y de hepcidina utilizando líneas celulares de neuronas (N2A), astrocitos (C8D1A) y microglías (BV2).

1.1. Evaluar en células N2A, C8D1A y BV2 el efecto de LPS e IL-6 sobre los niveles de mRNA y proteína de DMT1 y FPN1.

1.2. Evaluar en células N2A, C8D1A y BV2 el efecto de LPS e IL-6 sobre la expresión de hepcidina.

1.3. Evaluar en células N2A, C8D1A y BV2 el efecto de hepcidina sobre los niveles de mRNA y proteína de DMT1 y FPN1.

2. Determinar si el tratamiento con estímulos inflamatorios producen daño oxidativo y si este daño celular puede ser neutralizado con nuevos quelantes con base 8-hidroxiquinolina (Q1) y 7,8-hidroxicumarina (MT1).

2.1. Determinar si el tratamiento con LPS e IL-6 producen una disminución en la viabilidad celular y daño celular asociado.

2.2. Determinar si el daño celular asociado a la exposición a LPS o IL-6 puede ser neutralizado utilizando nuevos quelantes de hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales. Acrilamida, agarosa, persulfato de amonio, azul de bromo fenol, 2-mercaptoetanol, bis-acrilamida, BSA, CaCl₂, deoxicolato de sodio, EDTA, etanol, FeCl₃, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, glicina, glicerol, glucosa, HEPES, HCl, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, MgSO₄, metanol, NaCl, Na₂HPO₄, NaHCO₃, NaOH, NP40, NTA, PMSF, rojo Ponceau, SDS, TEMED, TRIS y Tween20.

Equipos utilizados. Incubador con inyección de CO₂ modelo 3429 (ThermoScientific); Campana de Flujo Laminar Horizontal (NuAire); Campana de Flujo Laminar Vertical MSC9 (Jouan); Microscopio compuesto de campo claro (AmScope); Microcentrífuga MIKRO 22R (Hettich); Lector de Placas ELISA SUNRISE™ (Tecan); Cámaras Electroforéticas (Bio-Rad); Transiluminador UV (UVP Inc.); Sistema para Geles Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad); Sistema de Transferencia Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad); Lector de Fluorescencia Synergy 2™ (BioTek).

Reactivos usados en los tratamientos. Hecidina sintética (Peptides International Inc 4392-s); LPS (Sigma-Aldrich); IL-6 (R&D Systems).

Tratamientos. Los tratamientos fueron LPS 1 µg/ml e IL-6 50 ng/ml, durante 24 horas; hecidina 700 nM, durante 6 horas.

Quelantes. Q1 se preparó en DMSO a una concentración de 50 mM. A partir de esta solución concentrada se preparó un stock 10 mM, en DMSO 20%. MT1 se preparó a una concentración de 40 mM en HCl 80 mM y 30% etanol.

Sonda fluorescente. 2',7'-diclorodihidro fluoresceína-diacetato (DCDHF-AM) (Invitrogen, Molecular Probes).

Preparación de las soluciones de Fe^{+2} y Fe^{+3} . En los experimentos de producción de ROS se ofreció a las células Fe^{+2} en la forma de sulfato de amonio ferroso, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (FAS), disuelto en dH₂O y preparado fresco. Para los tratamientos con LPS, IL-6 y hepcidina en DMEM 1% SFB, en los que el medio se suplementó con 7 μ M Fe, se utilizó una fuente de Fe^{+3} como Fe:NTA. En el experimento de validación del anticuerpo DMT1, donde se incubaron las células BV2 con diferentes concentraciones de Fe durante 24 horas, también se usó Fe:NTA. Esta solución se preparó mezclando una solución stock de $FeCl_3$ 100 mM (disuelta en HCl 1 N) con NTA 100 mM (ácido nitrilotriacético, Sigma-Aldrich) en una relación Fe:NTA de (1:2,2 mol:mol), preparándose una solución stock Fe:NTA 5 mM. El NTA permitió que el hierro permaneciera en forma estable en su estado de oxidación +3 en solución.

Anticuerpos. Anti-DMT1: policlonal producido en conejo panDMT1, preparado contra una secuencia del amino-terminal de DMT1 común a todas las isoformas de DMT1. El anticuerpo reconoce la siguiente secuencia: MVLGPEQKMSDDSVSGDH, la cual es una secuencia consenso entre las especies ratón, rata y humano. (Biosynthesis, Enero 2008).

Anti-FPN1: Policlonal producido en conejo (AlphaDiagnostic).

Anti- β -Actina: Monoclonal producido en ratón (Sigma-Aldrich).

Anti-HNE: Monoclonal producido en ratón (Abcam).

Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo, acoplado a peroxidasa (ImmunoPure® Antibody, Pierce, ThermoScientific) y anti-IgG de ratón, acoplado a peroxidasa (ImmunoPure® Antibody, Pierce, ThermoScientific)

Células. Utilizamos la línea celular de neuroblastoma N2A (ATCC CCL-131) que fue diferenciada hacia un fenotipo neuronal dopaminérgico mediante la estimulación con dibutilil-cAMP, como se describe en (Tremblay y cols. 2010); la línea celular de astrocito C8D1A (ATCC CRL-2541) (Alliot y Pessac 1984); y la línea celular de microglía BV2 (Blasi y cols. 1990). También fue utilizada la línea celular de macrófagos J774 (ATCC TIB-67) y la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266).

Cultivo celular. Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco®, Life Technologies), suplementado con NaHCO_3 3,7 g/L, esterilizado mediante filtros de 0,22 μm (TPP, Techno Plastic Products AG) y complementado con solución de antibiótico y antimicótico (Anti-Anti, Gibco®, Invitrogen) y suero fetal de bovino (SFB) 10% (Gibco®, Invitrogen). Las células N2A fueron cultivadas en DMEM 5% SFB, mientras que las células C8D1A y BV2 fueron cultivadas en DMEM 10% SFB. Para la mantención de las células se sembraron en placas de 60mm (P60, Corning). Las células N2A a una densidad de 200.000 células/placa (10.000 células/ cm^2); las células C8D1A a una densidad de 50.000 células/placa (2500 células/ cm^2) y las células BV2 a una densidad de 100.000 células por placa (5000 células/ cm^2). Las células fueron cultivadas durante 4 días sin cambio de medio. Para los pasajes, se lavaron 3 veces con amortiguador fosfato salino modificado por Dulbecco (PBS) (Gibco®, Invitrogen), y se utilizó tripsina (0,5 % Trypsin-EDTA, Gibco®, Invitrogen). Para los experimentos con LPS, IL-6 y hepcidina, las células N2A fueron sembradas en DMEM 5% SFB. Tras 48 horas, y previo a los tratamientos, se indujo su diferenciación mediante la incubación con DMEM 1% SFB suplementado con 1 mM dbcAMP durante 24 horas.

Los tratamientos en las 3 líneas celulares se efectuaron en DMEM 1% SFB y suplementado con 7 μ M Fe:NTA.

Las células J774 fueron cultivadas en DMEM 10% SFB con alta glucosa (4,5 g/L). Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en MEM-F12 10% SFB.

Viabilidad. Como estimación de la viabilidad celular se utilizó el método del MTT (Mosmann 1983), que relaciona actividad mitocondrial con viabilidad. El ensayo implica la conversión del MTT, soluble en agua, al compuesto insoluble formazán. El formazán luego es solubilizado, y la concentración es determinada midiendo la absorbancia a 570 nm. (Mosmann 1983).

Niveles de mRNA. Se realizó mediante RT-PCR semi-cuantitativo contra los mRNAs de DMT1, FPN1, hepcidina y actina. Para extraer RNA total desde neuronas, astrocitos y microglías, se utilizó TRIzol según instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue disuelto en dH₂O tratada con DEPC y cuantificado a través de un *nanodrop* (BioTek). La síntesis del cDNA se realizó mediante el uso de la transcriptasa reversa M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) usando como templado 1 μ g de RNA total. En un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas se agregaron 1 μ g de RNA total, 1 μ l de oligodT 500 μ g/ml, 1 μ l de MixdNTP 10 mM (10 mM de cada uno de los nucleótidos trifosfatos dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y agua libre de nucleasas. La mezcla fue calentada a 65°C por 5 minutos y enfriada rápidamente a 4°C. Luego se agregó 4 μ l de Buffer RT completo 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ l de DTT 0,1 M, 1 μ l de Inhibidor de Ribo nucleasas y 1 μ l de M-MLV RT. El contenido de los tubos fue mezclado e incubado por 50 minutos a 37°C. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 minutos.

El 10% del cDNA generado fue usado como templado para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas se agregaron 2,5 µl de Buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de MixdNTP 10 mM, 0,5 µl de partidor *Forward* de amplificación (10 µM), 0,5 µl de partidor *Reverse* de amplificación (10 µM), 0,5 µl de *Taq* DNA Polimerasa (5 U/µl), 2 µl de cDNA y 17 µl de agua libre de nucleasas. Los partidores utilizados y las temperaturas de apareamiento (T_m) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los partidores utilizados en el estudio.

Símbolo	Nombre del gen	Especie	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	T _m
actina	actina	Ratón	5'-TACAGCTTCAC CACCACAGC-3'	5'-AAGGAAGGCTG GAAAAGAGC-3'	57,6°C
DMT1	Transportador de metales divalentes 1	Ratón	5'-TGATCCTGACC CGGTCTATC-3'	5'-CAATCCTCCAG CCTATTCCA-3'	57,6°C
FPN1	Ferroportina 1	Ratón	5'-TCGGTTCCTCT CACTCCTGT-3'	5'-GTGGAGAGAGA GTGGCCAAG-3'	57,6°C
Hepc	hepcidina	Ratón	5'-AGAAAGCAGG GCAGACATTG-3'	5'-GGGGAGGGCAG GAATAAATA-3'	60°C

El programa utilizado fue el siguiente: 3 minutos a 94°C, ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a T_m y 30 segundos a 72°C, seguido por una amplificación final de 15 minutos a 72°C. Los amplificados obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y las bandas obtenidas fueron cuantificadas usando el programa ImageJ.

Preparación de extractos celulares. Una vez aplicado a las células el tratamiento respectivo, se preparó un extracto estándar de proteínas mediante la incubación de las células con amortiguador de lisis RIPA, pH 7,5: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, deoxicolato de sodio 0,5% y PMSF 1 mM (fenilmetilsulfonil fluoruro, Sigma-Aldrich). El amortiguador se suplementó con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Complete®, Mini EDTA-free, Roche). Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm (14.160 RCF) durante 15 minutos. El sobrenadante se usó para la determinación de la concentración de proteínas.

Determinación de la concentración de proteínas. Para la determinación de la concentración de proteínas en los extractos celulares se ocupó el método del BCA (Bicinchoninic Acid™, Pierce, ThermoScientific), una derivación del método Lowry para determinar concentración de proteínas, que genera un complejo coloreado con Cu^{+2} . Como estándar se ocupó una solución stock de BSA (albúmina de suero bovino disuelta en dH_2O) a una concentración de 1 mg/ml. El método desarrolla un color que varía desde el verde hacia el morado y se determinó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Sunrise™ (Tecan). Para cada determinación de la concentración de proteínas se construyó una curva de calibración con cantidades conocidas de BSA y se determinó la concentración de proteínas de las muestras a partir de dicha curva de calibración.

Geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes. Los geles se prepararon utilizando el sistema Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Se cargó un carril con un estándar de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein (Fermentas). Para determinar el efecto de LPS, IL-6 y hepcidina sobre DMT1 y FPN1 se cargaron 30 µg por carril. Para la corrida del gel se usó un amortiguador preparado fresco con Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Los geles se corrieron a 80 V durante 30 minutos hasta que la carga pasó al gel separador. Posteriormente se subió el voltaje a 120 V y se continuó corriendo durante 90 minutos hasta que el frente salió del gel. El tiempo total de corrida fue de 2 horas.

Para la transferencia se utilizó el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN®, Whatman®, PerkinElmer™) utilizando un amortiguador de transferencia con Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% y SDS 0,01%, el que se preparó fresco y se enfrió previamente en hielo. La transferencia se montó y se efectuó a 4°C y a 300 mA, corriente constante durante 90 minutos.

Inmunodetección. Terminada la transferencia se comprobó el éxito de ésta tificando la membrana con rojo Ponceau. Esta tinción es reversible y no afectó la inmunodetección. Se incubó durante unos minutos y se lavó con dH₂O, se destiñó completamente con TBS-T20, pH 7,5: Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween20 0,1%.

Para la inmunodetección de DMT1 se usó el siguiente protocolo: bloqueo en leche descremada al 5% preparada en TBS-T20. El bloqueo se efectuó durante la noche a 4°C. Posteriormente se lavó una vez con TBS-T20 y se incubó con el anticuerpo primario,

consistente en una solución de leche al 1% en TBS-T20 usando el anticuerpo DMT1 a una concentración de 1:1.000. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con 30 ml de TBS-T20 durante 15 minutos cada vez. Luego se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario, consistente en una solución de leche al 1% en TBS-T20 usando el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo a una concentración de 1:10.000. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con 30 ml de TBS-T20 durante 15 minutos cada vez y se revelaron las membranas usando el kit SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, ThermoScientific).

Para la inmunodetección de FPN1 se usó un protocolo similar, excepto que se cambió la leche descremada por BSA. La concentración de anticuerpo anti-FPN1 fue de 1:1000. Para este anticuerpo se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo a una concentración de 1:5.000. La actina se detectó usando leche descremada como agente bloqueador a una concentración del anticuerpo de 1:10.000; el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón se utilizó 1:10.000. Para el anticuerpo anti HNE se ocupó BSA como agente bloqueador y el anticuerpo se usó 1:1000. El secundario anti-IgG de ratón se ocupó 1:5000.

Stripping de las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron dos veces con amortiguador glicina 200 mM pH 2,2, durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS dos veces durante 10 minutos y finalmente en TBS-T20 dos veces durante 5 minutos.

Determinación de la producción de ROS intracelulares inducida por hierro. Se utilizó la sonda DCDHF-DA, para determinar la producción de ROS (Núñez y cols. 2004). En estos experimentos, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 24 pocillos y cultivadas en MEM-F12 10 % SFB durante 4 días. El día del experimento las células fueron pre-incubadas durante 1 hora con 50 μ M Q1, MT1 o DMSO como control del vehículo en MEM-F12 0,5% SFB. Previo a la carga del fluoróforo se lavaron 3 veces con DMEM sin suero y sin rojo fenol (Sigma-Aldrich). La carga del fluoróforo se realizó en DMEM sin suero y sin rojo fenol. La concentración y el tiempo de carga fue el siguiente: 10 μ M durante 10 minutos. La solución con el fluoróforo y la placa con las células durante y tras la carga fueron mantenidas en la oscuridad. Después de la carga, las células fueron lavadas dos veces con DMEM sin suero y sin rojo fenol y una vez con amortiguador fisiológico HBSS, pH 7,4: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, HEPES 25 mM y glucosa 5 mM. Para el registro de fluorescencia las células fueron incubadas en HBSS, 300 μ l por pocillo, y se les permitió a las células un tiempo de recuperación de 5 minutos a 37°C en el incubador, previo a la obtención de los registros. Para los lavados e incubaciones se usaron soluciones precalentadas a 37°C y los registros fueron obtenidos también a 37°C, en un lector de fluorescencia Synergy 2™ (BioTek), usando las longitudes de onda de excitación y emisión, Ex/Em, 485/528. Para la obtención de los registros se midió la fluorescencia durante 5 minutos para obtener la línea base, tras lo cual se ofreció a las células 20 μ M de FAS. Para la presentación de los datos, se dividió cada dato de fluorescencia obtenido (F) por la fluorescencia inicial registrada (F₀), obteniéndose para cada punto en el tiempo un valor de F/F₀.

Daño oxidativo. La estimación de este parámetro se realizó mediante *Western blot* para 4-OH-2-Nonenal (HNE) como descrito en (Núñez y cols. 2001). El método consiste en la estimación de modificaciones oxidativas deletéreas de proteínas inducidas por agentes oxidantes (Núñez y cols. 2001). En la realización del *Western blot*, se cargaron 40 µg de proteínas por carril. En los experimentos de co-incubación de LPS o IL-6 se usaron los quelantes Q1 y MT1 a una concentración de 1 µM, durante 24 horas.

Programas utilizados. Para realizar la construcción de todos los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Para realizar las densitometrías se ocupó el programa ImageJ.

Análisis estadístico. Se realizó mediante el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.). Para evaluar si las diferencias entre los promedios de la condición control versus tratamiento (LPS, IL-6 o hepcidina), eran significativas se realizó un test t de Student no pareado. En los experimentos que se compararon los promedios de 3 o más condiciones (expresión de 4-HNE y viabilidad en células BV2 sometidas a LPS y co-incubadas con Q1 o MT1), se realizó un test ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía. Fueron considerados significativos valores de p (**p-values**) menores a 0,05.

RESULTADOS

1. Establecimiento de los cultivos celulares y estandarización del RT-PCR. Estudios sobre concentración y actividad de los estímulos inflamatorios y hepcidina. Validación de anticuerpo para DMT1

1.1 Líneas celulares de neuronas (N2A), astrocitos (C8D1A) y microglías (BV2)

Al inicio de esta tesis se establecieron los protocolos para el mantenimiento de los cultivos de líneas celulares para neuronas (N2A), astrocitos (C8D1A) y microglías (BV2) (Figura 1). Se encontraron las condiciones óptimas para lograr una diferenciación adecuada de las células de neuroblastoma (N2A) hacia un fenotipo neuronal, mediante la disminución de la concentración de suero fetal desde 10% a 1% y la adición de un análogo estable de cAMP (dbcAMP) (Muñoz y cols. 2003). Este método combinado permite a las células N2A diferenciadas expresar un fenotipo dopaminérgico caracterizado por expresar tirosina hidroxilasa (TH) y secretar dopamina (Tremblay y cols. 2010). La línea celular C8D1A es una población heterogénea con características morfológicas de astrocitos fibrosos principalmente. Pueden ser consideradas las contrapartes *in vitro* de astrocitos fibrosos (tipo I), pero también pueden encontrarse, aunque en menor porcentaje astrocitos velamentosos (tipo III) y células epiteliales Golgi (tipo II) (Alliot y Pessac 1984). Finalmente la línea celular BV2 es una población bastante homogénea que ha sido ampliamente usada como un sustituto válido de los cultivos primarios de microglías (Henn y cols. 2009).

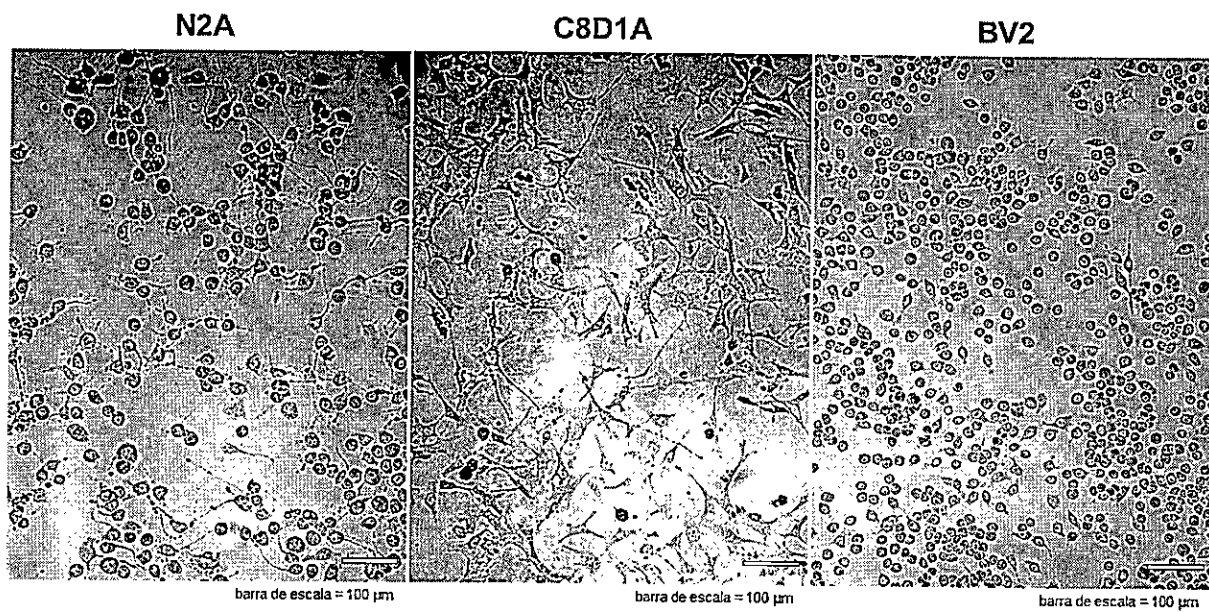


Figura 1. Líneas celulares utilizadas. Imágenes representativas de un cultivo de células N2A diferenciadas (neuronas), C8D1A (astrocitos) y BV2 (microglías), obtenidas mediante un microscopio compuesto de campo claro. Las células N2A diferenciadas expresan un fenotipo dopaminérgico caracterizada por expresión de la enzima tiroxina hidroxilasa y la secreción de dopamina. Magnificación 100X.

1.2 Determinación del número de ciclos para verificar el rango lineal de amplificación del RT-PCR

Para verificar que en los experimentos que evaluamos abundancia del mRNA para DMT1, FPN1, hepcidina y actina la densidad de banda determinada era función del número inicial de copias del cDNA, diseñamos experimentos para evaluar que los productos de PCR se encontraran en el rango lineal de amplificación. En la Figura 2A se muestra como varía el amplificado para DMT1, FPN1 y actina al variar los ciclos, fijando la T_m en 57,6°C (como había sido previamente establecido en el laboratorio), utilizando cDNA de células C8D1A en condiciones control. Resultados similares fueron obtenidos para las otras 2 líneas celulares. En las Figuras 2B y 2C se muestra como varía el amplificado para hepcidina en condiciones control para las tres líneas celulares. Se aprecia cómo la T_m máxima es 60°C, pues temperaturas mayores no producen ningún amplificado. Además se aprecia que las 3 líneas celulares expresan hepcidina. Notablemente las células que más expresan hepcidina son las C8D1A, seguidas de las células N2A y finalmente las BV2, las cuales comparativamente expresan mucho menos hepcidina en condiciones control.

El número de ciclos escogido para cada producto de PCR, la T_m correspondiente y el tamaño exacto de cada uno de ellos se muestra en la Tabla 2.

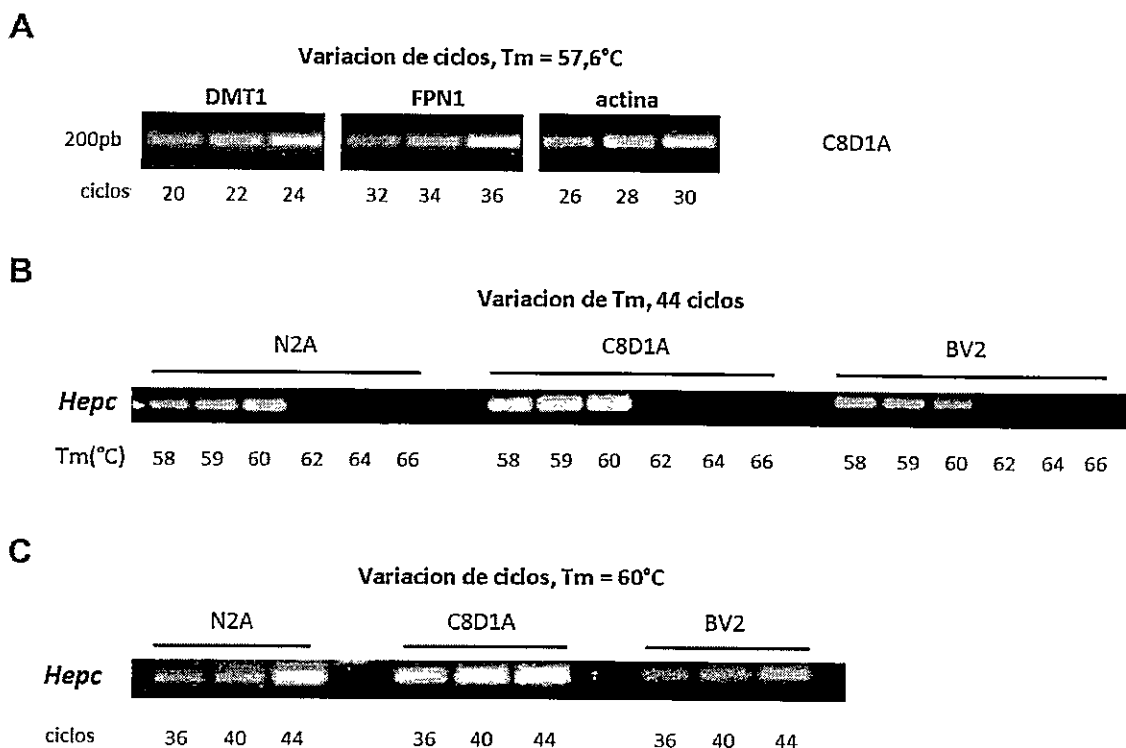


Figura 2. Estandarización del número de ciclos y T_m para los RNA mensajeros de DMT1, FPN1, hepcidina y actina. En (A) se muestra como varían los amplificadores para DMT1, FPN1 y actina aumentando el número de ciclos y fijando la T_m en $57,6^\circ\text{C}$, utilizando cDNA de células C8D1A en condiciones control sin tratamiento. En (B) se muestra como varía el amplificado para hepcidina en las tres líneas celulares en condiciones control sin tratamiento, aumentando la T_m y fijando el número de ciclos en 44. En (C) se muestra como varía el amplificado de hepcidina en las tres líneas celulares variando el número de ciclos y fijando la T_m en 60°C .

Tabla 2. Condiciones de los PCR realizados.

Símbolo	Tamaño amplificado	ciclos	T_m
actina	206pb	26	$57,6^\circ\text{C}$
DMT1	201pb	23	$57,6^\circ\text{C}$
FPN1	198pb	34	$57,6^\circ\text{C}$
Hepc	198pb	40	60°C

1.3 Efecto del LPS e IL-6 sobre la viabilidad celular

Para evaluar cómo los estímulos inflamatorios afectaban la viabilidad de las tres líneas celulares, se hicieron tratamientos con un amplio rango de concentraciones de IL-6 y LPS durante 24 horas y se estimó la viabilidad mediante el ensayo MTT (Figura 3). El análisis estadístico de los datos indicó que las diferencias no fueron significativas para el caso de las células N2A ni para las células C8D1A tratadas con LPS o IL-6 (Figura 3A y 3B). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas para las células BV2 tratadas con IL-6 (Figura 3C).

Sin embargo, pudimos observar que 2 $\mu\text{g/ml}$ de LPS disminuyó la viabilidad de las células BV2 alrededor de 25-30%. Este efecto es concentración dependiente disminuyendo significativamente la viabilidad a partir de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Figura 3C).

En los experimentos posteriores donde evaluamos el efecto de estos estímulos inflamatorios utilizamos para las 3 líneas celulares: LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ e IL-6 50 ng/ml durante 24 horas, teniendo como referencia el trabajo de (Urrutia y cols. 2013). En estos experimentos siempre consideramos que el LPS afecta cerca del 25% de viabilidad específicamente en la línea celular BV2.

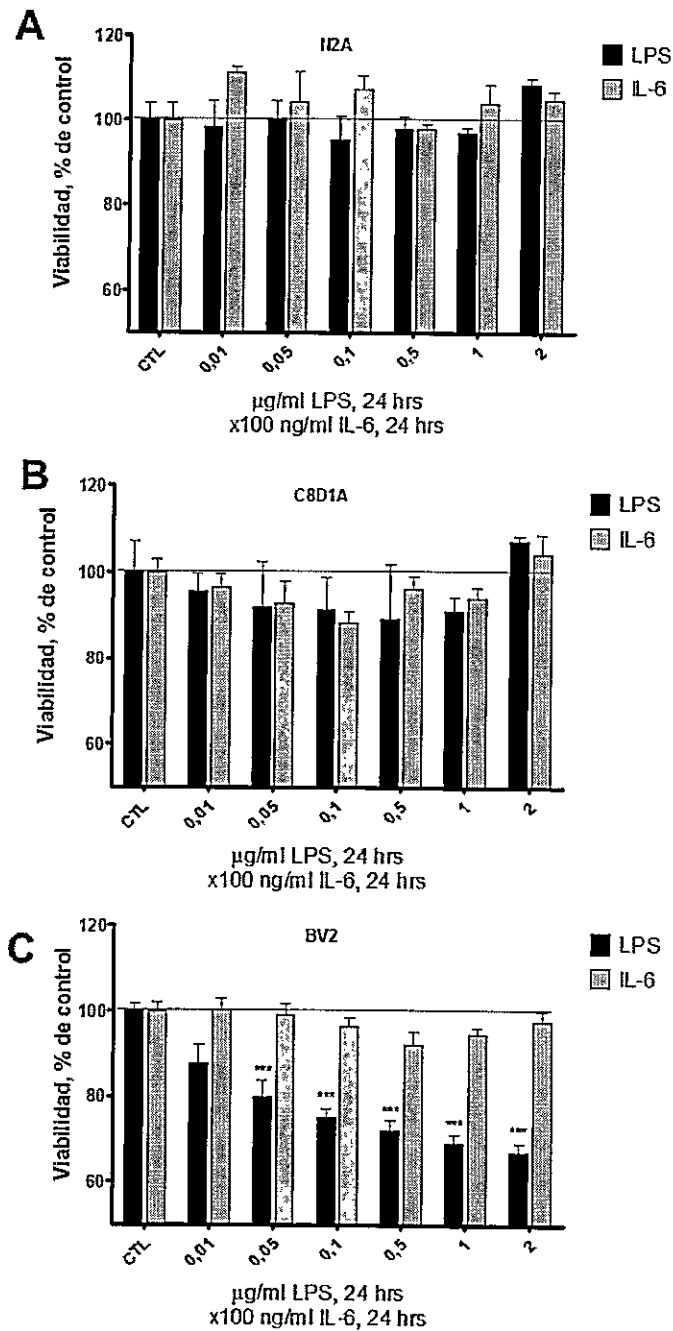


Figura 3. Efecto de LPS e IL-6 sobre la viabilidad de las líneas celulares. Ensayos de viabilidad MTT para las células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) sometidas a concentraciones crecientes de LPS e IL-6 durante 24 horas. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n= 3). ***p < 0,001. Test ANOVA de una vía.

1.4 Efecto de hepcidina sobre FPN1 en células J774

Como control positivo de respuesta a hepcidina, probamos su efecto sobre células J774 (una línea celular de macrófagos) durante 2 y 4 horas. Efectivamente y tal como había sido reportado previamente en esta línea celular (Knutson y cols. 2005; Mena y cols. 2008), la incubación con 700 nM de hepcidina redujo significativamente los niveles de FPN1. Para los experimentos posteriores en las líneas celulares sobre el efecto de hepcidina, escogimos 700 nM de hepcidina durante 6 horas tomando como referencia el trabajo de (Urrutia y cols. 2013).

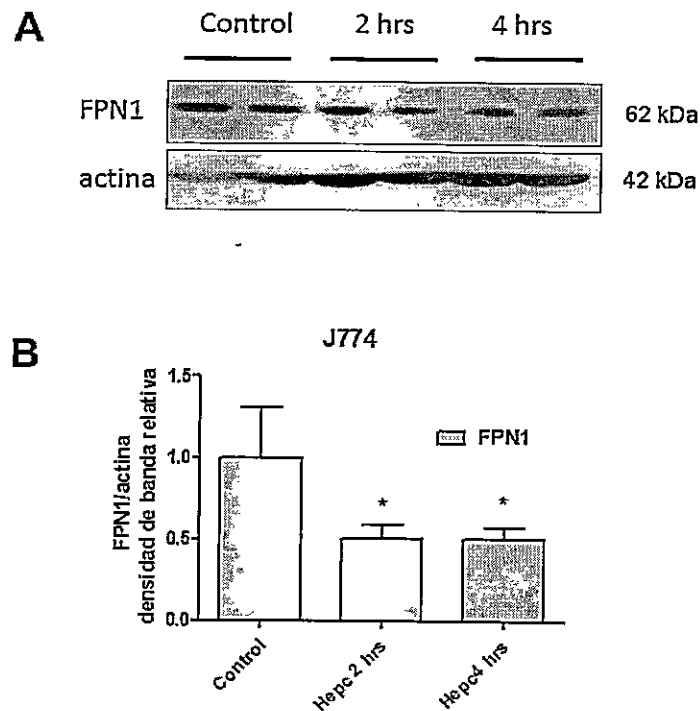


Figura 4. Hepcidina disminuye los niveles proteicos de FPN1 en la línea celular de macrófagos J774. Células J774 fueron tratadas con hepcidina 700 nM durante 2 y 4 horas. El cambio en los niveles de FPN1 fue analizado por *Western blot*. En (A) se muestra un *blot* representativo y en (B) se muestra la cuantificación de la densidad de banda. Los valores representan el promedio \pm SEM ($n=3$). * $P < 0,05$. Test ANOVA de una vía.

1.5 Validación del anticuerpo para DMT1

Como una forma de comprobar que en los experimentos en los que evaluáramos la abundancia proteica de DMT1, la banda cuantificada respondiera al sistema de regulación IRE/IRP, incubamos células BV2 con concentraciones crecientes de hierro como Fe:NTA, durante 24 horas. En la Figura 5 se muestra cómo los niveles de DMT1 disminuyen considerablemente al incubar con 100 μM de hierro, aproximadamente 80%. Esta disminución es probablemente controlada mediante el sistema IRE/IRP (Wallander y cols. 2006).

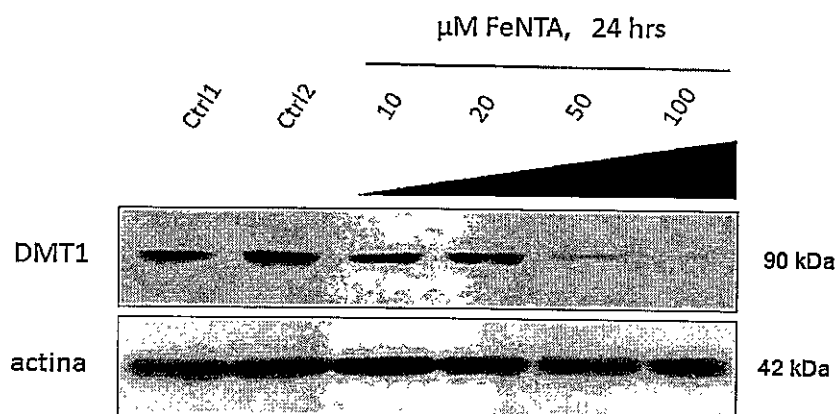


Figura 5. La abundancia proteica de DMT1 responde a la concentración de hierro celular en células BV2. Células BV2 fueron tratadas con concentraciones crecientes de Fe:NTA durante 24 horas. El cambio en los niveles de DMT1 fue analizado mediante *Western blot*.

2. Determinación del o los tipos celulares que ante un estímulo inflamatorio modifican la expresión de los transportadores de hierro y de hepcidina

2.1 Efecto de LPS e IL-6 sobre los niveles de proteína y mRNA de DMT1 y FPN1 en células N2A, C8D1A y BV2

Se analizaron los niveles proteicos de DMT1 y FPN1 en las tres líneas celulares sometidas a tratamiento con LPS (Figura 6) e IL-6 (Figura 7) mediante *Western blot*. El tratamiento con LPS aumentó significativamente los niveles de DMT1 en las tres líneas celulares. De forma similar, IL-6 aumentó los niveles de DMT1 en N2A y C8D1A, pero no en BV2. Con respecto a FPN1, no se observaron cambios en las células N2A y BV2, pero sí en las células de astrocitos C8D1A donde el tratamiento con LPS indujo la disminución significativa de FPN1.

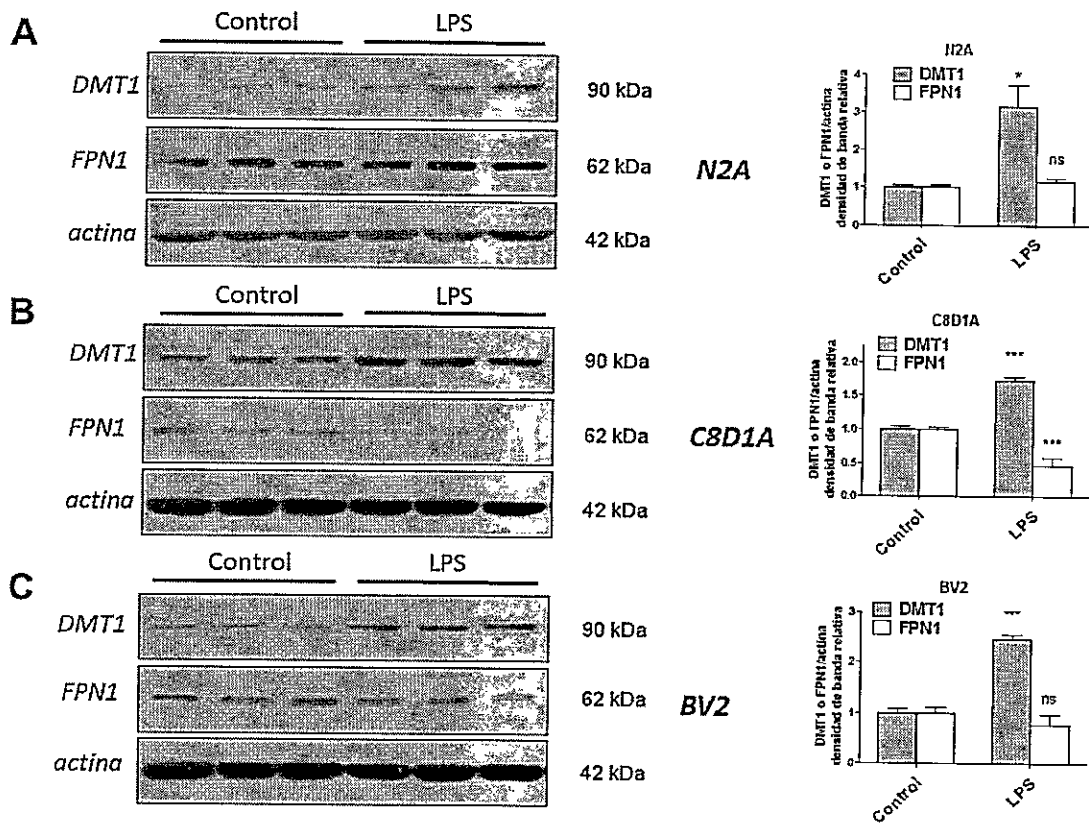


Figura 6. LPS aumenta los niveles proteicos de DMT1 en los tres linajes celulares de manera similar. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. Los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 fueron analizados por *Western blot*. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; ***P< 0,001; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

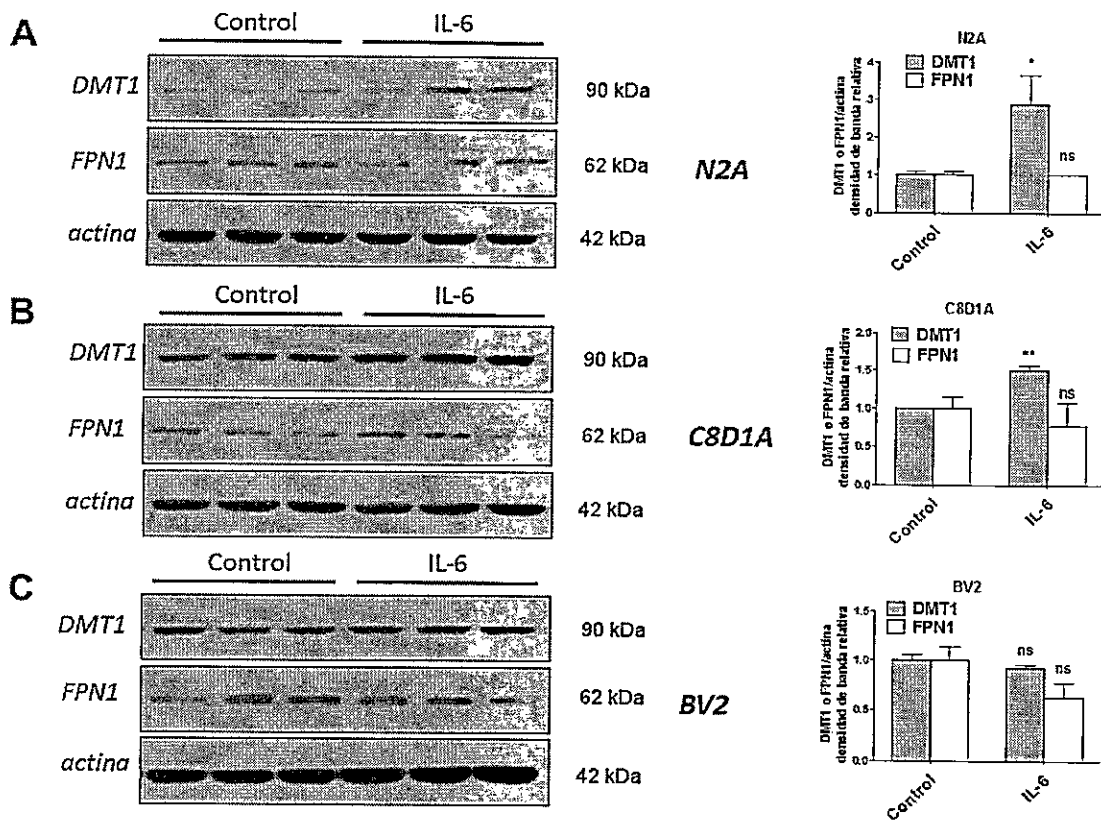


Figura 7. Efecto de IL-6 sobre las proteínas DMT1 y FPN1 en las líneas celulares. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con IL-6 (50 ng/ml) durante 24 horas. Los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 fueron analizados por *Western blot*. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; **P< 0,01; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

Al analizar la abundancia de los mRNAs mediante RT-PCR semi-cuantitativo para ambos transportadores sometidos a tratamiento con LPS (Figura 8), se pudo comprobar que el LPS indujo un aumento en el mRNA de DMT1 en N2A y C8D1A, tal como en el caso de las proteínas. Sin embargo no se detectó variación significativa en el mRNA de DMT1 en células BV2, pese a que observamos una tendencia al aumento (Figura 8C). Con respecto al tratamiento con IL-6 (Figura 9), se pudo observar un aumento en la abundancia del mRNA para DMT1 sólo en el caso de las células C8D1A (Figura 9B).

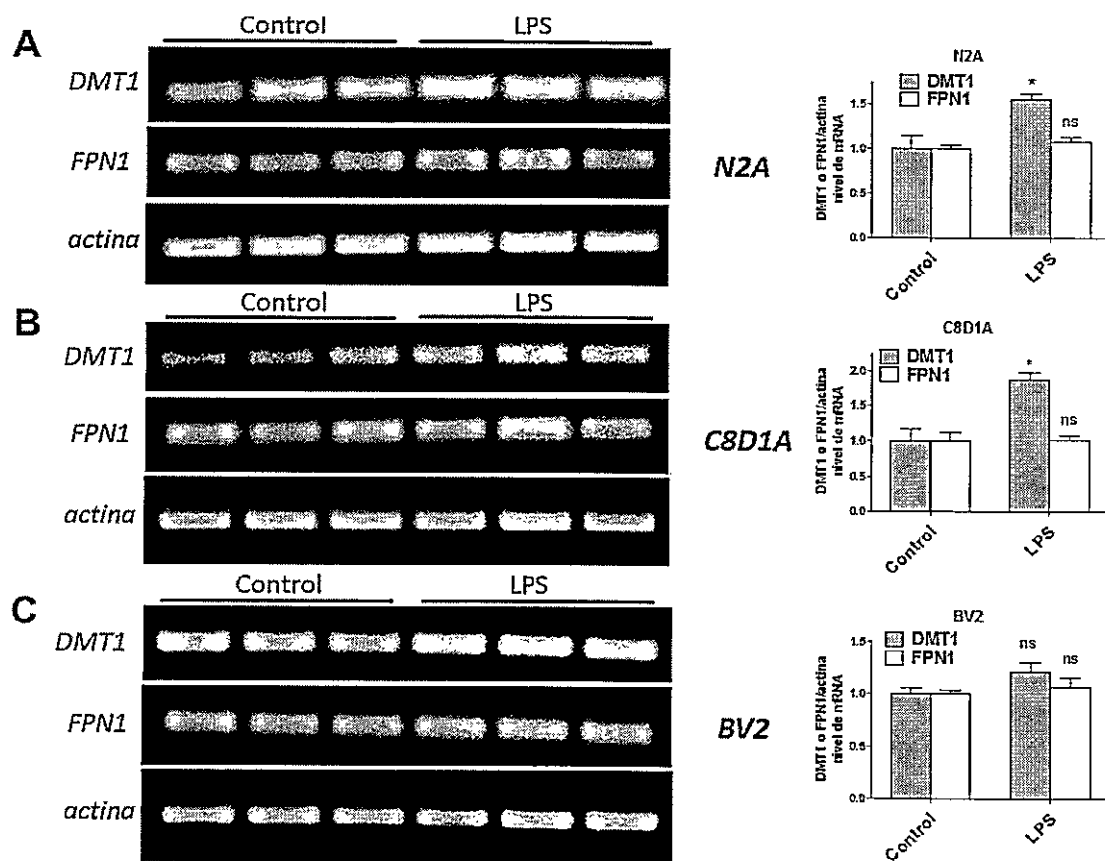


Figura 8. Efecto de LPS sobre el mRNA de DMT1 y FPN1 en las líneas celulares. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. Los cambios en los niveles de mRNA de DMT1 y FPN1 fueron analizados por RT-PCR. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

Con respecto a la abundancia del mRNA de FPN1, éste no varió en los tratamientos con LPS ni tampoco con IL-6.

En términos generales, podemos postular que los estímulos inflamatorios inducen la expresión de DMT1, consistente con un fenotipo de acumulación de hierro y que la tendencia de FPN1 es no variar. El único caso en que se observó cambio en FPN1 fue en las células C8D1A tratadas con LPS, donde se observó una disminución de este transportador (Figura 6B). Esta disminución en los niveles proteicos de FPN1 también es consistente con la expresión de un fenotipo orientado a acumular hierro.

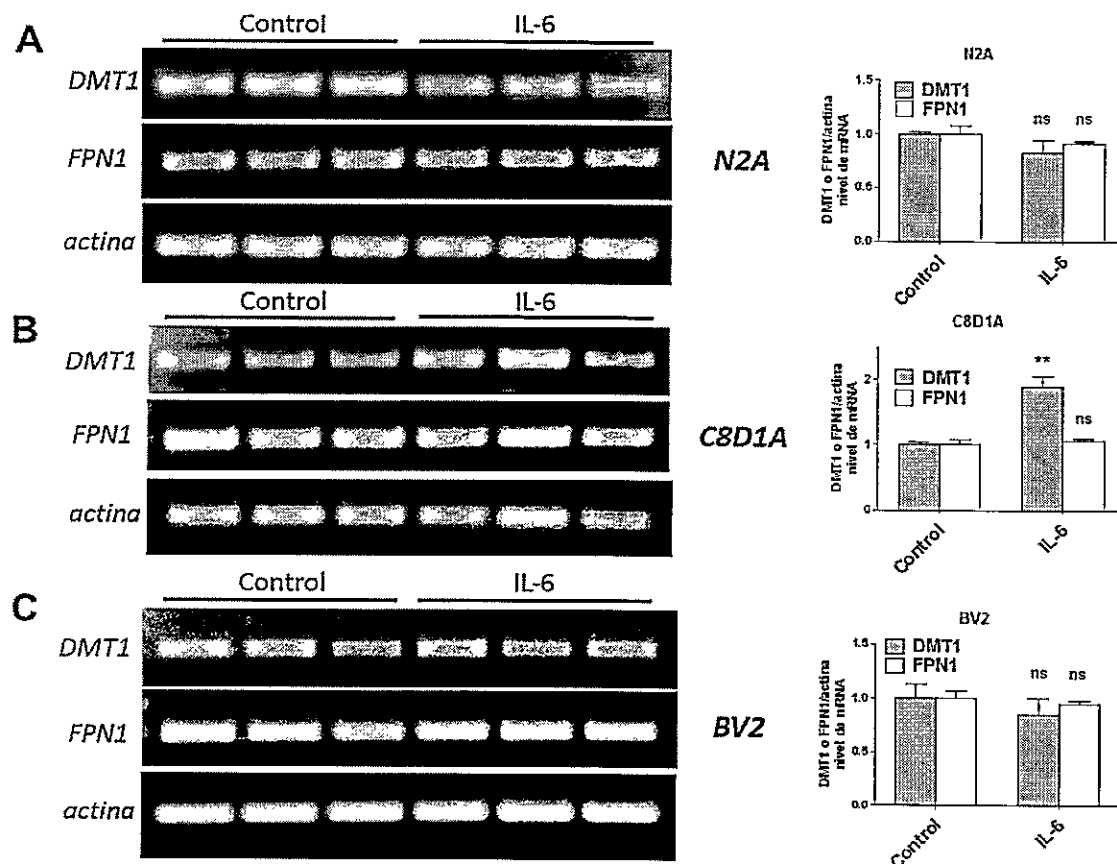


Figura 9. Efecto de IL-6 sobre el mRNA de DMT1 y FPN1 en las líneas celulares. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con IL-6 (50 ng/ml) durante 24 horas. Los cambios en los niveles de mRNA de DMT1 y FPN1 fueron analizados por RT-PCR. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). **P< 0,01; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

2.2 Efecto de LPS e IL-6 sobre la expresión de hepcidina en células N2A, C8D1A y BV2

Como se mostró en la Figura 2, las tres líneas celulares expresan hepcidina. Cuando analizamos el efecto del LPS (Figura 10), pudimos comprobar que la tendencia general de las 3 líneas celulares fue aumentar la expresión de hepcidina, pese a que este aumento sólo es significativo en el caso de las células BV2 (Figura 10C). Con respecto al tratamiento con IL-6 (Figura 11), se obtuvo un aumento significativo en la expresión de hepcidina en células C8D1A y BV2, no así en N2A.

Analizando estos resultados, podemos sugerir que las tres líneas celulares pueden expresar hepcidina contrastando con lo que sucede en cultivo primario donde las neuronas de hipocampo no expresan hepcidina, a diferencia de los cultivos primarios de astrocitos y microglías (Urrutia y cols. 2013). En nuestro sistema, pese a que las células neuronales N2A expresan hepcidina, al parecer esta expresión no es inducible por ninguno de los dos estímulos inflamatorios.

En el tratamiento con LPS se puede apreciar un efecto reportado en cultivos primarios de microglías (Urrutia y cols. 2013), es decir, la casi nula expresión de hepcidina en condiciones control, y la fuerte expresión de hepcidina en células activadas con LPS (Figura 10C).

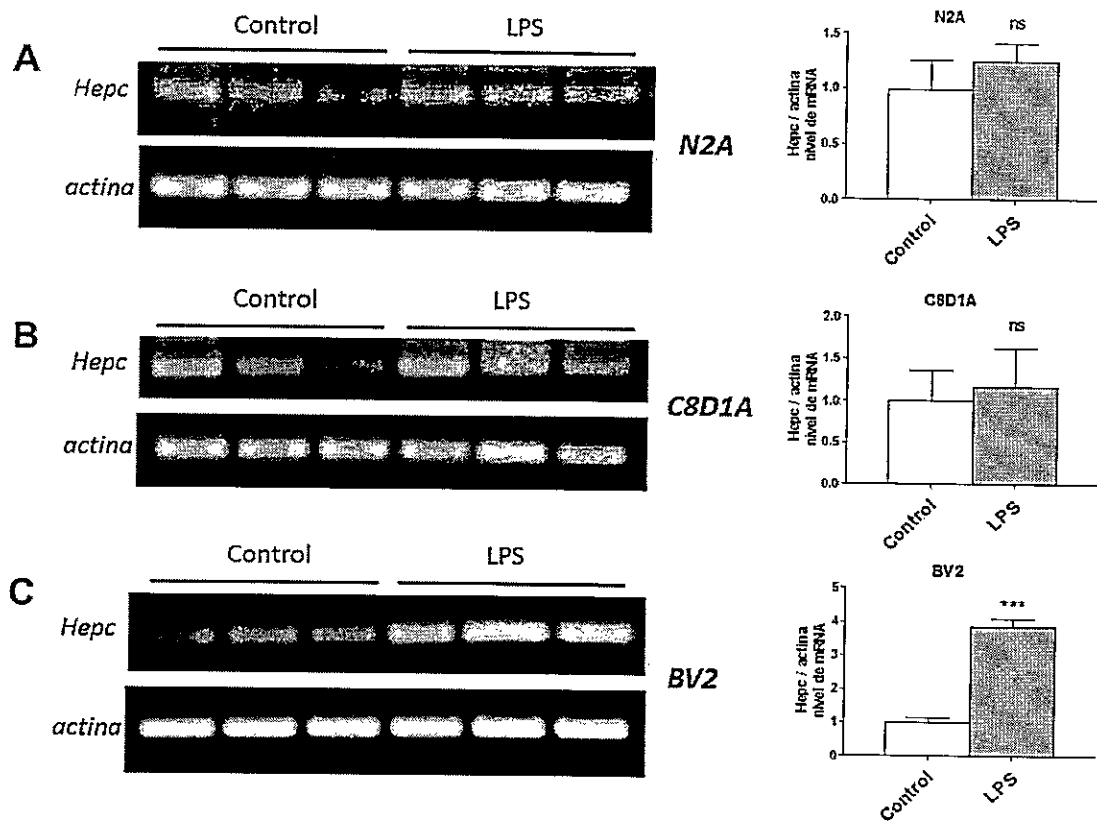


Figura 10. LPS estimula significativamente la producción de hepcidina exclusivamente en células BV2. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. Los cambios en los niveles de mRNA de hepcidina fueron analizados por RT-PCR. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). ***P< 0,001; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

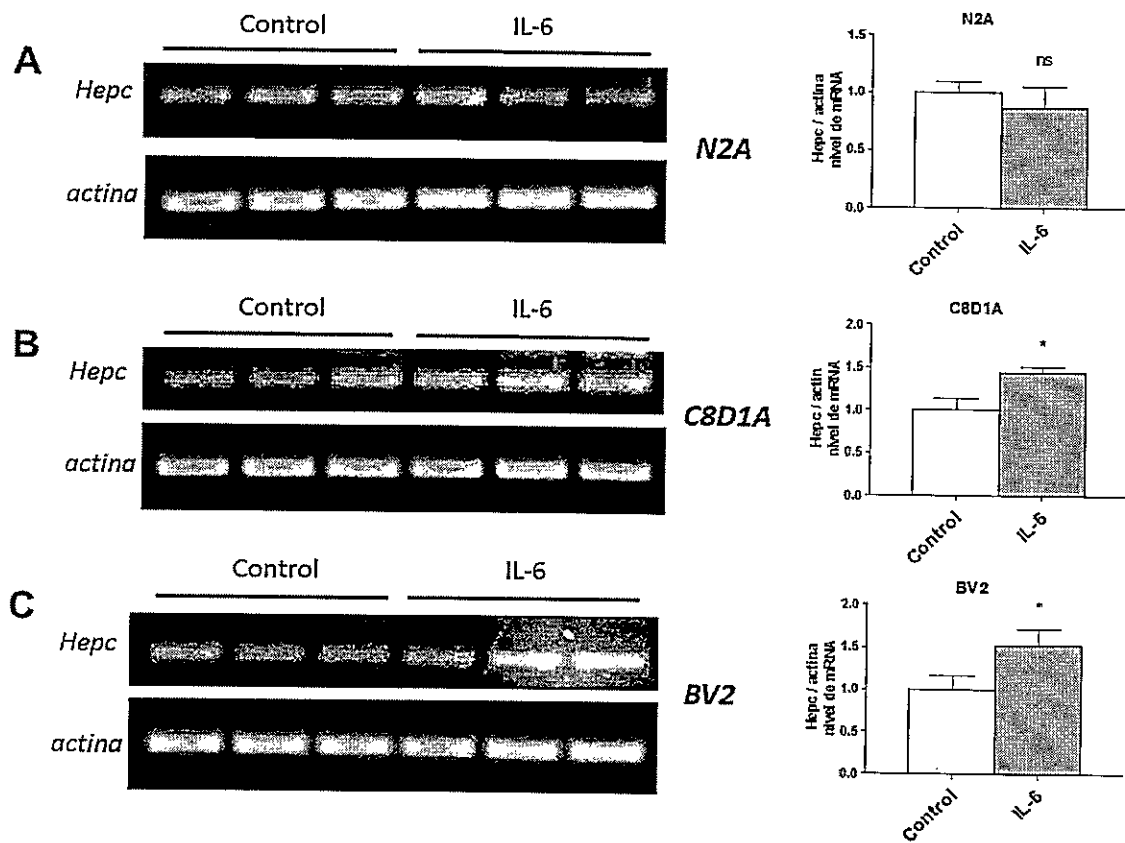


Figura 11. IL-6 estimula la producción de hepcidina en células C8D1A y BV2, pero no en N2A. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con IL-6 (50 ng/ml) durante 24 horas. Los cambios en los niveles de mRNA de hepcidina fueron analizados por RT-PCR. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

2.3 Efecto de hepcidina sobre los niveles de mRNA y proteína de DMT1 y FPN1 en células N2A, C8D1A y BV2

Lo siguiente que evaluamos fue la expresión de DMT1 y FPN1 en las 3 líneas celulares tratadas con hepcidina. En este caso, no pudimos detectar diferencias en la abundancia de los mRNAs. (Figura 12).

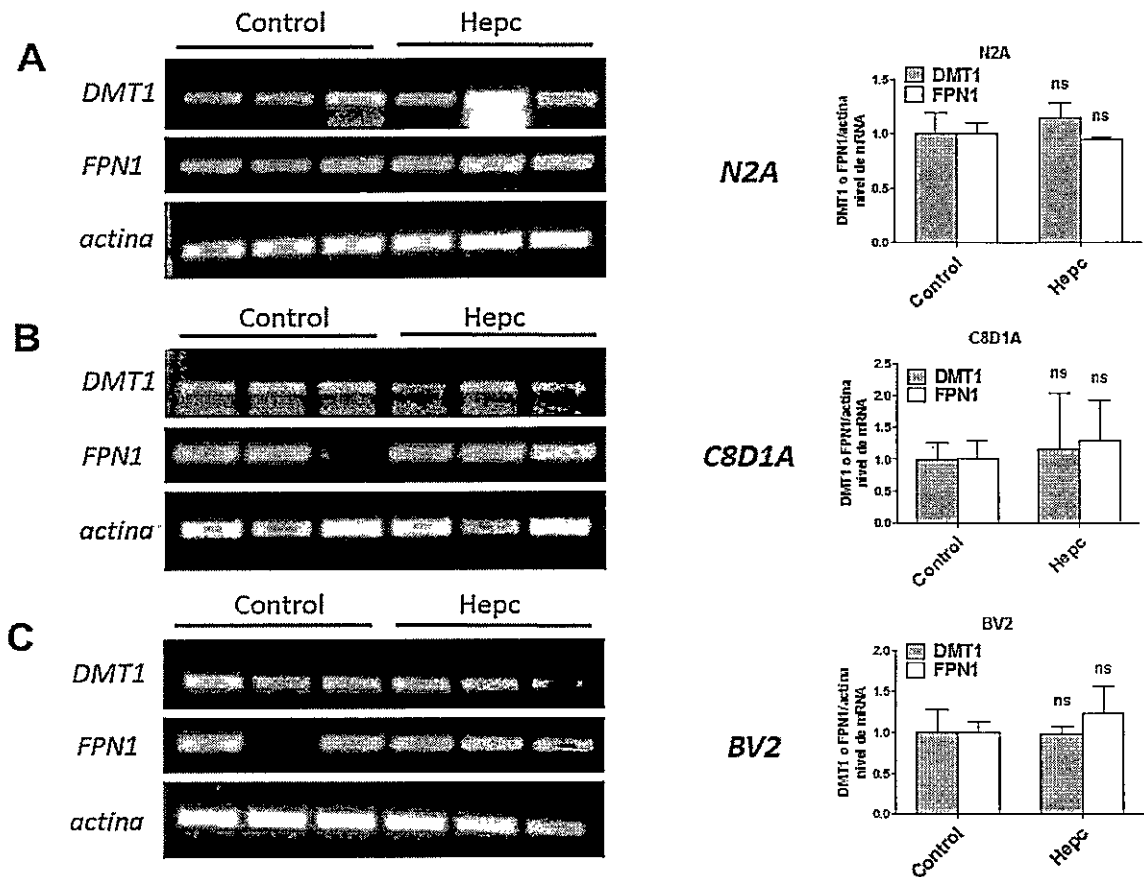


Figura 12. Hepcidina no tiene efecto sobre la abundancia de RNA mensajeros de DMT1 y FPN1. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con hepcidina 700 nM durante 6 horas. Los cambios en los niveles de mRNA de DMT1 y FPN1 fueron analizados por RT-PCR. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). ns: $P > 0,05$. Test t de Student no pareado.

Sin embargo, detectamos diferencias significativas al evaluar la abundancia de proteínas para DMT1 y FPN1 en los tratamientos con hepcidina (Figura 13).

En células N2A detectamos una disminución en la proteína FPN1 inducida por hepcidina, tal como ha sido reportado ampliamente para tejidos periféricos incluidos macrófagos y hepatocitos (De Domenico y cols. 2007; Chaston y cols. 2008). Al igual que en estos sistemas, la disminución de la proteína FPN1 se da en ausencia de cambios en el RNA mensajero, por lo que probablemente corresponde a un mecanismo de endocitosis y degradación lisosomal (De Domenico y cols. 2007). También pudimos observar un aumento de la proteína DMT1 en las células microgliales BV2. Este particular efecto fue reportado también por nuestro laboratorio, en cultivos primarios de microglías (Urrutia y cols. 2013) y aparentemente también se lleva a cabo en ausencia de cambios en el RNA mensajero.

Tanto el aumento en DMT1 como la disminución en FPN1 son fuertes indicadores que esos sistemas celulares tenderán al secuestro intracelular de hierro y demuestra la capacidad de hepcidina para comportarse como un mediador de los estados inflamatorios (Nemeth y cols. 2003).

Observamos que la línea celular C8D1A de astrocitos no respondió al tratamiento con hepcidina modificando la expresión o niveles proteicos de los transportadores DMT1 o FPN1 (Figuras 12B y 13B) aunque se observó una disminución no significativa en los niveles proteicos de FPN1 tras el tratamiento (Figura 13B).

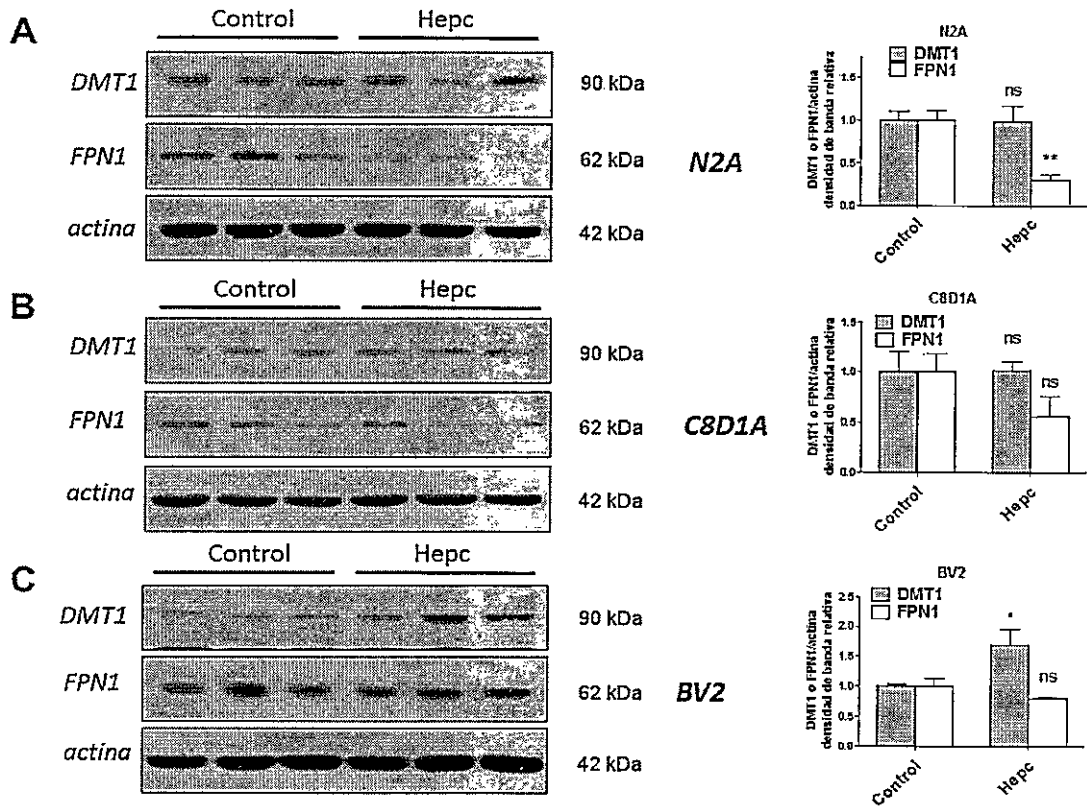
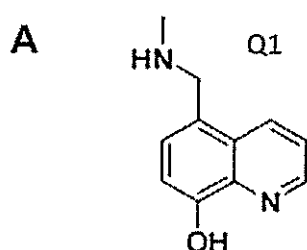


Figura 13. Hepcidina disminuye los niveles proteicos de FPN1 en N2A y aumenta los niveles proteicos de DMT1 en BV2. Células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) fueron tratadas con hepcidina 700 nM durante 6 horas. Los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 fueron analizados por *Western blot*. Los paneles a la derecha muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; **P< 0,01; ns: P> 0,05. Test t de Student no pareado.

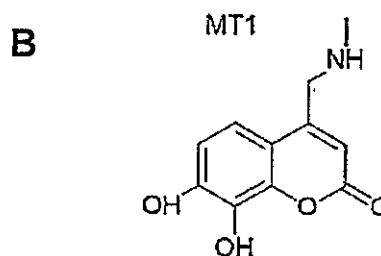
3. Efecto de los quelantes de hierro Q1 y MT1 sobre el daño oxidativo asociado a estímulos inflamatorios

Los quelantes de hierro con base 8-hidroxiquinolina (Q1) (Mena y cols. 2015) y con base 7,8-dihidroxicumarina (MT1) (Figura 14), mostraron promisorios efectos benéficos al neutralizar el daño oxidativo inducido por rotenona en cultivo y por inyección de MPTP *in vivo*. Debido a estos resultados, nos propusimos caracterizar el daño celular asociado a estados inflamatorios en nuestro sistema celular y posteriormente investigar si el tratamiento con estos 2 quelantes podía inhibir el daño celular asociado.



5-metilaminometil-8-hidroxiquinolina

Peso Molecular: 224.7 g/mol



4-metilaminometil-7,8-dihidroxicumarina

Peso Molecular: 221.07 g/mol

Figura 14. Estructuras de los quelantes Q1 y MT1.

3.1 Efecto de Q1 y MT1 sobre la viabilidad de las líneas celulares

Evaluamos cómo se afectaba la viabilidad de nuestros cultivos ante concentraciones crecientes de Q1 y MT1 durante 24 horas en ausencia de tratamiento pro-inflamatorio. Comprobamos que la incubación con 1 μM no afectó la viabilidad de los cultivos celulares, por lo que escogimos esta concentración para los experimentos posteriores. De la misma forma, comprobamos que al parecer MT1 resultó ser más tóxico que Q1 a partir de 10 μM (Figura 15).

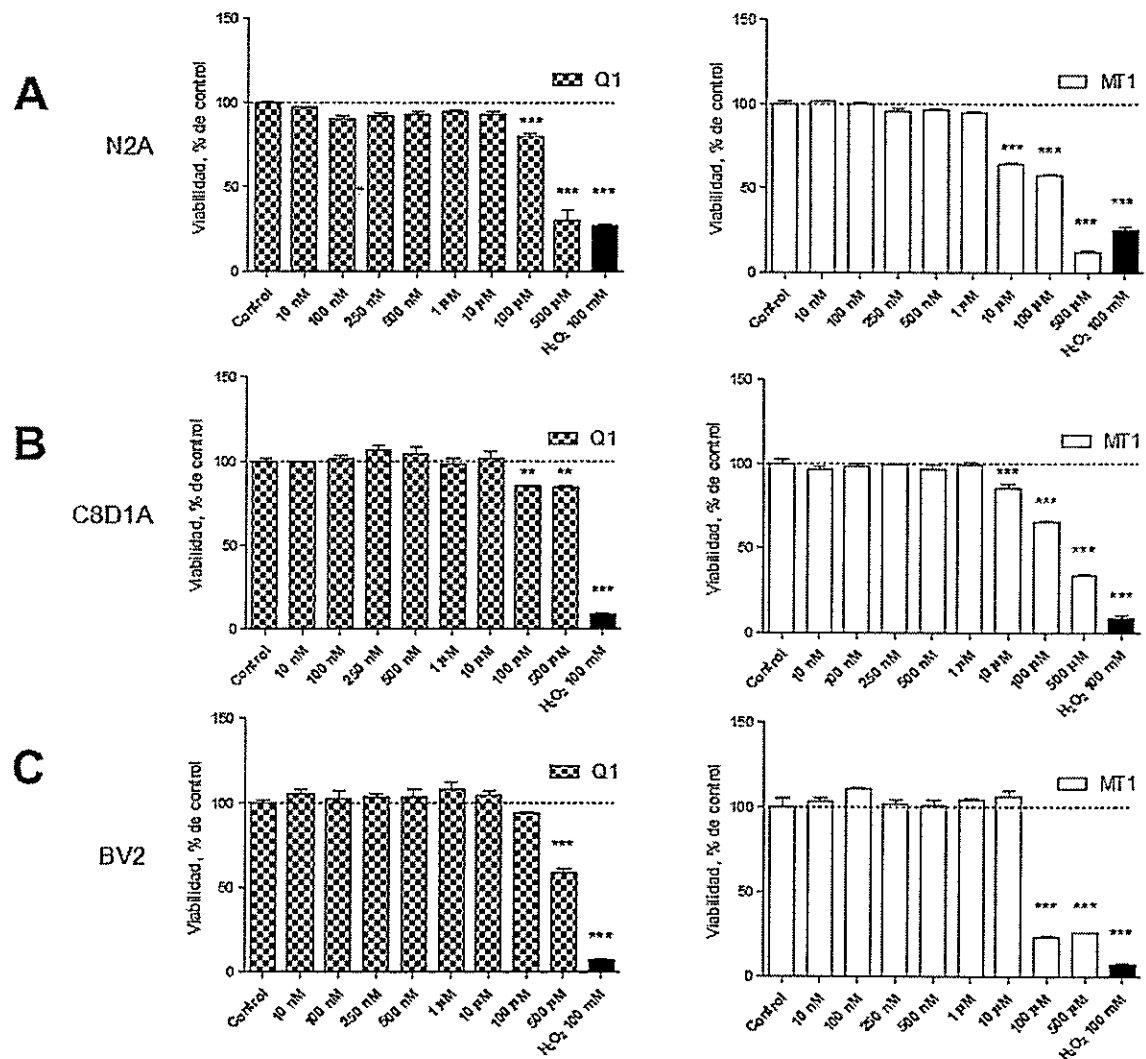


Figura 15. Efecto de Q1 y MT1 sobre la viabilidad de las líneas celulares. Ensayos de viabilidad MTT para las células N2A (A), C8D1A (B) y BV2 (C) sometidas a concentraciones crecientes de Q1 y MT1 durante 24 horas. Como control positivo de muerte se incubaron las células con H₂O₂ 100 mM. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n= 3). **P< 0,01; ***P< 0,001. Test ANOVA de una vía.

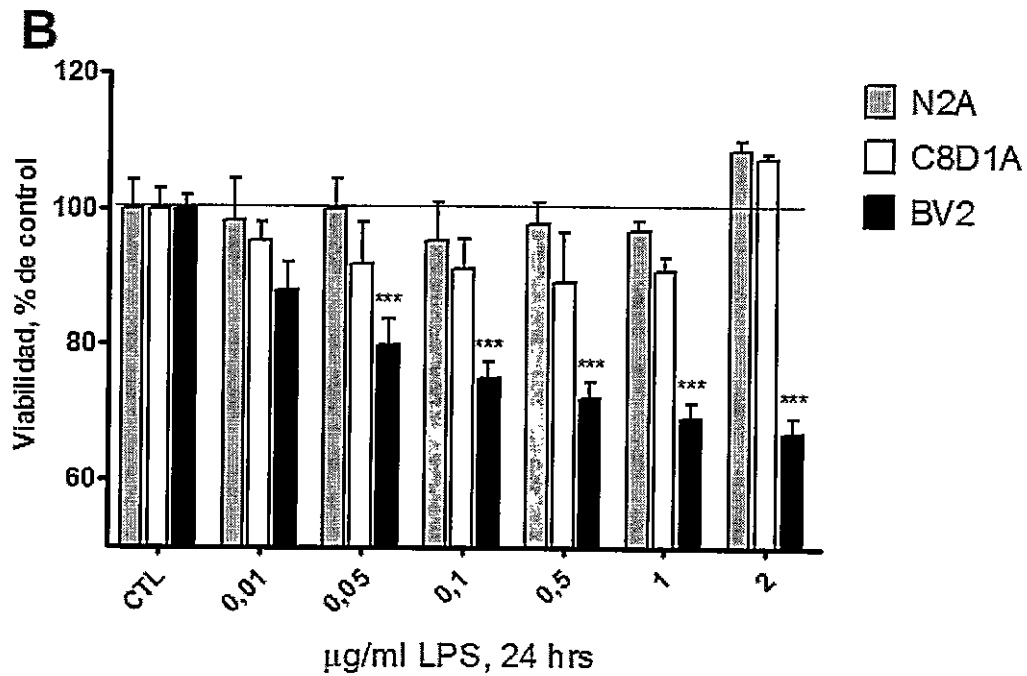
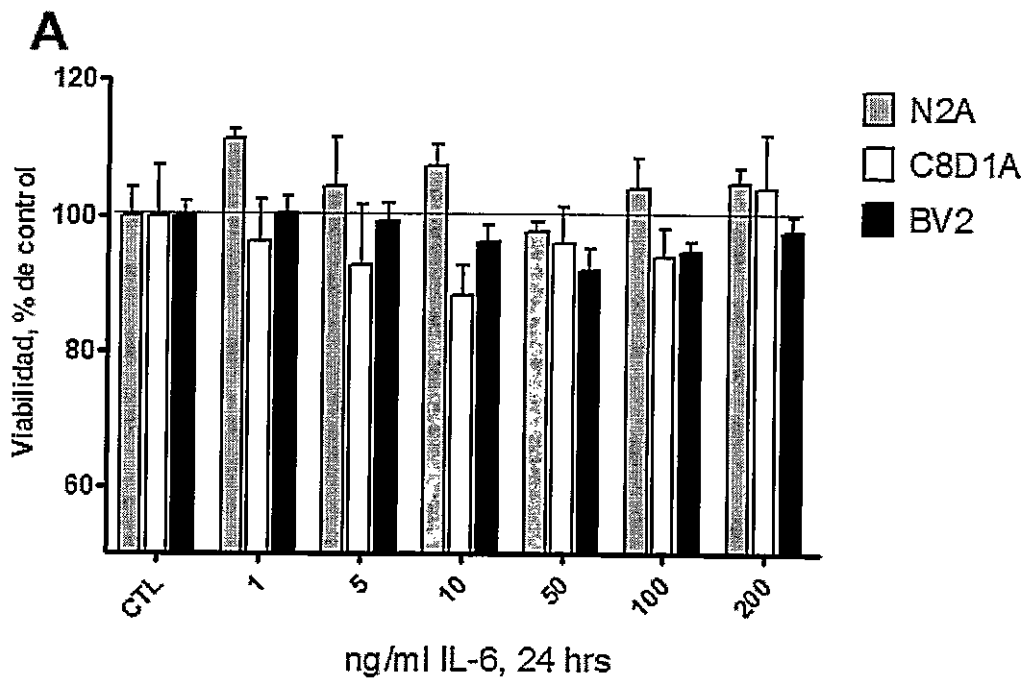


Figura 16. LPS disminuye la viabilidad de células BV2 exclusivamente. Ensayos de viabilidad MTT para las células N2A, C8D1A y BV2 sometidas a concentraciones crecientes de IL-6 (A) y LPS (B) durante 24 horas. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n= 3). ***P< 0,001. Test ANOVA de una vía.

En los experimentos iniciales de esta tesis establecimos claramente que sólo el LPS disminuyó la viabilidad de las células BV2 cerca del 25%. Este efecto no se observó en células N2A ni C8D1A, pese a que se observan pequeñas diferencias, éstas no son significativas (Figura 16B). Por otro lado, la incubación con IL-6 no tuvo efecto significativo en la viabilidad de ninguna de las tres líneas celulares (Figura 16A).

Al evaluar la viabilidad en las células BV2 tratadas con LPS, efectivamente pudimos comprobar cómo la co-incubación de LPS con MT1 protegió de la pérdida de viabilidad (90% del control). Sin embargo, la co-incubación de LPS con Q1 no tuvo efecto en la pérdida de viabilidad (Figura 17).

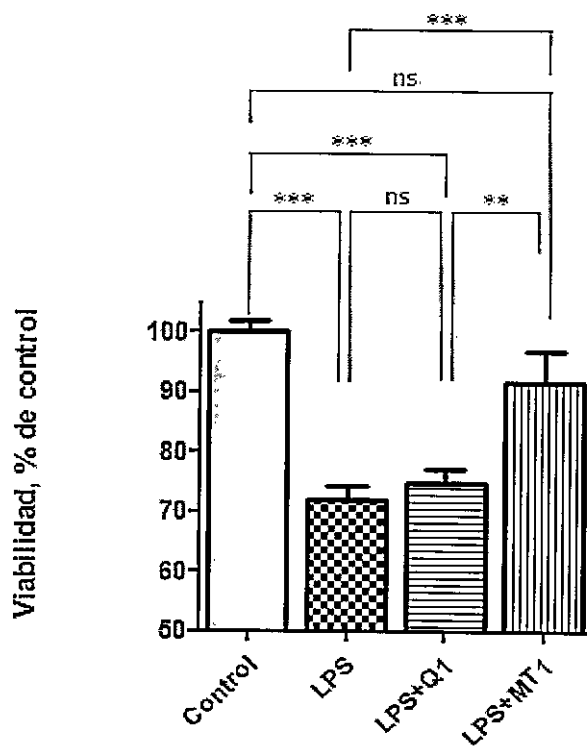


Figura 17. MT1 y no Q1 protege de la pérdida de viabilidad asociada al tratamiento con LPS en BV2. Ensayo de viabilidad MTT para las células BV2. Las células fueron incubadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y co-incubadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y Q1 (1 μM) o LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y MT1 (1 μM) durante 24 horas. Se muestra $n=1$, con 9 réplicas por cada condición. Los valores representan el promedio \pm SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: $P > 0,05$. Test ANOVA de una vía.

3.2 Efecto de Q1 y MT1 sobre la producción de ROS asociada a la entrada de hierro

DCDHF-DA es hidrolizada al interior celular al compuesto no fluorescente DCDHF, el cual emite fluorescencia al ser oxidado por ROS a DCF. Por lo tanto, la fluorescencia emitida por DCF refleja directamente el status oxidativo de una célula.

Utilizando la sonda DCDHF-DA pudimos comprobar que en células SH-SY5Y la pre-incubación durante 1 hora con 50 μ M de Q1 y también MT1 inhibió la producción de ROS inducida por la entrada de hierro (Figura 18).



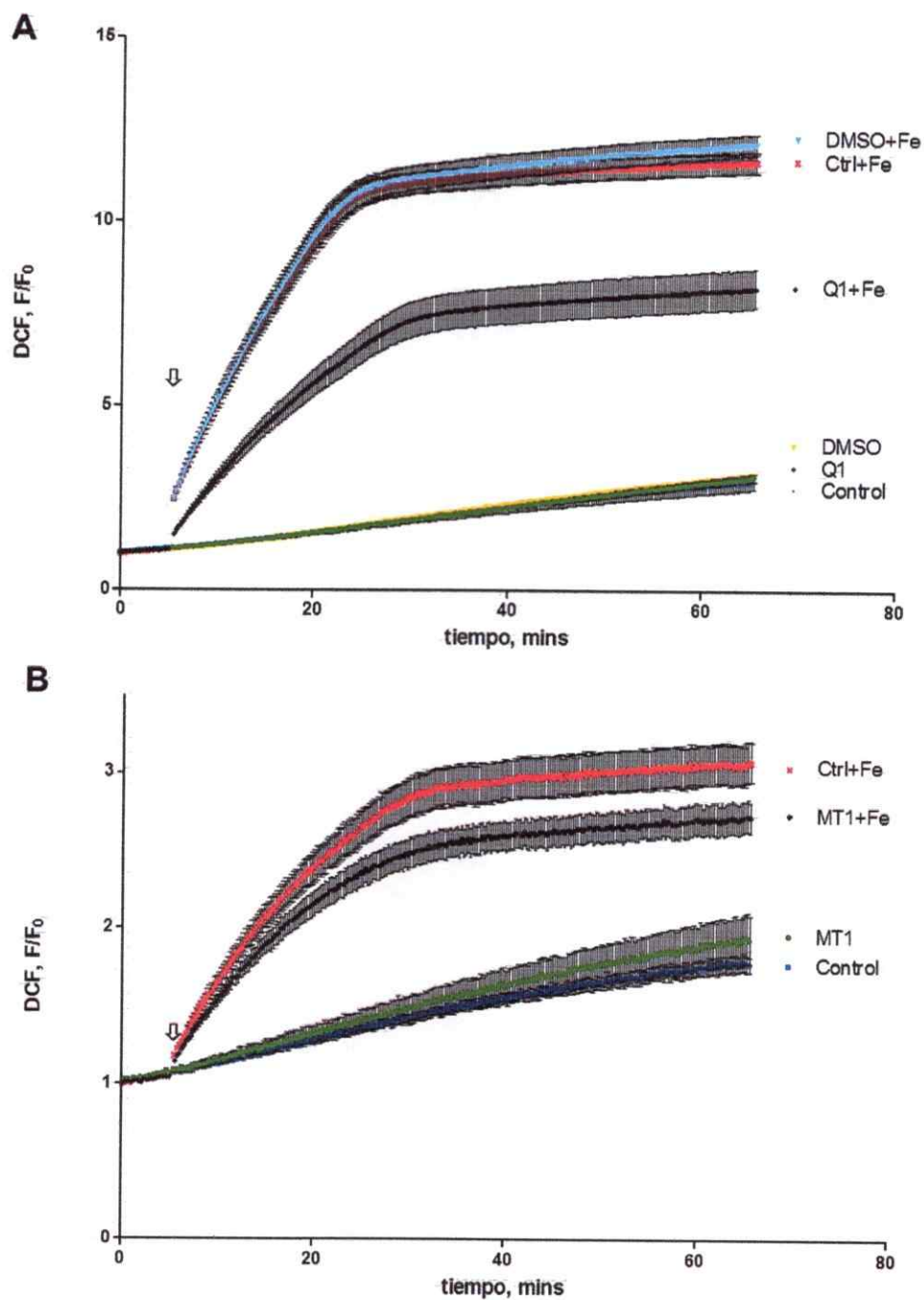


Figura 18. Q1 y MT1 disminuyen la producción de ROS inducida por hierro. Seguimiento de la producción de ROS inducida por hierro, mediante la sonda DCDHFDA tras la aplicación de 20 μM de hierro (flecha). En A se probó el efecto que tiene la pre-incubación durante 1 hora con 50 μM Q1. Como esta quinolina está disuelta en DMSO, se incluyó el control del vehículo. En B se probó la pre-incubación durante 1 hora con 50 μM de la hidroxi-cumarina MT1, que también mostró un potencial para inhibir la producción de ROS asociada a la entrada de hierro. Los valores son el promedio \pm SEM ($n=5$).

3.3 Efecto de Q1 y MT1 sobre el aumento en la peroxidación lipídica inducida por LPS células BV2

El efecto del LPS sobre las células BV2 ya había sido previamente reportado, disminuyendo la viabilidad cerca de un 50% al usar 1 µg/ml LPS durante 24 hrs (Kacimi y cols. 2011). El mecanismo de toxicidad propuesto consiste en la activación de la iNOS y la consiguiente producción de óxido nítrico (NO) (Svensson y cols. 2010). Es esperable que este escenario produzca daño oxidativo. Efectivamente pudimos comprobar un aumento en la formación de aductos de 4-HNE en células BV2 tratadas con LPS (Figura 19, A y B), pero no en las tratadas con IL-6 (Figura 19, C y D) consistente con los experimentos de viabilidad (Figura 16).

Pudimos comprobar además que MT1 co-incubado con LPS inhibió la formación de aductos de HNE, mientras que la co-incubación con Q1 no tuvo efecto. Este resultado también está en concordancia con los experimentos de viabilidad (Figura 17).

Finalmente, la incubación con Q1 y MT1 en ausencia de estímulos inflamatorios no tuvo efecto en los niveles basales de HNE (Figura 19, E y F).

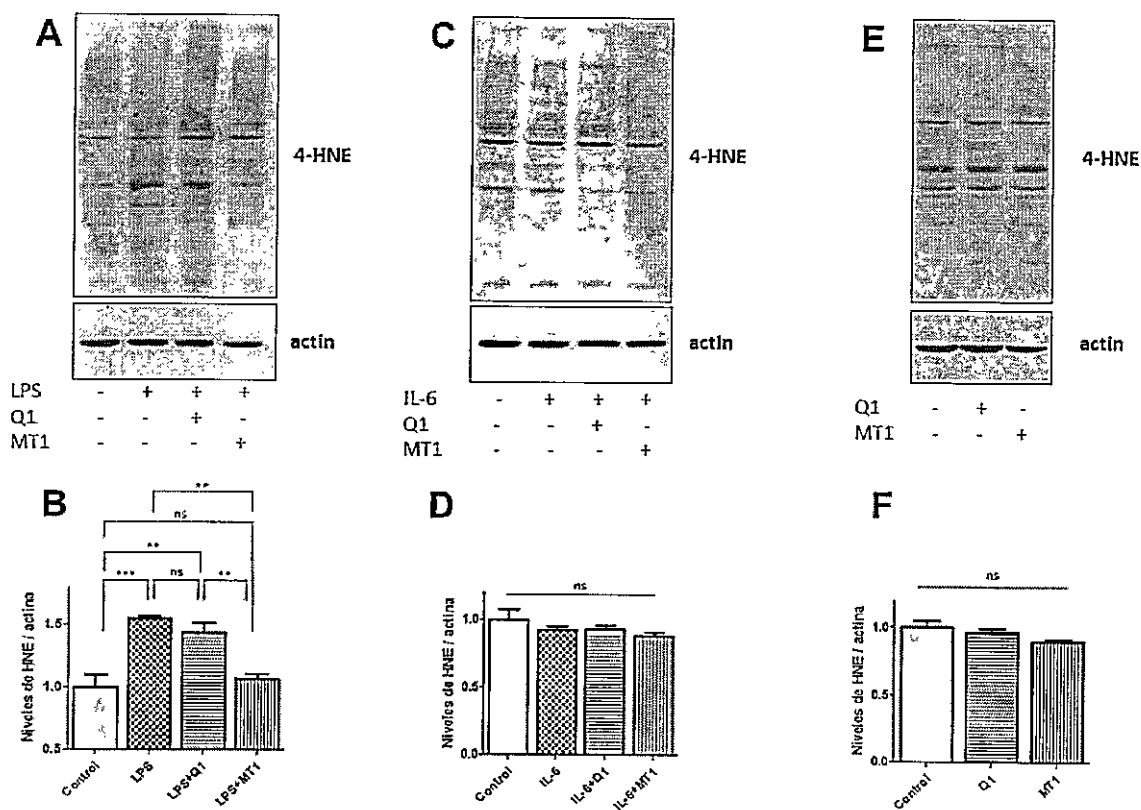


Figura 19. MT1 y no Q1 inhibe la peroxidación lipídica inducida por LPS en células BV2. Células BV2 fueron incubadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y co-incubadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y Q1 (1 μM) o LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y MT1 (1 μM) durante 24 horas (A) y (B). Las células BV2 fueron incubadas con IL-6 (50 ng/ml) y co-incubadas con IL-6 (50 ng/ml) y Q1 (1 μM) o IL-6 (50 ng/ml) y MT1 (1 μM) durante 24 horas (C) y (D). Las células fueron tratadas con Q1 (1 μM) o MT1 (1 μM) durante 24 horas en ausencia de estímulos inflamatorios (E) y (F). Se analizaron los niveles de 4-HNE mediante *Western blot*. (A), (C) y (E) muestran *blots* representativos. En (B), (D) y (F) se muestra la cuantificación de la densidad de bandas a lo largo de todo el carril para cada condición, normalizada con la densidad de banda obtenida para actina. Los valores representan el promedio \pm SEM ($n=4$), con respecto al control. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: $P > 0,05$. Test ANOVA de una vía.

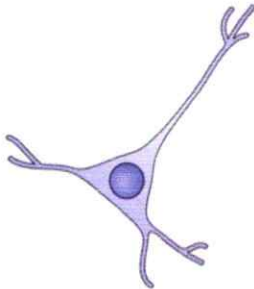
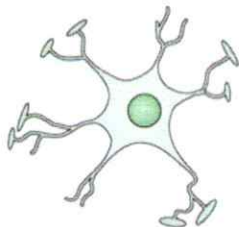
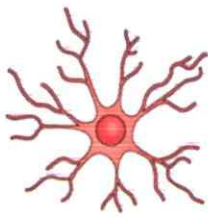
DISCUSIÓN

Efecto de LPS e IL6 sobre DMT1, FPN1 y hepcidina

El tratamiento de las líneas celulares con los estímulos inflamatorios LPS e IL-6 provocó cambios significativos en los transportadores DMT1 y FPN1 además de hepcidina, que corresponden a un fenotipo orientado a la entrada y acumulación de hierro al interior celular. Estos cambios fueron el aumento del transportador de entrada DMT1, la disminución del transportador de salida FPN1 y el aumento en la expresión de hepcidina (Figura 20). En este esquema se muestran los cambios significativos observados en las proteínas DMT1 y FPN1 inducidos por LPS e IL-6, los cuales fueron acompañados en la mayoría de los casos con el mismo cambio en la abundancia de los mRNAs correspondientes.

Tanto el LPS como IL-6 indujeron aumentos significativos en los niveles del transportador de entrada de hierro DMT1, mientras que la tendencia general de FPN1 fue no variar, excepto en el caso de las células C8D1A tratadas con LPS, donde se observó una disminución significativa de los niveles de este transportador.

Una diferencia importante entre el fenotipo inducido por LPS comparado con IL-6 se da en células BV2, donde el LPS aumentó significativamente los niveles proteicos de DMT1, mientras que este aumento no se observó en presencia de IL-6. Esto puede explicar los cambios en la viabilidad y en la expresión de HNE, inducido por LPS pero no por IL-6, como se discutirá más adelante.

	LPS 24 hrs	IL-6 24 hrs	Hepc 6 hrs
N2A	DMT1 ↑ FPN1 n/c Hepc n/c	DMT1 ↑* FPN1 n/c Hepc n/c	DMT1 n/c FPN1 ↓*
C8D1A	DMT1 ↑ FPN1 ↓* Hepc n/c	DMT1 ↑ FPN1 n/c Hepc ↑	DMT1 n/c FPN1 n/c
BV2	DMT1 ↑* FPN1 n/c Hepc ↑	DMT1 n/c FPN1 n/c Hepc ↑	DMT1 ↑* FPN1 n/c

Figura 20. Esquema resumen de los cambios en los niveles de DMT1, FPN1 y en la expresión de hepcidina observados en las líneas celulares, tras los tratamientos con LPS, IL-6 y hepcidina. Se muestran sólo los cambios significativos. Para el caso de DMT1 y FPN1 se incluyen sólo los resultados obtenidos para las proteínas. Con un asterisco se destacan los cambios observados en ausencia de variación del RNA mensajero. N/c significa que no se observaron variaciones.

Por otro lado, es interesante mencionar que NF κ B también ha mostrado activar transcripcionalmente a DMT1 (Paradkar y Roth 2006a), por lo que el aumento en los niveles de este transportador podría estar mediado por NF κ B. Sin embargo, en células BV2 tratadas con LPS, el aumento proteico en los niveles de DMT1 se da en ausencia de variación en el RNA mensajero, por lo que es improbable que NF κ B medie este aumento. Sin embargo, la presencia de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno han mostrado aumentar la actividad IRP (Pantopoulos y cols. 1996), por lo que el aumento en DMT1 podría ser a través de la activación de IRP.

Con respecto a la expresión de hepcidina, los estímulos inflamatorios indujeron su expresión en células C8D1A y BV2, pero no en neuronas N2A, lo que está en concordancia con lo que fue reportado en cultivos primarios (Urrutia y cols. 2013). Mientras que IL-6 indujo la expresión de hepcidina tanto en células C8D1A como BV2, el LPS sólo indujo su expresión en células BV2.

Los estímulos inflamatorios han mostrado aumentar los niveles proteicos de DMT1 y la entrada de hierro no unido a transferrina en cultivos primarios de astrocitos, demostrando la capacidad de este linaje celular para acumular hierro, secuestrándolo y protegiendo a las neuronas del potencial daño celular asociado a estados inflamatorios (Pelizzoni y cols. 2013). Este efecto neuro-protector podría recrearse en células de astrocitos C8D1A tratadas con LPS, donde observamos aumento en los niveles de DMT1 y disminución en los niveles de FPN1, indicando que potencialmente estas células tenderán a la entrada y acumulación de hierro (Figura 21).

Efecto de hepcidina sobre DMT1 y FPN1

Con respecto al tratamiento con hepcidina, en cultivos primarios se observó que ésta disminuye los niveles de FPN1 tanto en neuronas como astrocitos y microglías (Urrutia y cols. 2013), mientras que nosotros encontramos disminución de FPN1 sólo en el caso de la línea neuronal N2A.

Sin embargo, las células de linaje microglial BV2 aumentaron los niveles de DMT1 en respuesta a hepcidina, tal como sucede en cultivos primarios de microglías (Urrutia y cols. 2013).

En el caso de la línea microglial BV2, es interesante que estas células respondieron a hepcidina y además la expresaron en respuesta a LPS e IL-6. Podemos postular que el aumento en los niveles de DMT1 inducido por LPS podría estar mediado en parte por un efecto autocrino asociado a la secreción de hepcidina. En estas condiciones, el aumento en hepcidina inducido por LPS potenciaría el aumento observado en los niveles de DMT1 (Figura 21).

Finalmente, los cambios observados en los niveles de DMT1 y FPN1 se dan en ausencia de variación en la abundancia de los mRNAs, por lo que probablemente corresponden a una respuesta post-transcripcional. En el caso de FPN1, probablemente se trate de un proceso de endocitosis y degradación lisosomal inducida por hepcidina (De Domenico y cols. 2007). En el caso de DMT1, en presencia de hepcidina la misma cantidad de RNA mensajero podría ser traducido de forma más eficiente, a la vez que la proteína de DMT1 podría aumentar su vida media, bloqueándose la tasa de degradación normal.

En un escenario de inflamación inducida por LPS en el que los tres linajes interactúen, es esperable que se produzca una sobrecarga de hierro en todos los linajes celulares, generando aumento en el tono redox y posible daño oxidativo. Además, es esperable que las especies radicalarias que secretan las células BV2, tengan un impacto en la viabilidad de las células N2A y C8D1A. El efecto de estas especies radicalarias estaría potenciado por el aumento en el hierro celular inducido por el LPS de manera similar en los tres linajes celulares. Además, hepcidina secretada por células BV2 inducirá en las células N2A la disminución de FPN1, que acentuará el fenotipo de sobrecarga de hierro en este linaje celular (Figura 21).

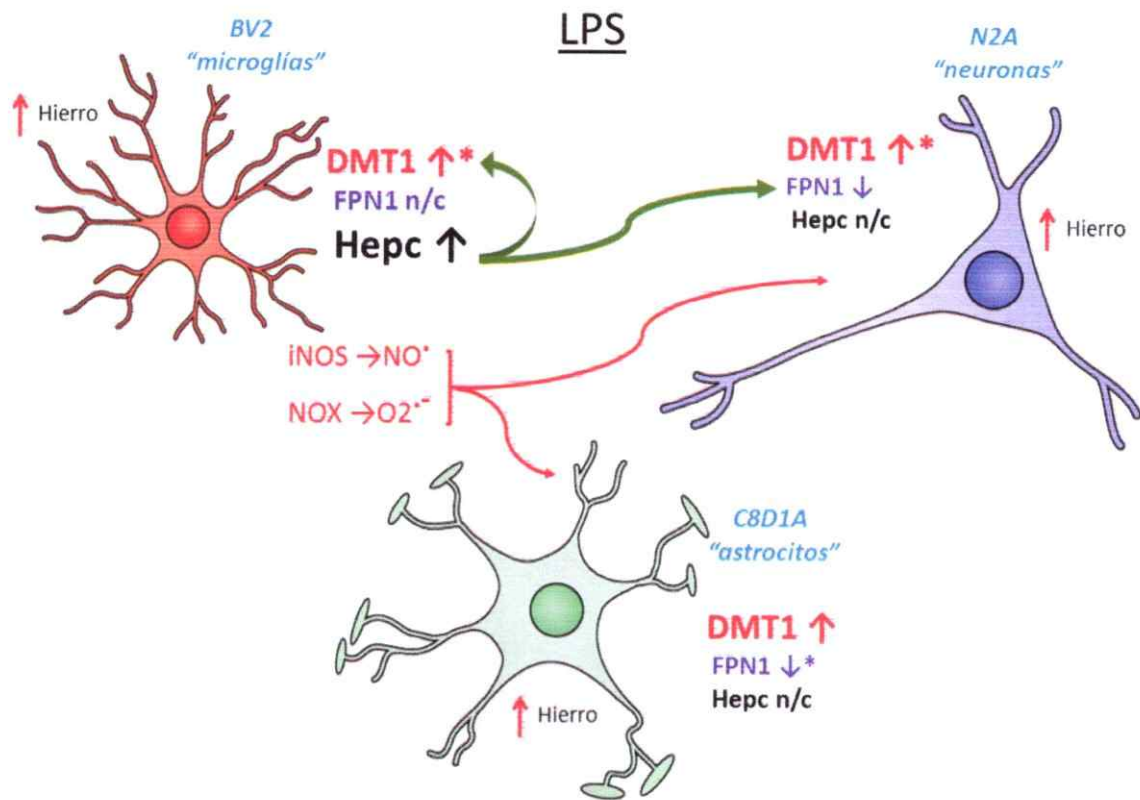
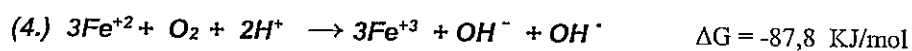
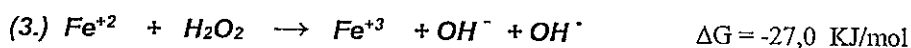
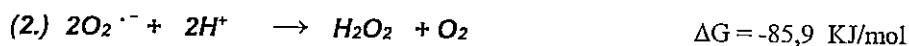
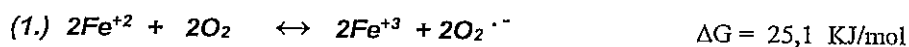


Figura 21. Modelo de interacción entre los tres linajes celulares en un escenario de inflamación inducido por LPS. Este esquema muestra una hipotética situación en que los tres linajes celulares analizados interactúen en un escenario de inflamación. En esta situación se espera que las células BV2 afecten la viabilidad de las células N2A y C8D1A a través de la liberación de las especies radicalarias que generan muerte celular. Adicionalmente se espera que las células BV2 generen hepcidina potenciando de manera autocrina el alza en el transportador DMT1. Además, hepcidina producida por células BV2 inducirá en las células N2A la disminución de FPN1, que acentuará el fenotipo de sobrecarga de hierro en este linaje celular.

MTI como quelante que limita la muerte y el daño oxidativo inducido por LPS en células BV2

En el desarrollo de esta tesis pudimos comprobar que los estímulos inflamatorios indujeron en las tres líneas celulares un fenotipo orientado a la acumulación de hierro. Debido a que la acumulación de hierro produce invariablemente un aumento del tono redox, es esperable que en estos sistemas se genere daño oxidativo. Como se ha mencionado, el hierro, en su estado de oxidación +2, es un productor de ROS como se ejemplifica en las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. Según estas reacciones, con la presencia de hierro y oxígeno se generan peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

Reacciones de Haber-Weiss / Fenton



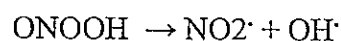
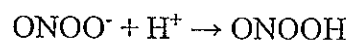
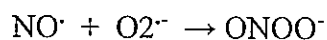
Las reacciones 1-3 se conocen como Haber-Weiss; la reacción 3 se conoce como Fenton

Este set de reacciones describe que el Fe^{2+} en presencia de oxígeno cataliza la producción de superóxido (1.), el que rápidamente dismuta a peróxido de hidrógeno (2.). El peróxido de hidrógeno en presencia de más Fe^{+2} genera el altamente reactivo radical hidroxilo (3.) A diferencia del superóxido y el peróxido de hidrógeno, los cuales pueden ser neutralizados por la superóxido dismutasa y por la catalasa respectivamente, no existen defensas celulares destinadas a eliminar el radical hidroxilo, por lo que hay una relación directa entre su producción y el daño oxidativo, incluyendo la peroxidación lipídica (Núñez y cols. 2012).

En nuestro laboratorio se comprobó que el tratamiento previo de neuronas de hipocampo con LPS o IL-6 potenció la producción de ROS inducida por hierro (Tesis Doctoral de Pamela Urrutia). Estos resultados concuerdan con otro estudio donde neuronas de corteza pre-tratadas con LPS disminuyeron considerablemente su viabilidad al exponerlas a una concentración de hierro que, en ausencia de LPS, no generó muerte celular (Im y cols. 2006).

Al investigar los efectos que tiene el LPS e IL-6 sobre nuestras líneas celulares, no obtuvimos cambios en la viabilidad, excepto en el caso del tratamiento con LPS sobre células microgliales BV2. Como fue mencionado, este mecanismo de toxicidad generado por LPS es dependiente, en este sistema celular, de la activación de iNOS mediada por el factor $\text{NF}\kappa\text{B}$ y la producción de óxido nítrico (NO) (Svensson y cols. 2010; Kacimi y cols. 2011). En microglías también se ha reportado que LPS produce la activación de la NADPH oxidasa (NOX), aumentando la concentración de radical superóxido (Cheret y cols. 2008), el cual en presencia de hierro redox-activo producirá radical hidroxilo y daño oxidativo (Núñez y cols. 2012).

El aumento en los niveles de HNE ha sido ampliamente considerado como un marcador de peroxidación lipídica (Spickett 2013). En las células BV2 pudimos comprobar que LPS genera la formación de aductos de HNE a diferencia de la IL-6 donde no observamos cambios en la viabilidad ni tampoco en la producción de HNE. Esta inducción en la peroxidación lipídica podría deberse a la presencia de NO en los tratamientos con LPS. Sin embargo, la presencia de NO *per se* ha mostrado limitar más que favorecer las reacciones en cadena que producen peroxidación lipídica (Hogg y Kalyanaraman 1999). Además el NO puede inhibir muchos iniciadores potenciales de la peroxidación lipídica, como las enzimas peroxidasas. Sin embargo, en presencia de NO y radical superóxido, se produce peroxinitrito, un poderoso oxidante que favorece las reacciones en cadena que llevan a la peroxidación lipídica (Hogg y Kalyanaraman 1999). Por lo tanto, podemos postular que el efecto de muerte observado en BV2, depende de la producción de NO, pero también en gran medida de la activación de la NOX que producirá radical superóxido, generándose peroxinitrito. El peroxinitrito en equilibrio con el ácido peroxinitroso, se descompondrá rápidamente en radical nitrilo y radical hidroxilo (Coddington y cols. 1999), generando nuevamente un potencial daño a las membranas.



Otra potencial fuente de daño oxidativo lo constituye el hierro *per se*, pues el aumento en los niveles de DMT1 predice la entrada de hierro y el aumento en el tono redox.

En estas condiciones se producirá radical hidroxilo, que también favorecerá la peroxidación lipídica (Núñez y cols. 2012).

Por lo tanto, en el caso de las células microgliales BV2, el tratamiento con LPS producirá peroxidación lipídica y muerte a través de 3 eventos principales:

- 1) activación de iNOS y la consiguiente producción de NO.
- 2) activación de la NOX y la consiguiente producción de radical superóxido, el que en conjunción con el NO producirá peroxinitrito y finalmente radical hidroxilo.
- 3) aumento en los niveles de DMT1 que elevará la concentración de hierro redox-activo, favoreciendo también (vía reacción de Fenton), la producción de radical hidroxilo.

Estos tres eventos convergerán en la producción de radical hidroxilo, que producirá peroxidación lipídica y muerte celular.

Podemos predecir que si se limita la cantidad de hierro en estas condiciones, la peroxidación lipídica y la muerte celular se reducirán. Nuestros experimentos usando quelantes de hierro indirectamente demostraron esta predicción. En concordancia con este razonamiento, el LPS potencia el daño oxidativo al aumentar los niveles de DMT1 y consiguientemente la entrada de hierro, a diferencia de IL-6, que no aumenta los niveles de este transportador.

Una importante pregunta es por qué Q1 no bloqueó la peroxidación lipídica inducida por LPS a diferencia de MT1. Si bien ambos quelantes fueron racionalmente diseñados para ser dirigidos a la mitocondria y quelar el hierro en este compartimento, en experimentos del laboratorio se pudo comprobar que MT1 a diferencia de Q1 quela también el pool de hierro citoplasmático, en tanto que Q1 quela exclusivamente el pool de hierro mitocondrial (Mena y cols. 2015). Precisamente en la membrana plasmática existe la mayor cantidad de ácidos grasos susceptibles de ser modificados oxidativamente (Spickett 2013) y el hierro que generará radical hidroxilo debe estar en las inmediaciones de la membrana plasmática. MT1 por lo tanto, podría quelar el hierro en las inmediaciones de la membrana plasmática que limitaría la generación de radical hidroxilo, bloqueando de esta forma la peroxidación lipídica y evitando la muerte celular.

Otra diferencia importante entre Q1 y MT1 es que MT1 es un compuesto multifuncional capaz de funcionar además de quelante de hierro, como neutralizador del radical libre hidroxilo (Yu y cols. 1999).

Estas dos características hacen de MT1 un agente más eficaz que Q1 para anular la peroxidación lipídica y la muerte celular inducida por LPS en células microgliales BV2.

CONCLUSIONES

- ❖ Los estímulos inflamatorios LPS e IL-6 provocaron cambios en los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 consistentes con un fenotipo orientado a acumular hierro.
- ❖ El estímulo inflamatorio LPS indujo la expresión de hepcidina en la línea celular de microglías (BV2) pero no en la línea celular neuronal (N2A) ni tampoco en la línea celular de astrocitos (C8D1A).
- ❖ Hepcidina indujo la disminución en los niveles de FPN1 en la línea celular neuronal (N2A) y aumentó los niveles de DMT1 en la línea celular de microglías (BV2).
- ❖ LPS aumentó el daño oxidativo y la muerte celular en células microgliales BV2. Este daño y la muerte celular asociada fueron bloqueados por el quelante de hierro MT1.

Podemos concluir que los estímulos inflamatorios generan en todos los linajes celulares un fenotipo orientado a la entrada de hierro principalmente a través del aumento en los niveles de DMT1. La entrada de hierro asociada aumentará la generación de radical hidroxilo y producirá daño oxidativo. Una defensa contra el daño oxidativo inducido por LPS en células microgliales BV2 es limitar la presencia de hierro redox-activo y promover la neutralización del radical hidroxilo, mediante el quelante multifuncional MT1.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Arredondo, M. y Núñez, M. T. (2005). Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci* 6: 3.
- Alliot, F. y Pessac, B. (1984). Astrocytic cell clones derived from established cultures of 8-day postnatal mouse cerebella. *Brain Res* 306: 283-291.
- Arredondo, M. y Núñez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 26: 313-327.
- Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., Andrews, N. C. y Lin, H. Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38: 531-539.
- Beard, J. L. y Connor, J. R. (2003). Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr* 23: 41-58.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R. y Bistoni, F. (1990). immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27: 229-237.
- Coddington, J. W., Hurst, J. y Lyman, S. (1999). Hydroxyl Radical Formation during Peroxynitrous Acid Decomposition. *J Am Chem Soc* 121: 2438-2443.
- Chaston, T., Chung, B., Mascarenhas, M., Marks, J., Patel, B., Srani, S. K. y Sharp, P. (2008). Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 57: 374-382.
- Cheret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P., Mallet, J., Cumano, A., Krause, K. H. y Mallat, M. (2008). Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J Neurosci* 28: 12039-12051.
- De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. I., Ganz, T., Musci, G. y Kaplan, J. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18: 2569-2578.
- Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S. y Andrews, N. C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 1: 191-200.
- Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W. y Cabantchik, I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* 248: 31-40.
- Ganz, T. (2006). Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 29-35, 507.
- Ganz, T. (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 117: 4425-4433.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. y Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488.

- Henn, A., Lund, S., Hedtjarn, M., Schrattenholz, A., Porzgen, P. y Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* **26**: 83-94.
- Hogg, N. y Kalyanaraman, B. (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 378-384.
- Hubert, N. y Hentze, M. W. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12345-12350.
- Im, J. Y., Kim, D., Paik, S. G. y Han, P. L. (2006). Cyclooxygenase-2-dependent neuronal death proceeds via superoxide anion generation. *Free Radic Biol Med* **41**: 960-972.
- Inoue, S. y Kawanishi, S. (1987). Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res* **47**: 6522-6527.
- Jain, V., Langham, M. C. y Wehrli, F. W. (2010). MRI estimation of global brain oxygen consumption rate. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**: 1598-1607.
- Kacimi, R., Giffard, R. G. y Yenari, M. A. (2011). Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF-kappaB, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm (Lond)* **8**: 7.
- Kakhlon, O. y Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* **33**: 1037-1046.
- Ke, Y. y Qian, Z. M. (2007). Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol* **83**: 149-173.
- Knutson, M. D., Oukka, M., Koss, L. M., Aydemir, F. y Wessling-Resnick, M. (2005). Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1324-1328.
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* **531**: 81-92.
- Lam-Yuk-Tseung, S. y Gros, P. (2006). Distinct targeting and recycling properties of two isoforms of the iron transporter DMT1 (NRAMP2, Slc11A2). *Biochemistry* **45**: 2294-2301.
- Li, L., Holscher, C., Chen, B. B., Zhang, Z. F. y Liu, Y. Z. (2011). Hepcidin Treatment Modulates the Expression of Divalent Metal Transporter-1, Ceruloplasmin, and Ferroportin-1 in the Rat Cerebral Cortex and Hippocampus. *Biol Trace Elem Res* **143**: 1581-1593.
- Liddell, J. R. (2015). Targeting mitochondrial metal dyshomeostasis for the treatment of neurodegeneration. *Neurodegener Dis Manag* **5**: 345-364.
- Lis, A., Paradkar, P. N., Singleton, S., Kuo, H. C., Garrick, M. D. y Roth, J. A. (2005). Hypoxia induces changes in expression of isoforms of the divalent metal transporter (DMT1) in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Biochem Pharmacol* **69**: 1647-1655.

- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W. y Simpson, R. J. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5: 299-309.
- Mena, N. P., Esparza, A., Tapia, V., Valdés, P. y Núñez, M. T. (2008). Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G192-198.
- Mena, N. P., García-Beltran, O., Lourido, F., Urrutia, P. J., Mena, R., Castro-Castillo, V., Cassels, B. K. y Núñez, M. T. (2015). The novel mitochondrial iron chelator 5-((methylamino)methyl)-8-hydroxyquinoline protects against mitochondrial-induced oxidative damage and neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 787-792.
- Moos, T. y Rosengren Nielsen, T. (2006). Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron. *Semin Pediatr Neurol* 13: 149-157.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Muñoz, J. P., Sánchez, J. R. y Maccioni, R. B. (2003). Regulation of p27 in the process of neuroblastoma N2A differentiation. *J Cell Biochem* 89: 539-549.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K. y Ganz, T. (2004). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271-1276.
- Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A. y Ganz, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101: 2461-2463.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. y Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8780-8785.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Siritto, M., Sawadogo, M., Kahn, A. y Vaulont, S. (2002a). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4596-4601.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A. y Vaulont, S. (2002b). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110: 1037-1044.
- Núñez, M. T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J. y Speisky, H. (2004). Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 37: 953-960.
- Núñez, M. T., Tapia, V., Toyokuni, S. y Okada, S. (2001). Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco-2) cells. *Free Radic Res* 34: 57-68.

- Núñez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V. y Salazar, J. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* **25**: 761-776.
- Oshiro, S., Morioka, M. S. y Kikuchi, M. (2011). Dysregulation of iron metabolism in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Pharmacol Sci* **2011**: 378278.
- Pantopoulos, K., Weiss, G. y Hentze, M. W. (1996). Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol* **16**: 3781-3788.
- Paradkar, P. N. y Roth, J. A. (2006a). Nitric oxide transcriptionally down-regulates specific isoforms of divalent metal transporter (DMT1) via NF-kappaB. *J Neurochem* **96**: 1768-1777.
- Paradkar, P. N. y Roth, J. A. (2006b). Post-translational and transcriptional regulation of DMT1 during P19 embryonic carcinoma cell differentiation by retinoic acid. *Biochem J* **394**: 173-183.
- Paradkar, P. N. y Roth, J. A. (2007). Expression of the 1B isoforms of divalent metal transporter (DMT1) is regulated by interaction of NF-Y with a CCAAT-box element near the transcription start site. *J Cell Physiol* **211**: 183-188.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. y Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* **276**: 7806-7810.
- Pelizzoni, I., Zacchetti, D., Campanella, A., Grohovaz, F. y Codazzi, F. (2013). Iron uptake in quiescent and inflammation-activated astrocytes: a potentially neuroprotective control of iron burden. *Biochim Biophys Acta* **1832**: 1326-1333.
- Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R. y Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem* **383**: 489-502.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. y Loreal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* **276**: 7811-7819.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L. M., Núñez, M. T., Garrick, M. D., Raisman-Vozari, R. y Hirsch, E. C. (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18578-18583.
- Schneider, S. A. (2016). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *Curr Neurol Neurosci Rep* **16**: 9.
- Spickett, C. M. (2013). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol* **1**: 145-152.
- Svensson, C., Fernaeus, S. Z., Part, K., Reis, K. y Land, T. (2010). LPS-induced iNOS expression in Bv-2 cells is suppressed by an oxidative mechanism acting on the JNK pathway--a potential role for neuroprotection. *Brain Res* **1322**: 1-7.
- Tabuchi, M., Tanaka, N., Nishida-Kitayama, J., Ohno, H. y Kishi, F. (2002). Alternative splicing regulates the subcellular localization of divalent metal transporter 1 isoforms. *Mol Biol Cell* **13**: 4371-4387.

- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M. y Bani-Yaghoub, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* **186**: 60-67.
- Truksa, J., Peng, H., Lee, P. y Beutler, E. (2006). Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10289-10293.
- Urrutia, P., Aguirre, P., Esparza, A., Tapia, V., Mena, N. P., Arredondo, M., González-Billault, C. y Núñez, M. T. (2013). Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J Neurochem* **126**: 541-549.
- Wallander, M. L., Leibold, E. A. y Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 668-689.
- Wang, J., Song, N., Jiang, H. y Xie, J. (2013). Pro-inflammatory cytokines modulate iron regulatory protein 1 expression and iron transportation through reactive oxygen/nitrogen species production in ventral mesencephalic neurons. *Biochim Biophys Acta* **1832**: 618-625.
- Wang, Q., Du, F., Qian, Z. M., Ge, X. H., Zhu, L., Yung, W. H., Yang, L. y Ke, Y. (2008a). Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology* **149**: 3920-3925.
- Wang, S. M., Fu, L. J., Duan, X. L., Crooks, D. R., Yu, P., Qian, Z. M., Di, X. J., Li, J., Rouault, T. A. y Chang, Y. Z. (2010). Role of hepcidin in murine brain iron metabolism. *Cell Mol Life Sci* **67**: 123-133.
- Ward, R. J., Dexter, D. T. y Crichton, R. R. (2012). Chelating agents for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem* **19**: 2760-2772.
- Wardrop, S. L. y Richardson, D. R. (2000). Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur J Biochem* **267**: 6586-6593.
- Weinreb, O., Mandel, S., Youdim, M. B. y Amit, T. (2013). Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med* **62**: 52-64.
- Wu, L. J., Leenders, A. G., Cooperman, S., Meyron-Holtz, E., Smith, S., Land, W., Tsai, R. Y., Berger, U. V., Sheng, Z. H. y Rouault, T. A. (2004). Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* **1001**: 108-117.
- Yu, W., Liu, Z. Q. y Liu, Z. L. (1999). Antioxidant effect of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of linoleic acid in micelles. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*: 969-974.
- Zechel, S., Huber-Wittmer, K. y von Bohlen und Halbach, O. (2006). Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J Neurosci Res* **84**: 790-800.