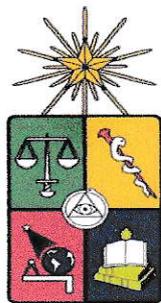


CH-FC
AG-BMCN
633c
1



**CARACTERIZACIÓN DE LA DEGENERACIÓN NEURÍTICA EN NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS INDUCIDA POR 1-METIL-4-FENILPIRIDININO (MPP+),
MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias.**

Facultad De Ciencias

Por

FRANCISCO JAVIER GOMEZ MARDONES

Junio 2010

**Director de Tesis Dr. Marco Tulio Núñez
Co-Director de Tesis Dr. Christian González-Billault**



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

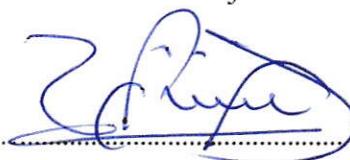
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

FRANCISCO JAVIER GOMEZ MARDONES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias biológicas con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 07 de Julio de 2010

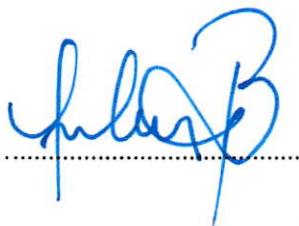
Director de Tesis:

Dr. Marco Tulio Núñez



Co-Director de Tesis

Dr. Christian González-Billault

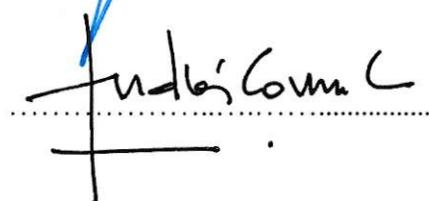


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma



Dr. Andrés Couve





*A mis padres, Cofy y Jorge y a mi hermano, Nicolás.
A mis Abuelos con mucho cariño.*



Agradecimientos

En primer lugar agradezco enormemente a mi familia por todo el apoyo, paciencia y cariño que me han dado, a mi padre Jorge por enseñarme a afrontar la vida sin doblegarme, a mi madre “coty”, por darme toneladas de amor y cariño y a mi hermano Nicolás, por aguantarme y compartir conmigo cada segundo de mi vida. A mis abuelos, Manuel, María y Viterbo por cuidarme desde el cielo y a mi tita por regalarme hasta el cansancio hasta el día de hoy.

A mis numerosos tíos, y muchísimos más primos: Chiti, Carlita, Pame, Valeria, Cristi, Alejandra, Julio, Eli, Felipe y muchos mas.

A todo el laboratorio de Biología del Envejecimiento, Vicky, Pabla, Carola G, Carola C, Nati, Alexis, Andrés, Elmer, Pame, Enrique, al más grande de milenio, al gran Carlos Fuentealba y por sobre todo al Dr Marco Tulio Núñez, que me mostró el camino de la ciencia, me apoyó, me aconsejó en todo momento y se sorprendió junto conmigo con cada resultado obtenido. Muchas gracias a todos por haberme aguantado mis mañas y mi hiperactividad tanto tiempo.

Agradezco también a los terribles Locos Lindos: Daniiii, César y Nicole, Pato, Felipe, Leito, Pauliii y Juan Camilo, Kari, Pao, Seba, Lelo, Cototo, Llomi, Ceci, Amparo, Ema, Maestro Severín, Nacho, Andy, Vale, Cami, Kraemer, Meli, Darko, Guille y Fran, Flaco, “Pumi” (ex chakal), Erick, Claudita, Nacho, Camilo, Mariela y Pachi, por hacer que mi paso por la universidad haya sido una de las etapas mas lindas de mi vida. Muchas gracias por esos tremendos carretes y por todo el jugo que dábamos día a día que siempre me dejaban una sonrisa en la cara.

A los chicos PUC, Ma. Luisa, Pablo, Cata, Lisette, Wilda, Pame, Valerie, a Karlita, por todos esos cafés que nos tomabamos, sacando la vuelta y por supuesto a mi perro loko Felipe (“el Cachulo”).

Por ultimo, agradezco infinitamente a la mujer que me ha aguantado, soportado, regalado, cuidado, retado, aconsejado y animado cuando lo necesitaba. Muchísimas gracias, Natalia por estos hermosos 3 años en los cuales me has convertido en el hombre mas feliz del mundo. Tú me has aguantado todas las mañas, frustraciones, enojos y también compartido las alegrías y éxitos que he vivido a lo largo de esta complicada carrera científica. Pololi, no sabes cuanto te adoro, muchas gracias por todo.

No quiero que nadie se quede afuera de estos agradecimientos, absolutamente TODOS son importantes para mi y si necesitan algo, siempre estaré disponible para lo que quieran. Los quiero a todos cabros de mierdi!

Esta tesis fue auspiciada por lacasadelneumatico.blogspot.net, Picarito, niño oruga, la cuarta compañía de bomberos de Arica y por PAPAZOTEEE TEAM.

---PnXo.---



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
TÍTULO	i
COMISIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESEÑA	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Neuritas y Neurodegeneración.	1
1.2 Enfermedad de Parkinson (EP).	2
1.3 Neuropatología de la EP.	3
1.4 Hierro y estrés oxidativo.	5
1.5 Estrés oxidativo en la EP	7
1.6 Modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson.	7
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GENERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12



4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Materiales	
4.1.1 Reactivos generales.	13
4.1.2 Reactivos de cultivo celular.	13
4.1.3 Cultivo primario.	13
4.1.4 Equipos.	13
4.1.5 Materiales de cultivo.	14
4.1.6. Anticuerpos.	14
4.2 Métodos	
4.2.1 Cultivo primario de mesencéfalo.	15
4.2.2 Obtención de cultivos primarios tratados con distintas concentraciones de hierro:	16
4.2.3 Preparación de suero bajo en Fe^{2+}	16
4.2.4 Obtención de cultivos primarios tratados con distintas concentraciones de MPP+	17
4.2.5 Modificación del contenido de GSH en los cultivos primarios de mesencéfalo	17
4.2.6 Inmunocitoquímicas de los cultivos primarios	18
4.2.7 Evaluación morfológica y morfométrica de las neuronas dopaminérgicas tratadas	18
4.2.9 Estadística	19



5. RESULTADOS

5.1. Caracterización del cultivo primario de mesencéfalo	20
5.2. Caracterización y determinación temporal de los cambios morfométricos en neuronas tratadas con MPP+ sobre la degeneración del árbol neurítico.	24
5.3. Relación entre la degeneración neurítica inducida por MPP+ y una oferta aumentada de hierro	28
5.3.1. Efecto de MPP+ 0,1 μ M en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro en el tiempo.	30
5.3.2. Efecto de MPP+ 1 μ M en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro en el tiempo.	33
5.4. Determinación del rol de los niveles de estrés oxidativo celular sobre la degeneración del árbol neurítico.	37



5.4.1. Efecto de N-acetil-cisteína (NAC) en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+.	37
5.4.1.1. Determinación de concentración óptima de N-acetil cisteína (NAC).	37
5.4.1.2. Efecto de NAC 0,5mM en neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y 0,1µM MPP+ por 24h.	40
5.4.2. Efecto de DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+ en el tiempo.	45
5.4.2.1. Determinación de concentración mínima efectiva de BSO.	45
5.4.2.2. Efecto de BSO 50µM en neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro por 24h.	47
5.4.2.3. Efecto combinado de MPP+, hierro y la inhibición de la síntesis de GSH en la integridad de las neuronas TH-positivas	49

6. DISCUSIÓN	56
Caracterización del cultivo primario de mesencéfalo, usando distintos marcadores moleculares.	56
Caracterización y determinación temporal de los cambios morfológicos en neuronas tratadas con MPP+ sobre la degeneración del árbol neurítico	57
Relación entre la degeneración neurítica inducida por MPP+ y niveles elevados del hierro	58
Mediación del estrés oxidativo celular en la degeneración del árbol neurítico.	60
Efecto de la depleción de GSH en el largo de las prolongaciones de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+ en el tiempo.	61
7. RESUMEN, CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	66
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Representación esquemática de la ruta nigroestriatal normal y la ruta nigroestriatal en la EP.	3
Figura 2: Reacción de Fenton.	6
Figura 3 Representación esquemática del paso del MPTP por el cerebro	9
Figura 4 inmunocitoquímica de un cultivo primario de mesencéfalo de 8 DIV.	21
Figura 5: Presencia de astrocitos en cultivo primario de mesencéfalo de rata de 8 DIV.	22
Figura 6: Inmunocitoquímica contra MAP1B y MAP 2 en cultivos primario de mesencéfalo de rata de 8 DIV.	23
Figura 7: Medición de largo promedio y área de neuronas dopaminérgicas mediante el software LSM5 image browser.	24
Figura 8: Longitud neurítica promedio de neuronas tratadas con distintas concentraciones de MPP+.	25
Figura 9: Longitud neurítica promedio de neuronas tratadas con MPP+ 0,1 y 1 μ M.	26

Figura 10: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con MPP+ 0,1µM.	27
Figura 11: Longitud promedio de las neuritas de neuronas tratadas con distintas concentraciones de hierro.	29
Figura 12: Área promedio de los somas de neuronas tratadas con distintas concentraciones de hierro.	30
Figura 13: Cinética de la disminución de la longitud neurítica total en neuronas tratadas con MPP+ 0,1µM y distintas concentraciones de hierro.	31
Figura 14: longitud neurítica total de neuronas tratadas con MPP+ 0,1µM por 24h y distintas concentraciones de hierro.	33
Figura 15: Cinética de la disminución de la longitud neurítica total en neuronas tratadas con MPP+ 1µM y distintas concentraciones de hierro.	34
Figura 16: Longitud neurítica total media de las neuronas tratadas con MPP+ 1µM por 24h y distintas concentraciones de hierro.	35
Figura 17: Comparación entre una neurona dopaminérgica control y una tratada por 24h con MPP+ 0,1µM y Fe 40µM.	36

Figura 18: Longitud neurítica total y área de somas de las neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de NAC y en distintas concentraciones de hierro.	39
Figura 19: Longitud neurítica total promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con NAC 0,5mM y MPP+ 0,1μM y con distintas concentraciones de hierro por 24h.	41
Figura 20: Área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con NAC 0,5mM y MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro por 24h.	42
Figura 21: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con NAC 0,5mM, MPP+ 0,1μM y 40μM Fe por 24h.	43
Figura 22: Longitud neurítica total y área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de BSO.	45
Figura 23: Longitud neurítica total de las neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50μM y distintas condiciones de hierro por 24h.	46
Figura 24: Área total promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50μM y distintas condiciones de hierro por 24h.	47

Figura 25: Longitud neurítica total y área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y distintas condiciones de hierro por 24h. 49

Figura 26: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con BSO 50 μ M y Fe 40 μ M por 24h. 50

Figura 27: Comparación entre una neurona dopaminérgica tratada con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M por 24h y una tratada con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M en condiciones control y de bajo Fe por 24h. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina sérica de bovino
BSO:	DL-butionina-[S,R]-sulfoximina
CO ₂ :	Dióxido de Carbono
CuCl ₂ :	Cloruro de cobre
DE:	Desviación estándar
DIV:	Dias <i>in vitro</i> .
EA:	Enfermedad de Alzheimer
EP:	Enfermedad de Parkinson
Fe ²⁺ :	Hierro
GFAP:	Proteína fibrilar ácida de la glía
GSH:	Glutación Reducido
HCl:	Ácido Clorhídrico
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrógeno
MnCl ₂ :	Cloruro de manganeso
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio
MPP+:	1-metil-4-fenilpiridinino
NAC:	N- acetil Cisteína
NaHCO ₃ :	Bicarbonato de sodio
NTA:	Ácido Nitrilotriacético
O ₂ :	Oxigeno
OH·:	Radical Hidroxilo

PBS:	Buffer fosfato salino
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SFB:	Suero fetal bovino
SNpc:	<i>Sustantia nigra pars compacta</i>
TH:	Tirosina hidroxilasa
ZnCl ₂ :	Cloruro de zinc

RESUMEN.

Las dendritas son los principales sitios de recepción de estímulos excitatorios en una neurona. Se ha postulado que la fragmentación de estas corresponde a una manifestación temprana de daño que lleva a la muerte neuronal. Estudios en tejidos *post mortem* de pacientes con Parkinson (EP) y en ratones tratados con la neurotoxina MPP⁺ muestran que el largo del axón y las dendritas y la densidad de las espinas sinápticas disminuyen en neuronas dopaminérgicas de la *Sustantia Nigra pars compacta* (SNpc). Sin embargo, la etiología de los cambios morfológicos y su relación con los cambios funcionales en la célula no ha sido descrita. En este trabajo se caracterizó el efecto de MPP⁺ sobre la integridad del árbol axo-dendrítico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y se determinó la influencia de los niveles celulares de hierro y de glutatión en esta degeneración. Se observó que MPP⁺ indujo de forma dosis-dependiente una drástica reducción del árbol dendrítico sin modificación del soma ni muerte aparente. Tratamientos conjuntos con MPP⁺ y una concentración elevada no tóxica de hierro aceleraron el proceso de degeneración, mientras que neuronas crecidas en un medio bajo en hierro no presentaron degeneración. Pre-tratamientos con N-acetilcisteína protegió a las neuronas de la degeneración del árbol dendrítico producido por MPP⁺ más hierro. Por el contrario, tratamientos con el inhibidor de la síntesis de glutatión BSO, en conjunto con hierro y MPP⁺, produjo la pérdida total del árbol dendrítico y muerte celular, en tanto que tratamientos con BSO más MPP⁺ en condiciones de bajo hierro no dañaron a las neuronas. Estos resultados sugieren que la acumulación de hierro bajo condiciones de inhibición del complejo I mitocondrial es un posible mecanismo de muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en EP.

ABSTRACT.

Dendrites are the main reception sites of excitatory stimulus in neuron. It has been postulated that the fragmentation of dendrites is an early manifestation of the damage that leads to neuronal death. Studies in post-mortem tissues of patients with Parkinson's disease (PD) and in mice treated with the neurotoxin MPP⁺ has shown that the length of axon and dendrites, as well as the density of synaptic spines, decrease in dopaminergic neurons *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) of PD patients. However, the etiology of the morphological changes and their relationship to the cellular levels of iron and glutathione has not been described. This study characterized the effect of MPP⁺ on the integrity of the axo-dendritic tree of midbrain dopaminergic neurons, and determined the influence of iron and cellular levels of glutathione in this degeneration. MPP⁺ induced a dose-dependent drastic reduction of the dendritic tree, without modification of the soma or apparent death. Concurrent treatment with MPP⁺ and non-toxic concentration of iron accelerated the process of degeneration, whereas neurons grown on a medium low in iron showed no degeneration. Pre-treatment with N-acetylcysteine protected the neurons from degeneration of the dendritic tree produced by MPP⁺ plus iron. By contrast, treatment with the inhibitor of glutathione synthesis BSO, in conjunction with iron and MPP⁺, produced the total loss of the dendritic tree and cell death, whereas treatment with BSO plus MPP⁺ under low iron conditions did not damage the neurons. These results suggest that under conditions of inhibition of mitochondrial complex I, the accumulation of iron and the concurrent decrease in reduced glutathione is a possible mechanism that underlies the loss of the dendritic tree and later the death of dopaminergic neurons in PD.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Neuritas y Neurodegeneración

Las dendritas son prolongaciones protoplásmicas ramificadas de la célula nerviosa. Son las principales estructuras responsables de la integración sináptica, al ser receptores de impulsos nerviosos provenientes desde una prolongación perteneciente a otra neurona. Poseen receptores capaces de responder a neurotransmisores enviados desde las vesículas sinápticas de la neurona presináptica, siendo fundamentales para la correcta transmisión de los impulsos quimioeléctricos a través de la vía nerviosa compuesta por las neuronas aferentes y eferentes[1].

Muchas enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Huntington o Parkinson involucran atrofias en las dendritas y axones. En muchos casos es difícil determinar qué ocurre primero, si la degeneración de estas prolongaciones precede a la muerte celular o si son una consecuencia de la muerte neuronal. En las enfermedades de Huntington y Alzheimer se ha visto que la acumulación de la proteína huntingtina y depósitos de amiloides en los axones, respectivamente, producen una degeneración axonal, que precede a la muerte neuronal[2, 3]. Adicionalmente en la enfermedad de Alzheimer hay una pérdida significativa de neurofilamentos en las dendritas de las neuronas piramidales. Esta pérdida acorta la longitud de las dendritas y del axón, y por ende, la capacidad de estas neuronas para hacer conexiones con otras capas de la corteza. Traduciéndose finalmente en la sintomatología descrita en la enfermedad[4]. En la enfermedad de Parkinson (PD) también

se ha visto un acortamiento en la longitud de las prolongaciones de las neuronas, tanto en tejido postmortem de pacientes como en modelos animales de la enfermedad[5].

1.2. Enfermedad de Parkinson (EP)

En 1817, James Parkinson fue el primero en describir esta enfermedad, que después llevaría su nombre, con el ensayo “An essay on the shaking palsy”[6]. 100 años después, se descubrió que los pacientes con EP sufren una disminución en el número de neuronas en la *Sustantia nigra pars compacta* (SNpc). Luego en 1958 se describió a la dopamina como neurotransmisor y en 1960 se vio que las concentraciones de dopamina en el estriado disminuyen considerablemente en pacientes con EP[7].

La EP es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva con una etiología multifactorial. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo, después de la enfermedad de Alzheimer y aproximadamente de 1% a 2% de la población mundial mayor a 65 años padece esta progresiva enfermedad, aumentando su incidencia de 4-5% en la población mayor a 85 años[8]. Alrededor del 90% de los casos de la EP son esporádicos y no tienen una etiología clara, mientras que el 10% restante tienen un origen genético, asociado a mutaciones monogénicas en los genes PARK[9]. El único factor de riesgo demostrado para la EP es el envejecimiento. Otros factores asociados son los factores ambientales o la exposición a toxinas, como herbicidas o solventes, sin embargo, ninguno de estos factores ha sido claramente identificado como causante de la enfermedad.

1.3. Neuropatología de la EP.

La característica patológica de la EP es la degeneración selectiva y progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de inclusiones proteínicas citoplasmáticas llamadas “cuerpos de Lewy” en las neuronas remanentes[9, 10] (Figura 1).

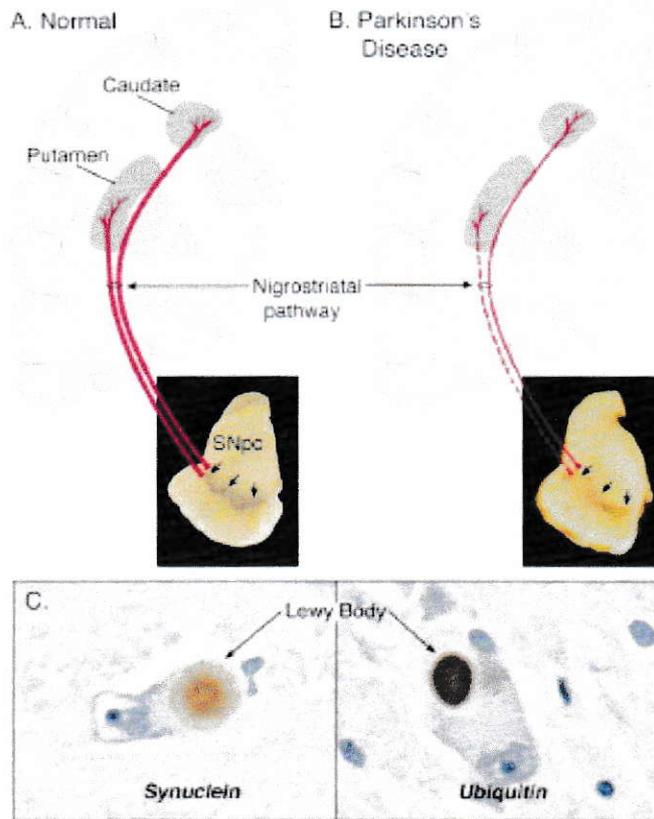


Figura 1: Representación esquemática de la ruta nigroestriatal normal (A), y la ruta nigroestriatal en la EP (B). (C) Inmunohistoquímica marcando las proteínas agregadas en un cuerpo de lewy de una neurona dopaminérgica en la EP. Obtenido de Dauer y Przedborski, 2003[7].

Estas neuronas dopaminérgicas proyectan al putámen y al núcleo caudado en el estriado y a otras regiones subcorticales. En la enfermedad, hay una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado y en menor medida hay una pérdida de las

prolongaciones que proyectan al caudado. La pérdida de estas neuronas, las cuales tienen grandes cantidades de neuromelanina[11] producen la clásica característica neuropatológica de despigmentación de la SNpc (Figura 1b). Otra característica de la enfermedad es la acumulación de proteínas insolubles, principalmente de α -sinucleína y ubiquitina en los cuerpos de lewy (Figura 1c).

Entre los síntomas motores de la EP se encuentran rigidez muscular, temblores involuntarios, inestabilidad en la postura y una lentitud en los movimientos físicos (bradicinesia). También los pacientes padecen síntomas no motores como depresión, demencia, insomnio y otros desordenes del sueño, disfunción olfatoria y fatiga[12].

Como tratamiento de la enfermedad, el uso de Levodopa (L-dopa), un precursor del neurotransmisor dopamina, produce una notable mejoría de los síntomas y de la calidad de vida, sin embargo este tratamiento es solo sintomático y no detiene la progresión de la enfermedad.

Cuando un paciente es diagnosticado con EP aproximadamente el 60% de las neuronas dopaminérgicas ya han muerto[13] y las concentraciones de dopamina en el estriado disminuyen un 70%[14]. Por esto, es de suma importancia lograr detectar la enfermedad en estadios más tempranos, para así plantear posibles tratamientos.

A pesar de que la etiología de la EP es desconocida, estudios realizados en modelos animales y tejido postmortem de pacientes, entregan evidencias claras de la existencia de cuatro eventos implicados en la neurodegeneración:

1. La disfunción del complejo I mitocondrial.
2. El aumento de hierro (relacionado a un aumento de estrés oxidativo y disminución de los niveles de glutatión)[23, 63].
3. La alteración del sistema ubiquitina-proteasoma, y la agregación de las proteínas α -sinucleína y ubiquitina.
4. La inflamación.

Adicionalmente a estos cuatro eventos celulares característicos de la enfermedad, investigaciones morfológicas de las neuronas dopaminérgicas presentes en la SNpc han descrito anormalidades en el cuerpo dendrítico de estas neuronas. En ambas formas de EP, esporádico y genético, las neuronas se degeneran de la forma “dying back”, caracterizada por la pérdida temprana de las partes más distales de la neurona y por axonopatía[15].

1.4 Hierro y estrés oxidativo.

El hierro es un elemento químico simbolizado como Fe. Su número atómico es 26 y posee dos valencias, +2 y +3. De esta forma, el hierro forma compuestos ferrosos si presenta valencia +2 y férricos cuando presenta valencia +3. Debido al ambiente reductor presente en la célula, el hierro se encuentra casi en su totalidad como hierro +2 y como tal puede formar parte del pool de hierro lábil o asociarse a proteínas de almacenamiento de hierro, como ferritina. Cuando este se encuentra libre en el citosol puede intercambiarse rápidamente a hierro +3 tras reaccionar, por ejemplo, con compuestos tales como el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton (Figura 2).

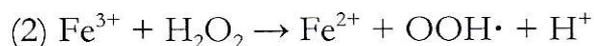
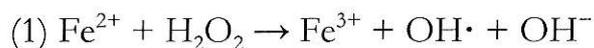


Figura 2: Reacción de Fenton. El hierro ferroso (II) en la reacción (1) es oxidado por peróxido de hidrógeno a hierro férrico (III), produciendo además un radical hidroxilo y un anión hidroxilo. El hierro (III) puede ser reducido de vuelta a hierro (II) por peróxido de hidrógeno de nuevo, formando un radical peróxido y un protón (reacción 2).

Esta actividad oxido-reductora lo convierte en uno de los elementos más reactivos presentes en la célula y, en abundancia, uno de los principales productores de especies reactivas del oxígeno (ROS). Dentro de las ROS se encuentra el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el que es capaz de generar diversos daños a macromoléculas como proteínas (formando aductos), ácidos nucleicos (generando hidroxí-derivados) y lípidos (peroxidación lipídica)[16] [17].

No obstante lo anterior, este importante elemento es esencial para que se lleven a cabo una serie de procesos fisiológicos vitales. En mamíferos su función más conocida consiste en proveer un sitio de unión para el oxígeno en el grupo hemo de la hemoglobina[18]. Además, puede unirse a otras proteínas en forma no hémica, principalmente en la forma de grupos de Fe-S, actuando como grupo prostético en metaloproteínas con importantes roles en los procesos de transferencia de electrones, regulación transcripcional, estabilización estructural y catálisis[19]. Esta dualidad esencial/tóxico que tiene el hierro lo convierte en un elemento que cuya concentración debe ser altamente regulada, ya que tanto la carencia como el exceso de este metal es dañino para la célula.

1.5. Estrés oxidativo en la EP

Otro elemento que se ha visto que es relevante en la muerte neuronal en la EP es la acumulación de hierro. Como el hierro es un productor intrínseco de ROS, las células deben tener mecanismos que eviten la acumulación de hierro por sobre las cantidades necesarias. Sin embargo, en muchas enfermedades neurodegenerativas se ha encontrado una acumulación de hierro en zonas donde hay muerte neuronal, en particular en las neuronas dopaminérgicas mielinizadas de la SNpc[20]. En estas neuronas se encuentra una fuente de radicales libres propia de estas células, derivada de la oxidación no enzimática de la dopamina inducida por hierro, la cual produce semiquinonas y H_2O_2 [21, 22]. Así, el hierro, a través de la reacción de Fenton o a través de la oxidación de la dopamina, es un agente oxidante peligroso.

Ya que los estudios de acumulación de hierro en la EP se hacen en tejidos post-mortem de pacientes que padecieron la enfermedad, en donde las neuronas remanentes están en estadios terminales, mostrando una clara acumulación de hierro en los somas[23-25], todavía no es claro cual es la posición temporal que tiene la toxicidad del hierro durante la progresión de la EP. Así, la acumulación de hierro podría ser un cofactor relevante en la degeneración axo-dendrítica producida en la enfermedad.

1.6. Modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson.

Los modelos experimentales de la EP comprenden animales con alteraciones genéticas o el tratamiento con toxinas que inducen un cuadro de síntomas similares a los de la

enfermedad. Todos estos cuadros juegan un rol crítico para responder las preguntas sobre los mecanismos y causas involucradas en la EP.

Los modelos más usados son el de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino (MPTP)[14, 26-28] y el de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)[29, 30]. El modelo de MPTP tiene una ventaja competitiva frente a los demás, debido a que en humanos y primates induce un síndrome virtualmente idéntico a la EP.

Después de la administración sistémica, el MPTP es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Figura 2). Una vez en el cerebro, esta protoxina es metabolizada en la glía al compuesto 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP) por la enzima monoamina oxidasa B (MAO-B) y luego es metabolizada al compuesto activo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) de manera desconocida[28]. Luego, el MPP+ es liberado de la glía y es selectivamente incorporado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT), ubicado en la membrana celular de estas neuronas[31].

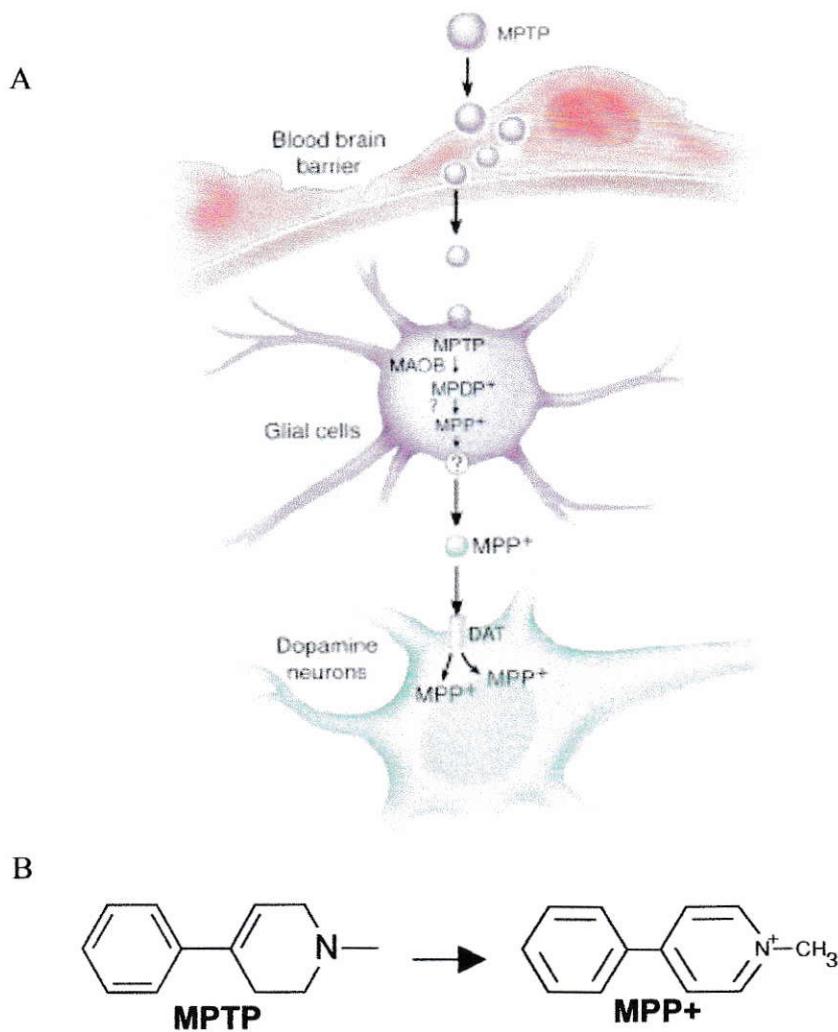


Figura 3: Representación esquemática del paso del MPTP por el cerebro (A). En (B) se observa las estructuras del MPTP y de su compuesto activo el MPP⁺. *Obtenido de Przedborski, S. y M. Vila 2003[28].*

En la neurona, el MPP⁺ es transportado a través de muchos compartimientos celulares. Puede ser secuestrado en vesículas citoplasmáticas por la acción de transportadores vesiculares de monoaminas [32] o puede entrar en la mitocondria, donde interfiere con el complejo I de la cadena transportadora de electrones, inhibiéndolo[33]. Los efectos de esta

inhibición son reducir los niveles de ATP[34] e incrementar los niveles de estrés oxidativo[35] a través de la formación de radicales superóxido[36].

En diversos estudios se ha descrito que la toxina induce un proceso secuencial en la célula de:

- 1) inhibición del complejo I mitocondrial[37],
- 2) aumento del hierro redox-activo mitocondrial[38],
- 3) aumento del estrés oxidativo celular[39],
- 4) disminución de los niveles de glutatión[40],
- 5) aumento masivo del contenido de hierro neuronal detectado por tinción de Perl[38, 41] y
- 6) muerte de las neuronas dopaminérgicas de SNpc[39].

De este modo desde su descubrimiento, tanto animales como cultivos celulares tratados con esta toxina son utilizados como modelos experimentales de la EP.

Considerando todos los antecedentes previamente mencionados, en esta tesis se estudió el efecto del hierro y la influencia de los niveles de glutatión celular en la degeneración neurítica inducida por la neurotoxina MPP+ en un modelo neuronal dopaminérgico de rata.

2. HIPÓTESIS.

“En neuronas dopaminérgicas de la SNpc, la alteración del árbol neurítico inducida por MPP+ es un evento posterior al aumento de estrés oxidativo inducido por la acumulación de hierro y precede a la muerte neuronal”.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar temporal y morfológicamente la degeneración neurítica inducida por la neurotoxina MPP⁺ en neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* de mesencéfalo de rata y ver la influencia de los niveles de hierro y estrés oxidativo intracelular sobre la arquitectura axo-dendrítica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Caracterización del cultivo primario de mesencéfalo, usando distintos marcadores moleculares.

3.2.2. Caracterización temporal y determinación de los cambios morfométricos en neuronas dopaminérgicas tratadas con MPP⁺ sobre la degeneración del árbol neurítico.

3.2.3. Relación entre la degeneración neurítica inducida por MPP⁺ y la dishomeostasis del hierro.

3.2.4. Determinación del rol de los niveles de estrés oxidativo celular sobre la degeneración del árbol neurítico:

3.2.4.1. Determinación del efecto de N-AcetilCisteína (NAC) sobre el proceso de degeneración del árbol neurítico inducido por MPP⁺.

3.2.4.2. Determinación del efecto del inhibidor de la síntesis de glutatión (GSH), DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) sobre el progreso neurodegenerativo inducido por MPP⁺.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1. Reactivos generales

BSA, CuCl_2 , CO_2 , Etanol, metanol, FeCl_3 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , KCl, HCl, MnCl_2 , NaCl, NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , NaCl, NaOH, NTA, Paraformaldehído, Tritón X-100, ZnCl_2 , Fluorsave, Chelex-100.

4.1.2. Reactivos de cultivo celular

De Gibco: Antibiótico/Antimicótico (15240-062), DMEM:F12 (12400-024), L-15 (41300-039) PBS (21600-010), Tripsina 10X (15400-054); De Sigma: Insulina (I6634), MPP+ (D048), Poly-L-lisina (P4707), Progesterona (P0130), L-tiroxina (T1775), Selenito de sodio (S5261), Suero Fetal Bovino (EuroClone).

4.1.3. Animales

El cultivo primario de mesencéfalo fue realizado a partir de embriones de rata Spreague-Dowley en estadio E14,5 obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los protocolos experimentales utilizados en este trabajo cumplieron con el “guiding principles for research involving animals and human beings” del american physiological society [64] y fueron aprobadas por el comité de bioética para la investigación en animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.1.4. Equipos

Incubadora con inyección de CO₂ (Thermo serie 8000 WJ, modelo 3429), Centrífuga Mikro 22R (Hettich), pHmetro (Oakton), Balanza Precisa XB220A, Campana de flujo laminar NUAIRE y MSC9 (JOUAN), estéreomicroscopio zoom SZ51 (Olympus), Luz halógena LG-PS2 (Olympus), Microscopio Confocal LSM 510 meta (Carl Zeiss).

4.1.5. Materiales de cultivo

Material quirúrgico: Pinzas Dumont #5, Titanio (7-14096) y tijeras quirúrgicas. Placas de 6 pocillos, 10 cm² superficie (Costar 3506); Placas P35, 35mm de diámetro 10 cm² de superficie (Corning 430165); Placas P60, 60mm de diámetro 20 cm² de superficie (Corning 430166); Placas P100, 100mm de diámetro 60 cm² de superficie (Corning 430167); cubre objetos de 12 y 25mm de diámetro; Tubos de centrífuga plásticos 15 y 50 mL (Orange Scientific); Pipetas plásticas estériles desechables 10mL (TCL); Unidades de filtración desechables Millex-GP 0.22µm (Millipore); Jeringas 20 y 50mL (BD Plastipak).

4.1.6. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Anticuerpo policlonal anti-Tirosina Hidroxilasa de conejo, dilución 1:1000 (Sigma). Anticuerpo monoclonal anti-GFAP de ratón, dilución 1:500 (Promega). Anticuerpo policlonal anti-MAP1-B de cabra, dilución 1:100 (Santacruz), Anticuerpo monoclonal anti-β-3 tubulina de ratón, dilución 1:500. Anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 y 546 anti-ratón, alexa fluor 488 y 546 anti-conejo y alexa fluor 633 anti cabra, dilución 1:300 (Invitrogen).

4.2 Métodos

4.2.1. Cultivo primario de mesencéfalo.

Se estableció un cultivo primario de mesencéfalo a partir de ratas preñadas en estadio E14,5, Según descrito por Brouard et al[42]. Las ratas fueron anestesiadas, retirándose posteriormente los embriones y dejándolos en medio L-15 frío. Luego de retirar el cerebro de los embriones, fue extraído el mesencéfalo y posteriormente fueron extraídas las meninges.

Una vez limpio, el mesencéfalo fue dissociado de forma mecánica, primero cortando el tejido en pedazos pequeños y luego por pipeteo. Posteriormente el tejido se dejó sedimentando, se recuperó el sobrenadante y este fue centrifugado para la obtención de neuronas. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo DMEM-F12 / SFB 5% con BSA 0,1%, Insulina 5µg/ml, Progesterona 20nM, L-tiroxina 30nM, Selenito de sodio 30nM, penicilina 100U/ml y estreptomycinina 100mg/ml y fueron sembradas cubre objetos de 12 y 25mm pre-tratados por 24 horas con L-polilisina 1mg/ml en placas de 6 pocillos.

Las placas se dejaron incubando a 37°C a una concentración del 5% CO₂/ 95% aire. El medio fue reemplazado en un 100% al día siguiente (20-24 horas después del cultivo) y luego cada 2 días se reemplazó la mitad de medio hasta llegar a los 8 días *in vitro*.

4.2.2. Obtención de cultivos primarios tratados con distintas concentraciones de hierro:

Para obtener neuronas tratadas bajo distintas condiciones de hierro, estas se incubaron durante 7 días en condiciones normales y al séptimo día y por 24 horas se sometieron a tratamientos con medio con distintas concentraciones de FeCl₃-Nitrilotriacetato de sodio (Fe.NTA, relación molar 1:2,2). El hierro total en el medio estándar de cultivo fue 7μM.

4.2.3. Preparación de suero bajo en Fe²⁺

Para poder tener un medio bajo en Fe²⁺, se queló el hierro del suero fetal bovino con Chelex-100. Esta es una resina que une metales de transición con alta afinidad. Se mezcló 20ml de SFB con 1,5gr de Chelex-100, en su forma sódica y con 2,8gr de Chelex en su forma protonada, luego se ajustó el PH a 5,5 y se dejó toda la noche en un agitador a 4°C. Luego se colectó el suero y la resina se lavó dos veces con 10ml de PBS. El suero tratado quedó con una concentración de hierro de 2μM aproximadamente. El SFB bajo en hierro fue suplementado con CuCl₂ 5μM, ZnCl₂ 30μM y MnCl₂ 15nM, debido a que estos metales también son quelados por esta resina.

4.2.4. Obtención de cultivos primarios tratados con distintas concentraciones de MPP+

Para obtener neuronas tratadas bajo distintas condiciones de MPP+, estas se incubaron durante 7 días en condiciones normales y al séptimo día se sometieron a tratamientos con medio con distintas concentraciones de MPP+. Se incubaron los cultivos con medios suplementados con MPP+ 0,1, 1, 2,5, 5, 10 y 20μM por 24h.

4.2.5. Modificación del contenido de GSH en los cultivos primarios de mesencéfalo.

Para modificar el contenido de GSH en las neuronas se realizaron dos procedimientos: se aumentó su producción y se inhibió su síntesis.

Primero se vio el efecto del aminoácido limitante en la formación de GSH en la célula N-Acetilcisteína (NAC) sobre el proceso de degeneración del árbol axo-dendrítico producido por MPP⁺. Se cultivaron las neuronas por 7 DIV en condiciones normales y luego por 24h se incubaron los cultivos usando concentraciones de NAC 0,5, 1 y 5mM. Se eligió la concentración máxima que no produjo cambios en el árbol neurítico y se realizaron co-incubaciones con MPP⁺ 0,1μM y/o Fe²⁺ y NAC por 24h.

Luego se usó el inhibidor de la síntesis de GSH, DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) en los cultivos[43] y se vio su efecto sobre el proceso de degeneración del árbol axo-dendrítico producido por MPP⁺. Se cultivaron las neuronas por 7 DIV en condiciones normales y luego por 24h se incubaron los cultivos usando concentraciones de BSO 10, 50, 100 y 150μM en el medio de cultivo[43]. Luego se determinó la concentración mínima efectiva y se realizaron co-incubaciones con MPP⁺ 0,1μM y/o distintas concentraciones de Fe²⁺ y BSO por 24h.

4.2.6. Inmunocitoquímicas de los cultivos primarios

Luego de los tratamientos, los cultivos crecidos en cubreobjetos se lavaron con PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído 4% sacarosa en PBS por 10 minutos a 37°C. Luego, se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X 3 veces x 5min, las células se permeabilizaron con 0,2% Tritón X-100 en PBS por 5 minutos a 37°C y se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS. Las células se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con 5% BSA en PBS. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche en una cámara húmeda; el anticuerpo se diluyó en 1% BSA/0,1% Tritón x-100 en PBS. Las células en los cubreobjetos fijadas se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS y luego se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, diluido de la misma manera que el anticuerpo primario. Protegido de la oscuridad, los cubreobjetos se lavaron 5 veces x 5 minutos con PBS y luego una vez con agua. Las células se montaron con medio de montaje Fluorsave.

4.2.7. Evaluación morfológica y morfométrica de las neuronas dopaminérgicas tratadas

Los cultivos neuronales se mantuvieron 7 días in Vitro (DIV). Luego de realizados los distintos tratamientos, los cultivos se fijaron y se realizaron inmunocitoquímicas. Luego se obtuvieron imágenes a través de microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss LSM Meta. Para determinar la morfología neuronal se realizaron distintas mediciones morfométricas de acuerdo a Coombs et al[44] utilizando el programa LSM5 ImageBrowser disponible en el software asociado al microscopio. Para medir el largo de una prolongación se trazó una línea a lo largo de esta. El programa entregó el largo trazado considerando los

parámetros del confocal al momento de obtener la imagen como el zoom y el objetivo puesto en ese momento. Para obtener las áreas de los somas, se trazó una circunferencia por todo el contorno del soma y el programa arrojó los valores de estas áreas.

4.2.8. Estadística

Para cada tratamiento se obtuvo el promedio de 10 mediciones individuales en tres experimentos independientes. Se graficaron los resultados de los distintos tratamientos utilizando el programa GraphPad y se analizó la significancia de las diferencias con el programa InStat. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) .

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización del cultivo primario de mesencéfalo

Luego de 8 DIV, se realizaron inmunocitoquímicas contra proteínas de citoesqueleto: β -3 tubulina como marcador neuronal, MAP1B como marcador axonal y además se vio la presencia de astrocitos en los cultivos con el anticuerpo anti-GFAP. Para distinguir a las neuronas dopaminérgicas, se usó el anticuerpo anti-Tirosina hidroxilasa (TH), enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-Tirosina al precursor de dopamina dihidroxifenilalanina (DOPA)[45]. Esta enzima se encuentra exclusivamente en células productoras de catecolaminas y específicamente en neuronas dopaminérgicas ubicadas en la SNpc y en el área tegmental ventral en el mesencéfalo.

En la Figura 4, se observan imágenes de un cultivo primario de rata de 8 DIV. En (A) se observa una neurona dopaminérgica TH positiva (verde), sobreexpuesta para mostrar el árbol neurítico. En (B) se muestra una tinción general para todas las neuronas de ese cultivo (β -3 tubulina, rojo) y en (C) la tinción nuclear (TO-PRO3, azul). Se aprecia claramente en la Figura 4 la morfología de las neuronas TH-positivas, con cuerpos fusiformes con múltiples dendritas proyectando en forma radial. El cultivo primario de mesencéfalo de 8 DIV, tiene aproximadamente entre un 0,5 a un 1% de neuronas dopaminérgicas TH positivas, calculadas por:

Número de neuronas TH-positivas / Número de neuronas marcadas por β -3 tubulina

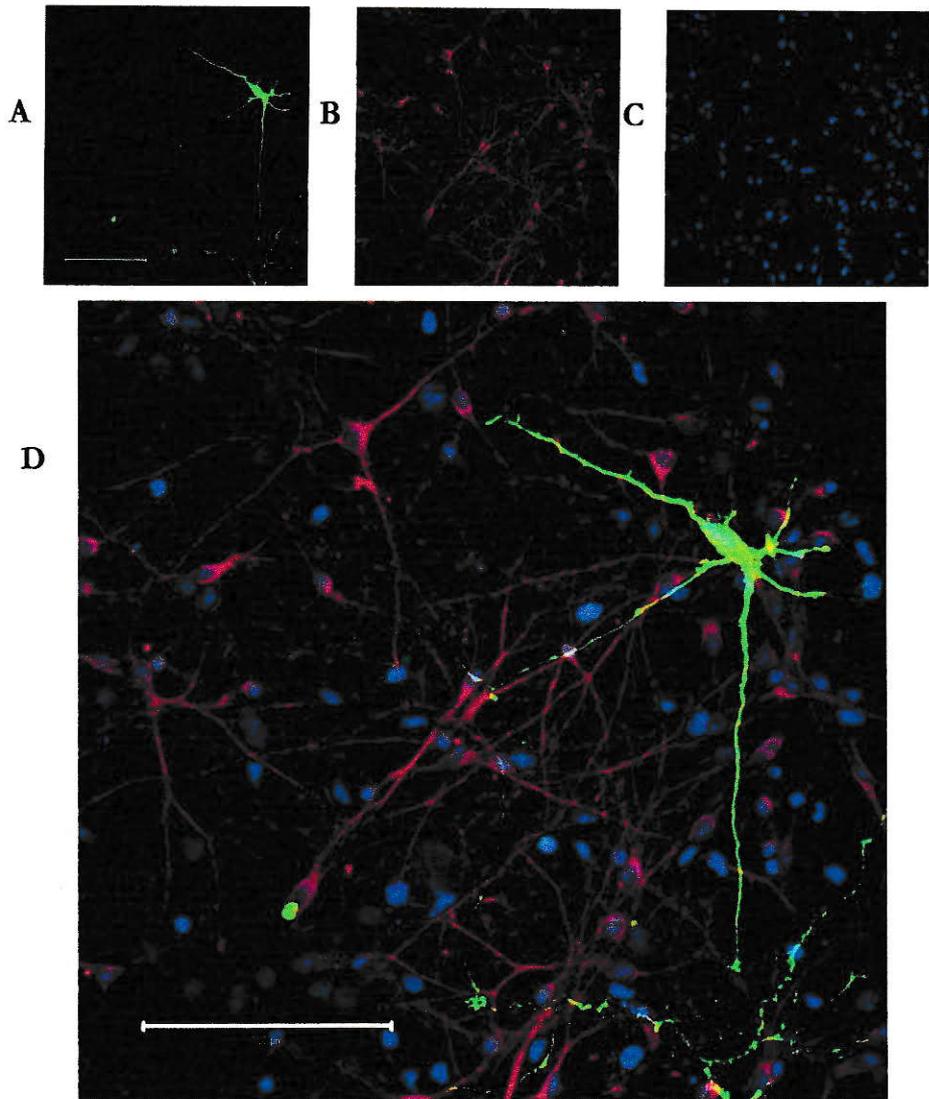


Figura 4: Inmunocitoquímica de un cultivo primario de mesencéfalo de 8 DIV. (A) Neurona dopaminérgica marcada con anticuerpo contra TH (verde); (B) neuronas del cultivo marcadas con anticuerpo contra β -3 tubulina (rojo); (C) núcleos marcados con TO-PRO3 (azul). (D) Fusión de las imágenes anteriores, barra = 100 μ m.

También en la Figura 4 se puede apreciar células cuyos núcleos están marcados por TO-PRO3 y que no están marcadas con β -3 tubulina. Inmunocitoquímica contra GFAP para evaluar la presencia de astrocitos indicó que aproximadamente el 10% del total de células de los cultivos primarios de mesencéfalo corresponden a este tipo celular (Figura 5).

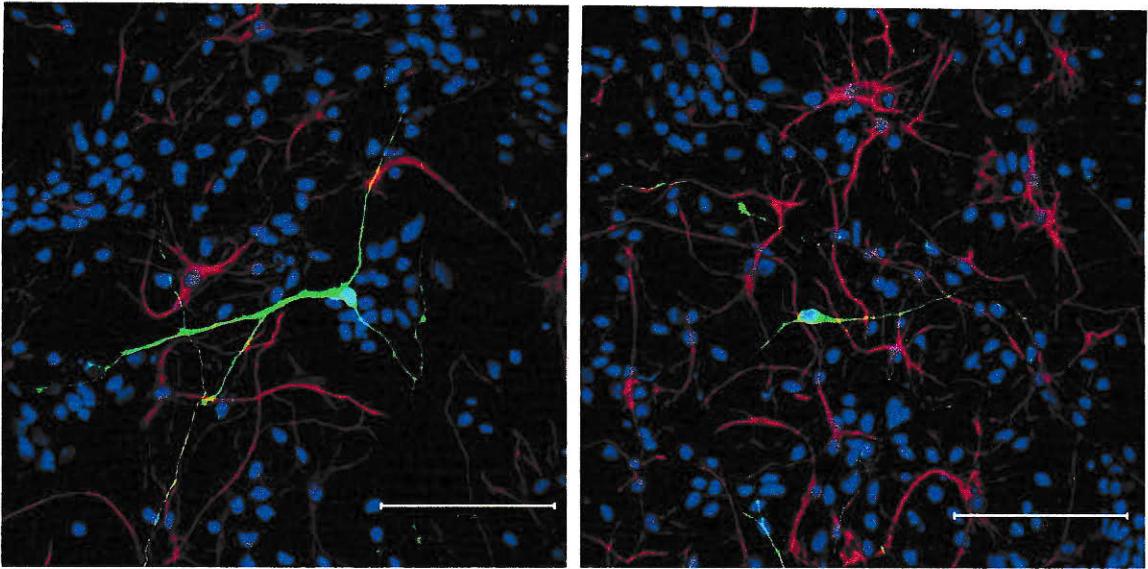


Figura 5: Presencia de astrocitos en cultivo primario de mesencéfalo de rata de 8 DIV. Las neuronas dopaminérgicas fueron marcadas con el anticuerpo anti-Tirosina hidroxilasa (verde) y los astrocitos fueron marcados con anti-GFAP (rojo). Los núcleos fueron marcados con TOPRO (azul). Barra = 100 μ m.

Se realizaron además inmunocitoquímicas utilizando un marcador preferentemente axonal, el anticuerpo anti-proteína asociada a microtúbulos 1B (anti-MAP1B) y un marcador de dendritas, anti-MAP2 (Figura 6). MAP1B se encuentra expresado fuertemente en la región distal de axones en crecimiento [46] y MAP2 es un marcador preferentemente dendrítico[47]. En la Figura 6A se observan los axones y somas de las neuronas presentes en el cultivo, marcados por MAP1B y en 6B se observa la arquitectura somato-dendrítica de estas neuronas. En los tratamientos posteriores, se eligió marcar con el anticuerpo anti- β -3 tubulina, ya que marcó claramente la morfología de todo el árbol neurítico de las neuronas presentes en estos cultivos.

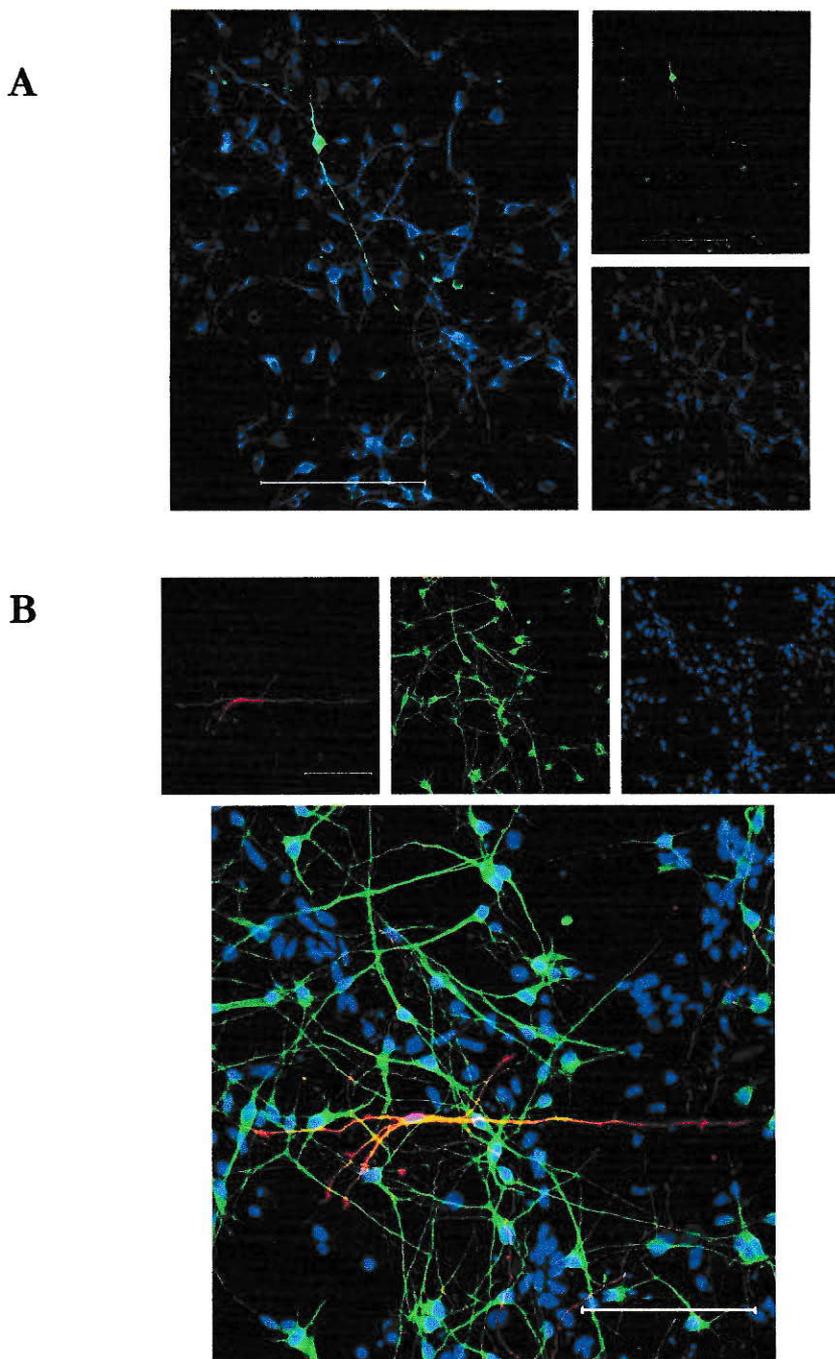
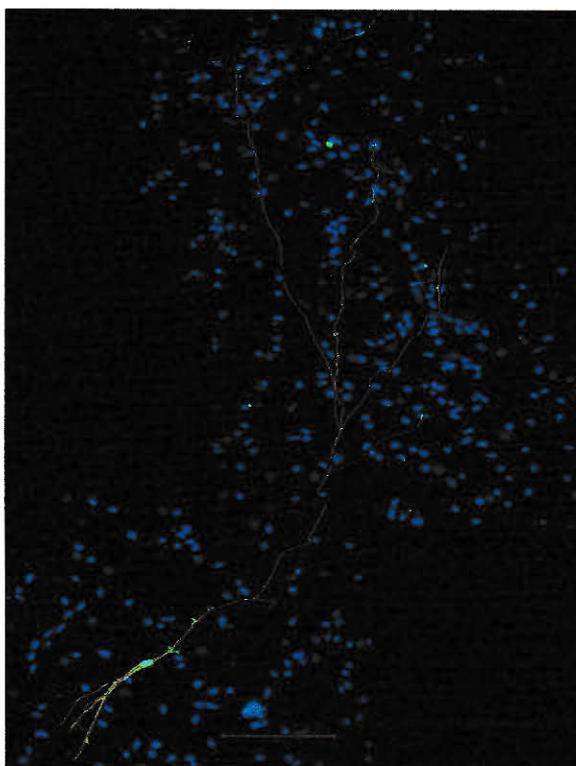


Figura 6: Inmunocitoquímica contra MAP1B y MAP 2 en cultivos primario de mesencéfalo de rata de 8 DIV. En (A) se observan los axones y somas del cultivo primario marcado con MAP1B (marca azul) y una neurona dopaminérgica (TH positiva, verde). En (B) se observa a las dendritas del cultivo marcado con MAP2 (marca verde) y una neurona dopaminérgica (TH positiva, roja). Los núcleos en B están marcados con TOPRO (azul). Barra = 100 μ m.

5.2. Caracterización y determinación temporal de los cambios morfométricos en neuronas tratadas con MPP+ sobre la degeneración del árbol neurítico.

La determinación del largo total promedio de las neuritas (longitud neurítica total) de las neuronas dopaminérgicas de 7 DIV en condiciones control, es decir con aproximadamente $7\mu\text{M}$ Fe en el medio, fue de $1945 \pm 88\mu\text{m}$ y área de sus somas igual a $122 \pm 4\mu\text{m}^2$. Un ejemplo de estas determinaciones se muestra en la Fig. 7.



Prolongaciones primarias	Prolongaciones secundarias	Prolongaciones terciarias	Area soma
1012.56	22.89		112.13 μm^2 .
	116.16		
	250.13		
	378.05		
127.81	84.34		
	58.18	21.81	
		12.08	
1140.37 μm .	909.75 μm .	33.89 μm .	Largo total: 2084.01 μm .

Figura 7: Medición de largo total de los procesos de neuronas dopaminérgicas mediante el software LSM5 image browser. En la figura se aprecia una medición del largo de las prolongaciones de una neurona TH-positiva (verde) y su cuantificación mediante el trazado de líneas (rojo) y el programa LSM ImageBrowser. Barra = $100\mu\text{m}$.

Tratamientos con MPP+ por 24 horas afectaron significativamente la longitud neurítica total de manera dosis-dependiente. Como se observa en la Figura, la adición al cultivo de MPP+ 8, 0,1, 1, 2,5, 5, 10 y 20 μ M por 24h indujo un drástico acortamiento de las neuritas hasta un mínimo de $315 \pm 23\mu$ m, valor observado en las neuronas remanentes que fueron sometidas a las concentraciones mayores de MPP+.

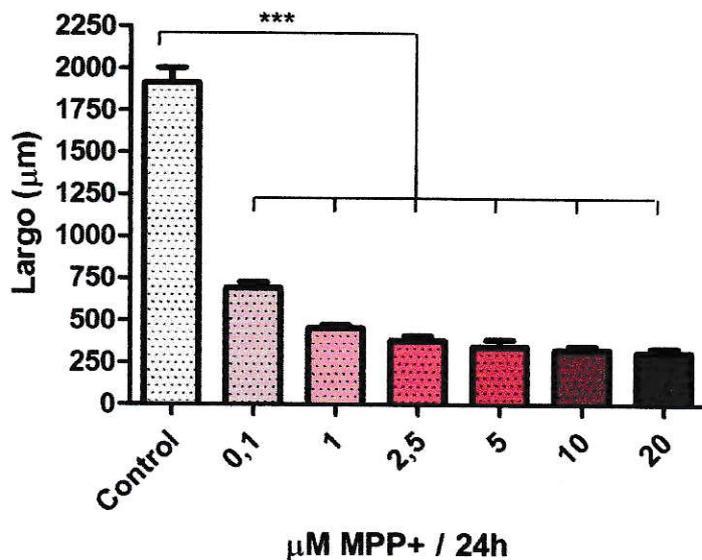


Figura 8: Longitud neurítica promedio de neuronas tratadas con distintas concentraciones de MPP+. En el gráfico se observa que tratamientos con MPP+ por 24h acortaron significativamente el largo de las prolongaciones. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, $p < 0,001$ determinados por test ANOVA.

Se ha descrito en la literatura el uso de concentraciones hasta MPP+ 1 μ M en estos cultivos [48], concentración que ya produce un efecto máximo de acortamiento del árbol neurítico en nuestro sistema de estudio. Debido a la necesidad de tener condiciones de efecto sub-máximo para estudiar el efecto aditivo de otros factores sobre el deterioro del árbol

neurítico, nos enfocamos en caracterizar la degeneración producidas por MPP+ 0,1 y 1 μ M en incubaciones por 12 y 24h.

MPP+ 0,1 μ M indujo un acortamiento de las neuritas que fue función del tiempo de incubación (Figura 9). A las 12 horas de tratamiento el largo promedio de las neuritas disminuyó un 50%, alcanzando un largo promedio de $967 \pm 52\mu\text{m}$, mientras que a las 24h las neuritas se acortaron un 64.4% llegando a medir $692 \pm 35\mu\text{m}$. Como control de respuesta se muestran los resultados de tratamiento en cultivos paralelos con MPP+ 1 μ M, en donde se observó que esta mayor concentración induce un efecto más severo sobre la longitud de las neuritas. Es de notar el efecto a las 12 horas, con una reducción del 74.6% ($494 \pm 17\mu\text{m}$) en el largo total del árbol neurítico.

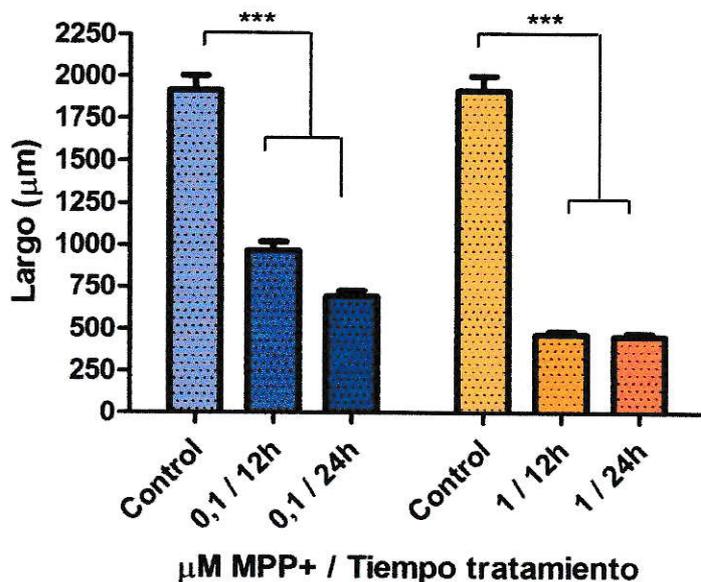


Figura 9: Longitud neurítica promedio de neuronas tratadas con MPP+ 0,1 y 1 μ M. En el gráfico se observa que MPP+ 0,1 μ M acorta paulatinamente las prolongaciones de las neuronas dopaminérgicas, acortando aproximadamente un 50% el largo de estas prolongaciones a las 12h de tratamiento. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, p<0,001 determinados por test ANOVA.

En la Figura 10, se aprecia la diferencia morfológica que existe entre una neurona control de 8 DIV y una neurona que fue tratada con MPP+ 0,1 μ M por 24h. Se puede apreciar claramente como la neurona control presenta numerosas ramificaciones y un gran árbol neurítico, alcanzando un largo total promedio de $1915 \pm 88\mu\text{m}$. Al contrario, en la neurona tratada con MPP+ 0,1 μ M se observa una evidente degeneración neurítica caracterizada por el acortamiento de las neuritas y la carencia de ramificaciones.

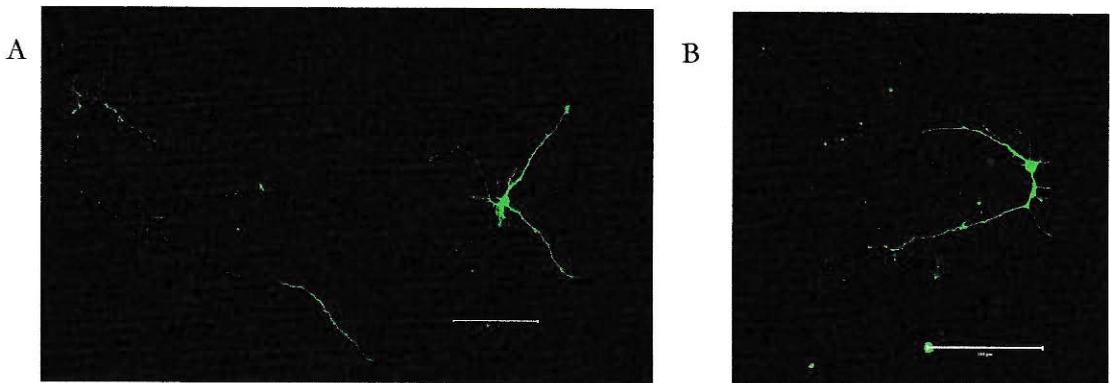


Figura 10: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con MPP+ 0,1 μ M. En la figura se observa una neurona control (A) que presenta numerosas neuritas cuya longitud neurítica total correspondió a un largo total de $1915 \mu\text{m}$, a diferencia de la neurona tratada con la neurotoxina MPP+ cuyo largo total alcanzó $564 \mu\text{m}$. Marca verde: Tirosina Hidroxilasa. Barra = $100\mu\text{m}$.

Ya que MPP+ 0,1 μ M indujo un acortamiento sub-máximo en del árbol neurítico, se usó esta concentración para tratamientos posteriores en los cuales se evaluó el efecto aditivo de hierro y de estrés oxidativo.

5.3. Relación entre la degeneración neurítica inducida por MPP+ y una oferta aumentada de hierro

Inicialmente se determinó el rango de concentraciones de hierro adecuado para realizar los tratamientos posteriores en los que se estudió el efecto combinado de MPP+ y de hierro. Para obtener un medio bajo en hierro fue necesaria la quelación de este metal del suero fetal bovino (SFB) a través de la resina CHELEX-100. Esta es una resina que es capaz de unirse con alta afinidad a diferentes metales de transición, entre ellos el hierro. Luego del tratamiento con Chelex-100 al suero, fue necesario agregar otros metales que la resina queló, como Zn, Cu y Mn. El medio de cultivo DMEM-F12 con 5% de suero bajo en hierro quedó finalmente con una concentración cercana a $2\mu\text{M}$ de Fe. Se definió esta concentración como la condición de tratamiento de bajo hierro. Además se estudió el efecto sobre el árbol neurítico de concentraciones de hierro sobre el contenido estándar del medio de cultivo. Para esto, los cultivos de 7 DIV se incubaron por 24h en condiciones control ($7\mu\text{M}$ de Fe) y con concentraciones de Fe 2, 40 y $80\mu\text{M}$ en el medio de cultivo (Figura 11).

En la Figura 11 se observa que las neuronas tratadas por 24 horas con un medio bajo en Fe ($2\mu\text{M}$) no cambiaron significativamente el largo total de sus neuritas, mientras que al ser tratadas con Fe $40\mu\text{M}$, las longitud de las neuritas se redujo en un 14,6% en comparación con las neuronas cultivadas en medio control. Esta reducción no fue significativa en el sistema experimental utilizado. En contraste, el tratamiento con Fe $80\mu\text{M}$ por 24h indujo un acortamiento del 50,3% del largo total de estas neuronas. De esta manera, se tomó la concentración Fe $40\mu\text{M}$ para los tratamientos posteriores con alta concentración de hierro.

A diferencia del acortamiento encontrado en el árbol neurítico, el área promedio de las somas de estas neuronas no sufrió cambios significativos en los tratamientos con las distintas concentraciones de hierro, teniendo un valor promedio de aproximadamente $120\mu\text{m}^2$ (Figura 12).

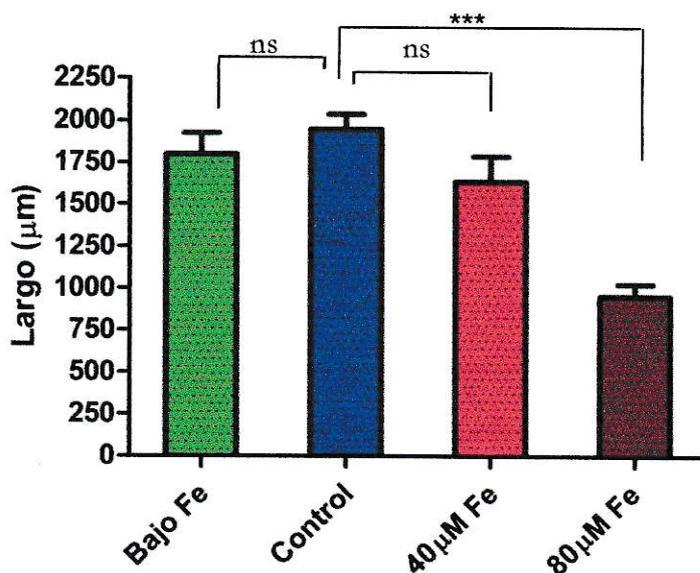


Figura 11: Longitud promedio de las neuritas de neuronas tratadas con distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observa la longitud neurítica total promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a distintas concentraciones de hierro por 24h. Tanto en condiciones de bajo hierro como las condiciones de Fe 40uM no presentaron cambios significativos en el largo de las prolongaciones en comparación a las neuronas control, a diferencia del tratamiento Fe 80uM por 24h. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, $p < 0,001$; ns, no significativo. Determinados por test ANOVA.

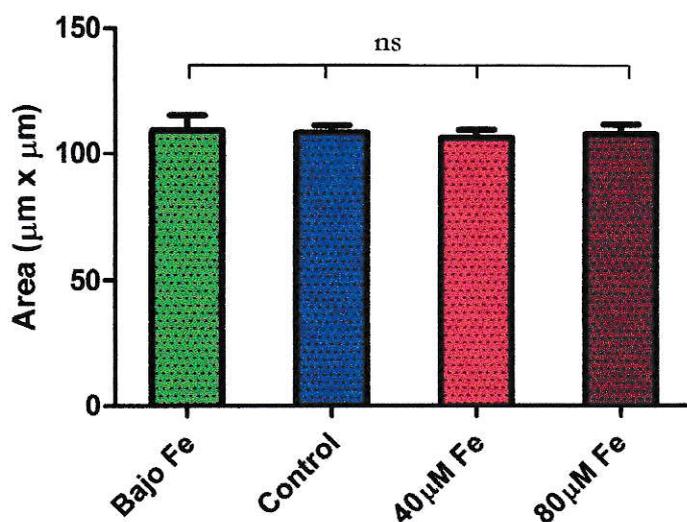


Figura 12: Área promedio de los somas de neuronas tratadas con distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observa las áreas promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a distintas concentraciones de hierro por 24h. No se observan diferencias significativas en los distintos tratamientos en las áreas de los somas. Los datos representan el promedio \pm SEM, $n=10$. ns, no significativo determinados por test ANOVA.

5.3.1. Efecto de MPP+ 0,1μM en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro en el tiempo.

Dos factores co-existentes en la enfermedad de Parkinson son una disfunción del complejo I mitocondrial y un elevado contenido de hierro en las neuronas de la SNpc. Por esto, determinamos si la suma de ambos factores tiene un efecto aditivo en el acortamiento del árbol neurítico. Para esto, se incubaron cultivos primarios de 7 DIV por distintos tiempos con MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro: bajo (2μM), alto (40μM) y se compararon con el tratamiento control (7μM).

En la Figura 13 se observa el efecto sobre el largo total del árbol neurítico de neuronas dopaminérgicas en el tiempo, bajo 4 condiciones: control y con MPP+ 0,1μM y Fe 2; 7 y

40 μ M. Las neuronas tratadas con MPP+ 0,1 μ M en condiciones controles de Fe tuvieron un acortamiento progresivo de sus neuritas en el tiempo, acortándose aproximadamente 700 μ m en las primeras 2 horas de tratamiento, disminuyendo la tasa de acortamiento en las horas siguientes. Tratamientos con MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M indujeron un acortamiento más drástico y en tiempos más cortos. A las primeras 2 horas de tratamiento, las neuronas se acortaron aproximadamente 950 μ m y se siguieron acortando en las próximas 22 horas, siempre con las prolongaciones más cortas que las controles (MPP+ 0,1 μ M y Fe 7 μ M).

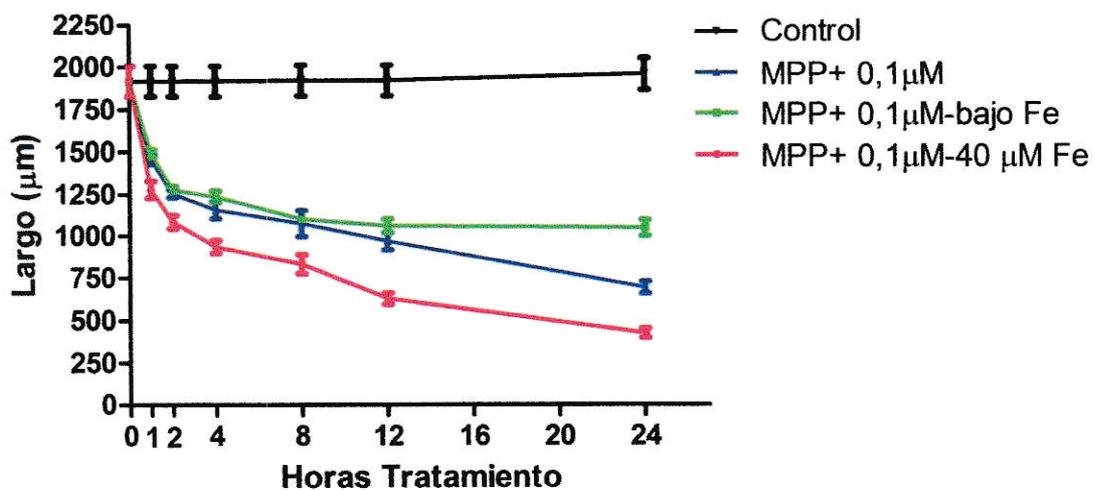


Figura 13: Cinética de la disminución de la longitud neurítica total en neuronas tratadas con MPP+ 0,1 μ M y distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observa los largos promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a MPP+ 0,1 μ M y a distintas concentraciones de hierro por distintos tiempos. Al incubar las células con MPP+ y Fe 40 μ M se observa una mayor degeneración de las prolongaciones que la condición con MPP+ 0,1 μ M y Fe 7 μ M (control) o 2 μ M, a partir de las 2 horas de incubación. Al tratar con MPP+ y Fe 2 μ M, la degeneración fue significativamente menor que los otros dos tratamientos, notándose desde las 12 horas de tratamiento. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10.

Tratamientos con MPP+ en condiciones de bajo hierro acortaron a las prolongaciones neuronales de manera similar a las neuronas controles tratadas con esta neurotoxina en las

primeras horas de tratamiento. Lo interesante es que a partir de las 12 horas de tratamiento, el acortamiento del árbol neurítico de estas neuronas se detuvo, manteniéndose un largo promedio aproximado de $1056 \pm 47\mu\text{m}$ hasta las 24 horas.

Tratamientos de MPP+ $0,1\mu\text{M}$ por 24 horas (Figura 14) generaron un acortamiento de las prolongaciones en un 65.1% (largo total = $692 \pm 35\mu\text{m}$). Cuando además las neuronas se expusieron a condiciones de Fe $40\mu\text{M}$, se produjo un acortamiento de un 79% (largo total = $422 \pm 25\mu\text{m}$) en relación a las neuronas controles sin tratamiento. Al tratar estas neuronas con MPP+ en un medio bajo en hierro se observó una reducción significativa de la degeneración neurítica producida por la neurotoxina, acortándose sólo un 44.3% (largo total = $1082 \pm 77\mu\text{m}$) en comparación a la condición control sin tratamiento.

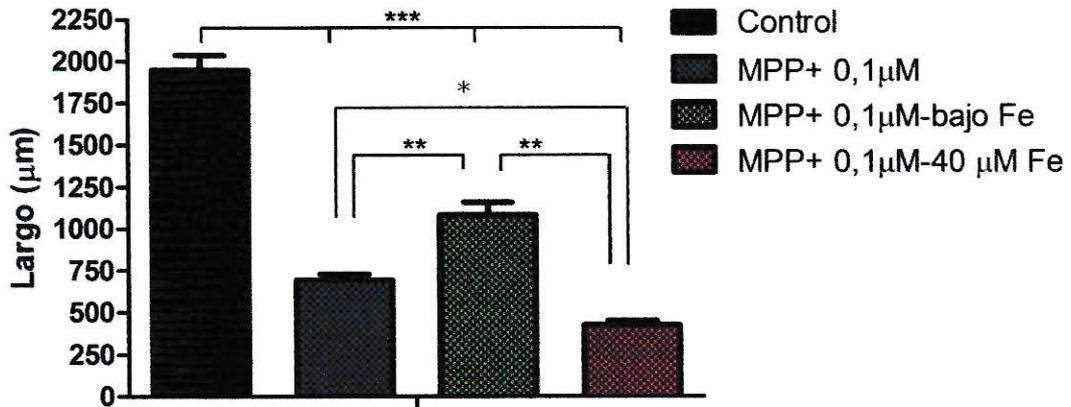


Figura 14: longitud neurítica total de neuronas tratadas con MPP+ $0,1\mu\text{M}$ por 24h y distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observa los largos promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a MPP+ $0,1\mu\text{M}$ y a distintas concentraciones de hierro por 24h. Al incubar las células con MPP y altas concentraciones de Fe se observó una mayor degeneración de las prolongaciones que la condición con MPP+ control (Fe $7\mu\text{M}$). Al tratar con MPP+ y bajo hierro, la degeneración fue significativamente menor que los otros dos tratamientos. Los datos representan el promedio \pm SEM, $n=10$. ***, $p<0,001$; **, $p<0,01$; *, $p<0,05$; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

5.3.2. Efecto de MPP+ 1 μ M en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro en el tiempo.

Se estudió posteriormente el efecto de hierro bajo condiciones de una putativa mayor inhibición del complejo I mitocondrial, condiciones que podrían emular etapas tardías de la enfermedad. Para esto, se incubaron los cultivos primarios por distintos tiempos con MPP+ 1 μ M y distintas concentraciones de hierro: bajo (2 μ M), control (7 μ M) y alto (40 μ M). En la Figura 15 se observa la degeneración neurítica de las neuronas dopaminérgicas en el tiempo. Tratamientos con MPP+ 1 μ M y Fe 7 μ M (control) y MPP+ 1 μ M y Fe 40 μ M acortaron drásticamente las prolongaciones de estas neuronas en las primeras horas de tratamiento respecto a las neuronas no tratadas. A las 12 horas de cultivo, las neuronas tratadas con MPP+ 1 μ M y Fe 7 μ M disminuyeron en un 74,6% el largo total del árbol neurítico ($494 \pm 17\mu\text{m}$), en tanto que las neuronas tratadas con MPP+ 1 μ M y Fe 40 μ M perdieron un 79,1% del largo total ($407 \pm 42\mu\text{m}$).

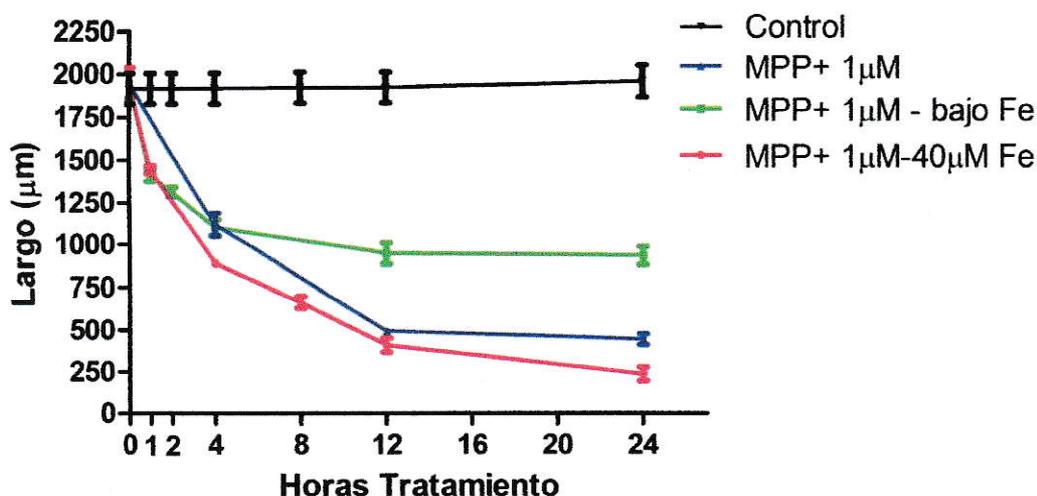


Figura 15: Cinética de la disminución de la longitud neurítica total en neuronas tratadas con MPP+ 1µM y distintas concentraciones de hierro. El gráfico muestra los largos promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a MPP+ 1µM y a distintas concentraciones de hierro por distintos tiempos. Al incubar las células con MPP+ y altas concentraciones de Fe se observó un gran acortamiento de las prolongaciones en el tiempo tanto en la condición control (MPP+ 1µM y Fe 7µM) como en la condición alto hierro (MPP+ 1µM y Fe 40µM). Lo interesante es que al tratar con MPP+ y bajo hierro, la degeneración fue significativamente menor que los otros dos tratamientos, notándose claramente desde las 12 horas de tratamiento. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10.

Tratamientos de MPP+ 1µM por 24 horas generaron un acortamiento aun mayor de las prolongaciones de estas neuronas (Figura 16), un 77,2% (largo total = $444 \pm 32\mu\text{m}$) y cuando además se expusieron las neuronas a condiciones de alto hierro se produjo un acortamiento mayor de un 87,8% (largo total = $236 \pm 40\mu\text{m}$) en las prolongaciones de estas neuronas dopaminérgicas en comparación a las neuronas controles sin tratamiento.

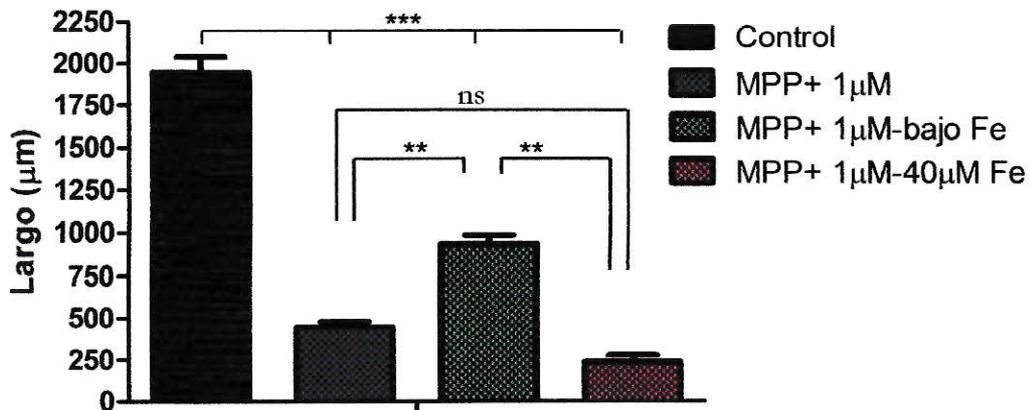


Figura 16: Longitud neurítica total media de las neuronas tratadas con MPP+ 1µM por 24h y distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observa los largos promedio de neuronas dopaminérgicas sometidas a MPP+ 1µM y a distintas concentraciones de hierro por 24h. Al incubar las células con MPP y altas concentraciones de Fe se observó una mayor degeneración de las prolongaciones que la condición con MPP+ control (Fe 7µ M). Al tratar con MPP+ y bajo hierro, la degeneración fue significativamente menor que los otros dos tratamientos. Los datos representan el promedio ± SEM, n=10. ***, p<0,001; **, p<0,01; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

Al tratar estas neuronas con MPP+ 1µM en un medio bajo en hierro, se observó nuevamente una disminución significativa de la degeneración neurítica producida por esta neurotoxina, acortándose sólo un 51,7% en comparación a la condición control teniendo estas neuronas un largo total promedio de $934 \pm 52\mu\text{m}$.

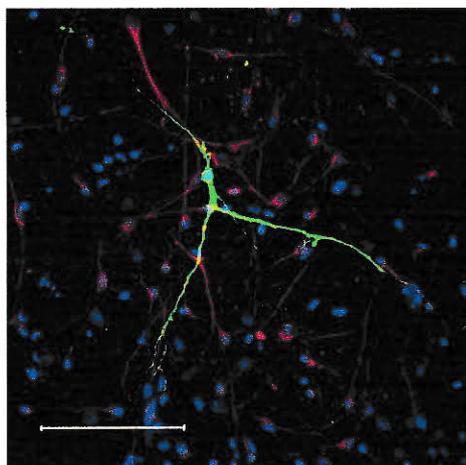
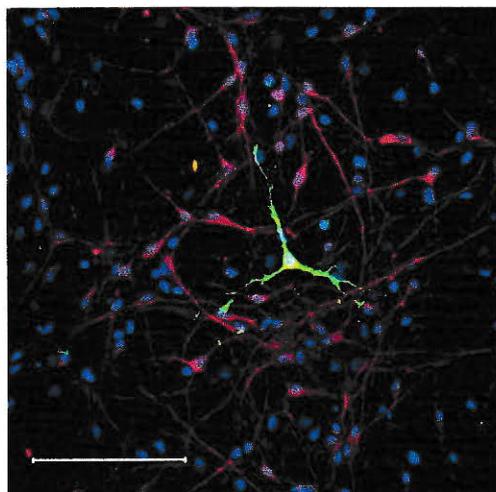
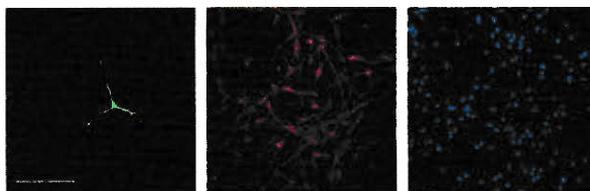
A**B**

Figura 17: Comparación entre una neurona dopaminérgica control y una tratada por 24h con MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M. Recuadros superiores en A y B, verde: TH, rojo: β -3 tubulina, azul; TO-PRO3. Los recuadros inferiores muestran la fusión de las tres marcas. Se observa que una neurona sin tratar (A) presenta numerosas prolongaciones alcanzando un largo total promedio de $1946 \pm 88\mu\text{m}$, a diferencia de la neurona tratada con MPP+ y Fe 40 μ M (B), cuyo largo total promedio alcanzó $423 \pm 25\mu\text{m}$. Barra de calibración = 100 μm .

Por último, en la Figura 17 se compara una neurona dopaminérgica control de 8 DIV con una tratada con MPP+ 1 μ M y Fe 40 μ M. Se observa que, a diferencia de la neurona control, el tratamiento con MPP+ y Fe acortó marcadamente las prolongaciones. Un punto a destacar es que las neuronas TH-negativas presentes en el cultivo primario, marcadas por el anticuerpo anti- β -3 tubulina, no se vieron afectadas con los tratamientos con MPP+ más Fe, lo que indica la especificidad de MPP+ para afectar las neuronas TH-positivas.

5.4. Determinación del rol de los niveles de estrés oxidativo celular sobre la degeneración del árbol neurítico.

5.4.1. Efecto de N-acetil-cisteína (NAC) en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+.

5.4.1.1. Determinación de concentración óptima de N-acetil cisteína (NAC).

Dos aspectos importantes de la neurodegeneración observada en la enfermedad de Parkinson son la inhibición del complejo I mitocondrial y una excesiva acumulación de hierro. Ambos eventos tienen un denominador común: producen un aumento del estrés oxidativo. Por esta razón, fue de interés conocer si los efectos de MPP+ y de hierro sobre el largo del árbol neurítico tienen un componente oxidativo. Para esto, se evaluó el posible efecto protector del antioxidante NAC. NAC, es una excelente fuente de sulfhidrilos y de cisteína para la síntesis de glutatión[60]. Para determinar la concentración de NAC a usar en experimentos posteriores, se incubaron los cultivos primarios por 24h con distintas

concentraciones de NAC y de hierro, después de lo cual se midió la longitud neurítica total y área de los somas de las neuronas TH-positivas.

Como se observa en la Figura 18, NAC no indujo cambios significativos en el largo del árbol neurítica a concentraciones de 0,5 y 1mM en las tres concentraciones de hierro probadas. A concentración de NAC 5mM indujo un acortamiento significativo de las prolongaciones: con Fe 7 μ M 27,3 % (P<0,01 comparado con control) (Figura 18A); con Fe 40 μ M 30,7% (P<0,001 respecto a control) (Figura 18B) y con Fe 2 μ M 24,4% (P<0,01 respecto a control) (Figura 18C). Se ha descrito que NAC 6mM produce una significativa disminución en la viabilidad de un modelo dopaminérgico derivado de células precursoras mesencefálicas[65]. Este daño inducido causado por un exceso del antioxidante NAC podría ser debido a un “stress reductor” en las neuronas, el cual se traduce en un aumento en el poder reductor [66]. No hubo diferencias significativas en las áreas de los somas de estas neuronas en estos tratamientos (Figuras 18A, 18B y 18C, paneles a la derecha).

Por lo tanto, ya que NAC 0,5mM no afecto la longitud neurítica total de las neuronas tratadas con las distintas concentraciones de hierro, se tomo esta concentración para tratamientos posteriores.

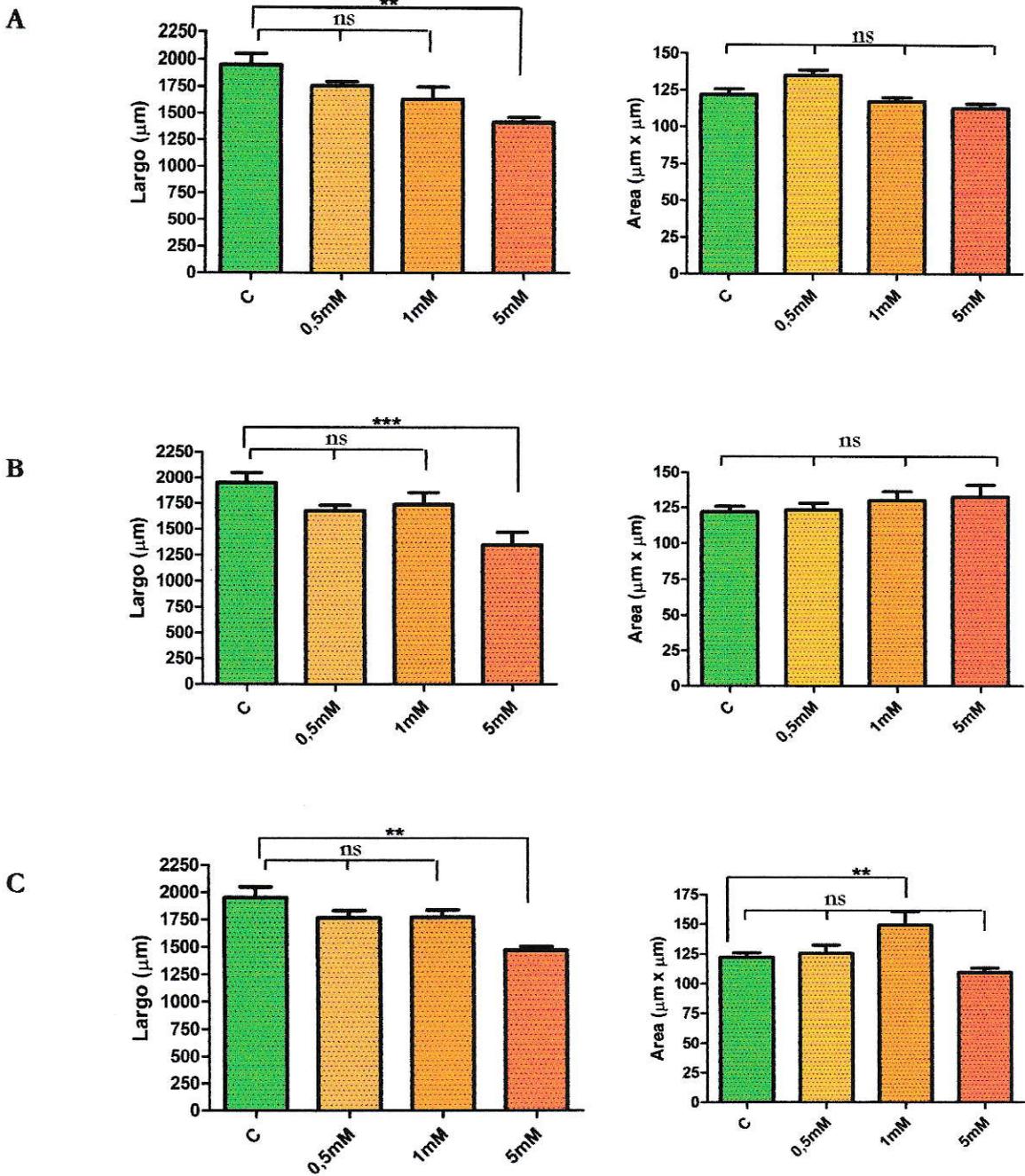


Figura 18: Longitud neurítica total y área de somas de las neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de NAC y en distintas concentraciones de hierro. En el gráfico se observan los largos totales y áreas de neuronas tratadas con NAC 0,5, 1 y 5mM en condiciones de hierro 7µM (A), 40µM (B) y 2µM (C). Los paneles a la izquierda muestran el largo total del árbol dendrítico como función de la concentración de NAC; los paneles a la derecha muestran el área promedio del soma para similares condiciones. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, p<0,001; **, p<0,01; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

5.4.1.2. Efecto de NAC 0,5mM en neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+ 0,1μM por 24h.

Como se mencionó anteriormente, un signo patognomónico de la enfermedad de Parkinson es un elevado estrés oxidativo en las neuronas de la SNpc[49]. Ya que tanto el tratamiento con MPP+ como con hierro producen un aumento del tono oxidativo [49], determinamos el efecto del antioxidante NAC en el proceso degenerativo inducido por MPP+ y hierro. Para esto, se incubaron los cultivos primarios por 24h con MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro en la ausencia o presencia de NAC 0,5mM (Figura 19).

Interesantemente, NAC tuvo un efecto protector significativo sobre el acortamiento de las neuritas en las neuronas tratadas con MPP+ 0,1μM. En comparación al largo promedio de las neuronas controles sin tratamiento, el tratamiento con NAC + MPP+ solo acortó las prolongaciones un 20,9% (largo total = $1538 \pm 59\mu\text{m}$), a diferencia del tratamiento solo con MPP+, que produjo un acortamiento de un 65,1% en comparación a la situación control sin tratamiento (Figura 19). Tratamientos con MPP+ 0,1μM y Fe 40μM indujeron un acortamiento más severo de las neuritas: 77,2% en comparación al control no tratado. Sin embargo, co-incubaciones con NAC 0,5mM revirtieron el acortamiento de las neuritas acortándose a las 24 horas de tratamiento sólo un 22,2% (largo total = $1513 \pm 102\mu\text{m}$) respecto al control no tratado.

En condiciones de MPP+ 0,1μM y Fe 2μM, se produjo un menor acortamiento del árbol neurítico que en las neuronas tratadas con MPP+ 0,1μM o MPP+ 0,1μM más Fe 40μM. Al agregar NAC 0,5mM a los cultivos, en todas las condiciones anteriormente mencionadas

hubo una disminución significativa del acortamiento de las prolongaciones neuronales en comparación a las condiciones sin NAC. MPP+ en condiciones de bajo hierro acortó las neuritas un 44,3% en relación valor estimado para las neuronas controles sin tratamiento. Al agregar NAC a este tratamiento por 24h las prolongaciones se acortaron en un no significativo 6,03% respecto a la situación control (largo total = $1828 \pm 66\mu\text{m}$) (Figura 19).

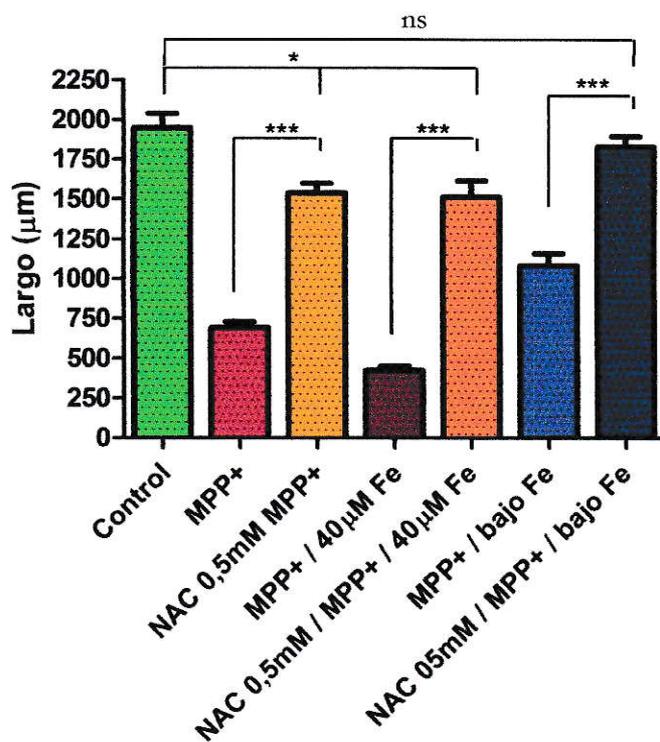


Figura 19: Longitud neurítica total promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con NAC 0,5mM y MPP+ 0,1μM y con distintas concentraciones de hierro por 24h. En el gráfico se observan los largos totales de neuronas tratadas con NAC 0,5mM, MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro por 24h. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

Con respecto al área de los somas de estas neuronas, se observó que no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos realizados (Figura 20). Este resultado nuevamente indica que las prolongaciones neuronales son sitios de mayor sensibilidad al estrés oxidativo respecto de los somas neuronales.

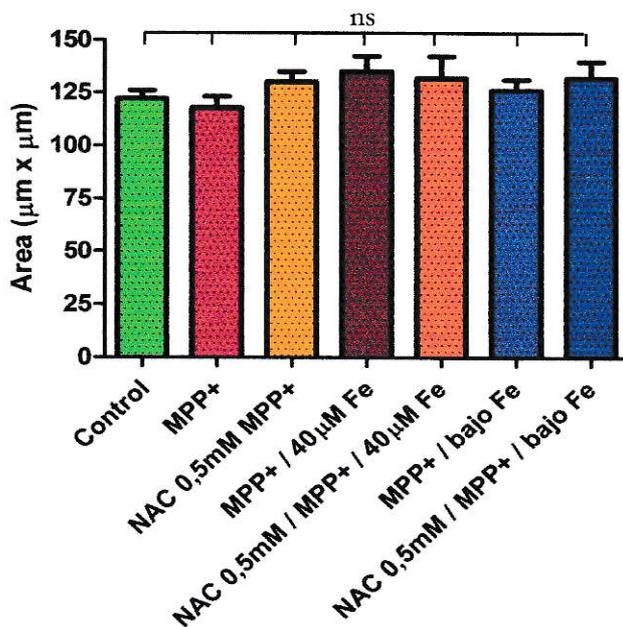


Figura 20: Área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con NAC 0,5mM y MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro por 24h. En el gráfico se observan las áreas de neuronas tratadas con NAC 0,5mM, MPP+ 0,1μM y distintas concentraciones de hierro por 24h en condiciones controles. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ns, no significativo determinados por test ANOVA.

Como se observa en la inmunocitoquímica de cultivo primario de mesencéfalo de la Figura 21, tratamientos con NAC en condiciones de alto hierro y en presencia de MPP+ por 24h mantuvieron la morfología de las neuronas tratadas similar a las neuronas controles sin tratamiento, protegiendo del acortamiento del árbol neurítico producido por MPP+ y Fe.

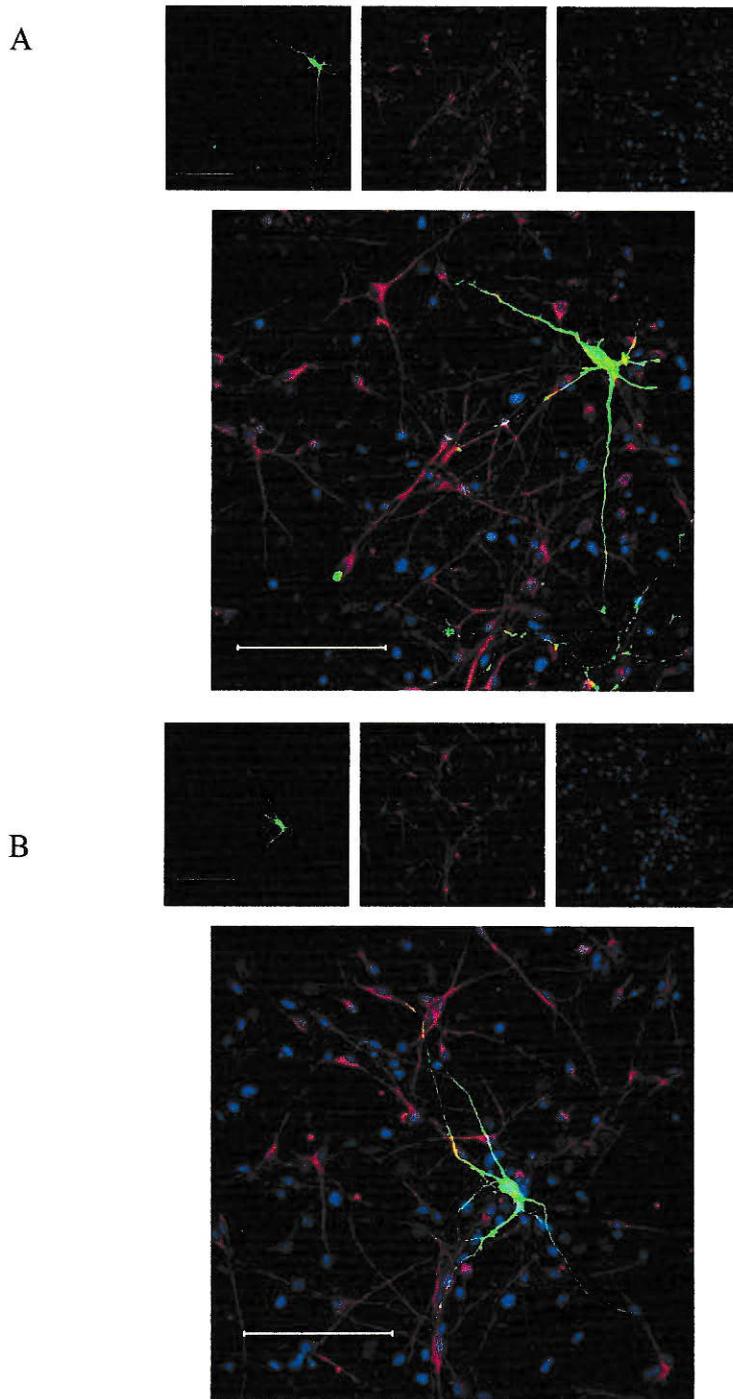


Figura 21: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con NAC 0,5mM, MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M por 24h. Recuadros superiores en A y B, verde: TH, rojo: β -3 tubulina, azul; TO-PRO3. Los recuadros inferiores muestran la fusión de las tres marcas. Se observa que una neurona sin tratar (A) presenta numerosas prolongaciones alcanzando un largo total aproximado de 1945 μ m, en la Figura B se observa una neurona tratada con NAC 0,5mM, MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M por 24h. La morfología de esta célula es similar a la neurona control y tiene un largo de 1513 μ m. Barra de calibración = 100 μ m.

5.4.2. Efecto de DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) en el largo de las neuritas de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+ en el tiempo.

5.4.2.1. Determinación de concentración mínima efectiva de BSO

A continuación se analizó el efecto que tiene sobre el largo de las neuritas de las neuronas dopaminérgicas la inhibición de la síntesis de GSH. Para esto se utilizó el inhibidor de la enzima γ -glutamylcisteína sintetasa, DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), el que induce una disminución en los niveles celulares de GSH y su aplicación es considerado un buen modelo experimental de deficiencia de GSH[50].

Para determinar la concentración mínima efectiva de BSO que no produzca disminución de la viabilidad celular, se incubaron los cultivos primarios de mesencéfalo de rata por 7 DIV con BSO 0, 10, 50, 100 y 150 μ M por 24h y se cuantificó la longitud neurítica total y área de los somas de las neuronas dopaminérgicas. Como se observa en la Figura 22, incubaciones con BSO por 24h en estos cultivos primarios generaron un acortamiento concentración-dependiente del largo promedio de las prolongaciones de las neuronas dopaminérgicas. Tratamientos por 24h con BSO 10 μ M y 50 μ M no produjeron cambios significativos en el largo total de las prolongaciones en comparación al tratamiento control sin BSO. Concentraciones mayores de BSO, 100 y 150 μ M BSO, indujeron un acortamiento significativos de 51,5% y 66,6% en comparación al largo promedio medido en las neuronas controles (largo total = 944 \pm 78 μ m y 650 \pm 44 μ m, respectivamente).

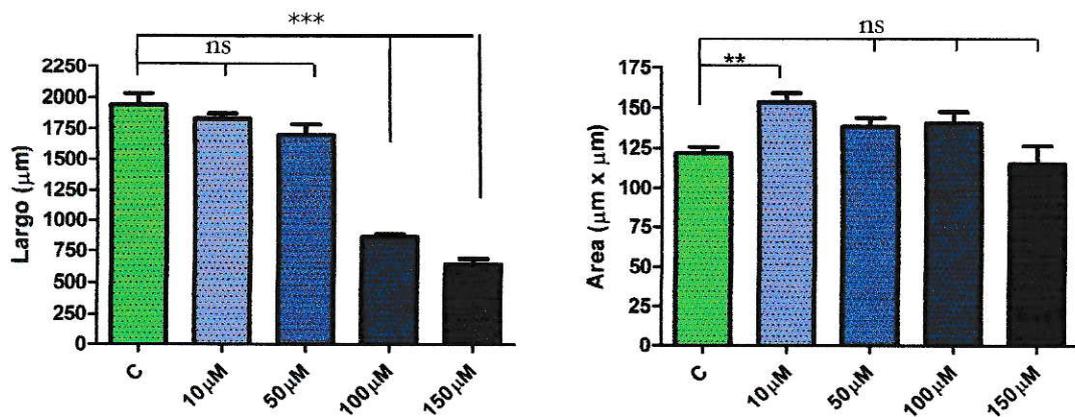


Figura 22: Longitud neurítica total y área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de BSO. En el gráfico se observan los largos totales y áreas de neuronas tratadas con BSO 10, 50, 100 y 150 μM en condiciones control. Los datos representan el promedio ± SEM, n=10. ***, p<0,001; **, p<0,01; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

El área de los somas de estas neuronas no presentaron diferencias significativas excepto la condición BSO 10 μM, donde se vio un aumento de un 25% (área total: $153 \pm 15 \mu\text{m}^2$) en el área de los somas medidos, comparados con la condición control (área total: $122 \pm 20 \mu\text{m}^2$).

Ya que BSO 50 μM no acortó las prolongaciones significativamente en relación al largo de las neuronas controles, se consideró esta concentración como adecuada para tratamientos posteriores en conjunto con MPP+ y hierro.

5.4.2.2. Efecto de BSO 50 μM en neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro por 24h.

Para evaluar el efecto de la disminución de reservas antioxidantes en la degeneración neurítica inducida por MPP+ y hierro, se incubaron los cultivos primarios de mesencéfalo de rata por 7 DIV con BSO 50 μM en conjunto con distintas condiciones de hierro por 24h, se cuantifico la longitud neurítica total y el área de los somas de neuronas TH-positivas

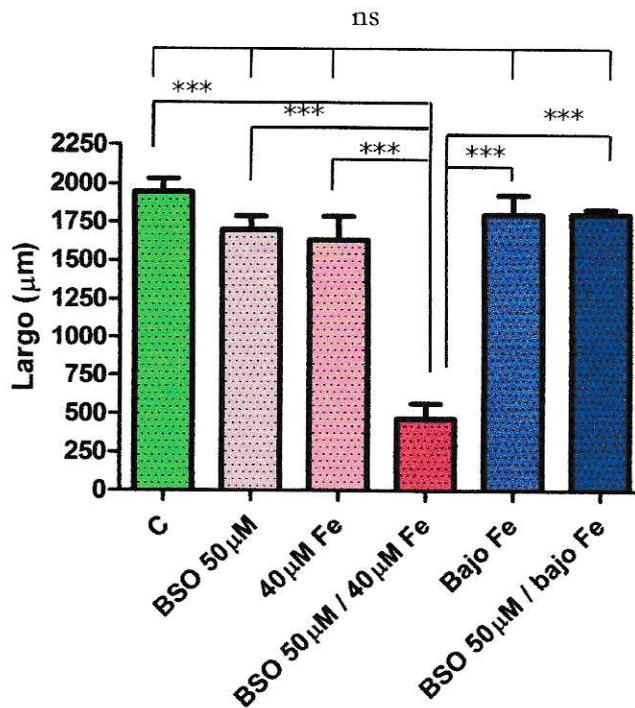


Figura 23: Longitud neurítica total de las neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50µM y distintas condiciones de hierro por 24h. En el gráfico se reportan los largos totales de neuronas tratadas con hierro 2µM (bajo Fe) y 40µM en la ausencia o presencia de BSO 50µM. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, $p < 0,001$; determinados por test ANOVA.

Como se observa en la Figura 23, tratamientos por 24h con BSO 50µM acortaron un 12,6% (largo total = $1700 \pm 87\mu\text{m}$) el largo de las neuritas en comparación a la situación control (Fe 7µM, sin adiciones). Al co-incubar estos cultivos con Fe 40µM ocurrió un drástico y significativo acortamiento de las neuritas de las neuronas tratadas. El largo total promedio disminuyó un 76% (largo total = $466 \pm 99\mu\text{m}$) en comparación al largo de neuronas control.

Interesantemente, en tratamientos con BSO 50 μ M en condiciones de bajo hierro el acortamiento del árbol neurítico fue sólo de un 7.5% en comparación al largo de neuronas controles, acortamiento no significativo comparado con el tratamiento sólo con BSO 50 μ M en condiciones control de hierro (7 μ M).

Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en las áreas del soma en respuesta a los diferentes tratamientos (Figura 24).

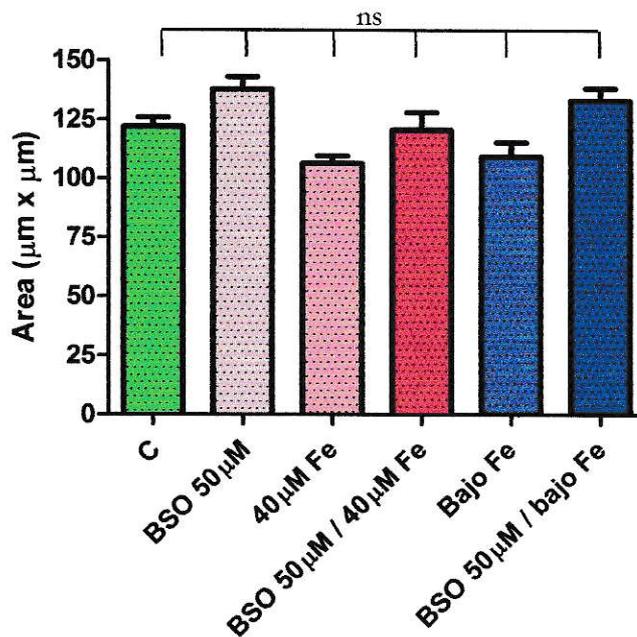


Figura 24: Área total promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50 μ M y distintas condiciones de hierro por 24h. En el gráfico se observan las áreas de neuronas tratadas con BSO 50 μ M en condiciones de hierro: bajo (2 μ M), alto (40 μ M) y se compararon con el tratamiento control (7 μ M), tratamiento con 40 μ M y bajo Fe. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ns, no significativo determinados por test ANOVA.

5.4.2.3. Efecto combinado de MPP+, hierro y la inhibición de la síntesis de GSH en la integridad de las neuronas TH-positivas

Se determinó el efecto combinado de la inhibición del complejo I mitocondrial (MPP+), niveles disminuidos de GSH (BSO) y variados niveles de hierro en el largo de las neuritas de estas neuronas. Para esto, se incubaron los cultivos primarios de mesencéfalo de rata por 7 DIV en condiciones control o con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y distintas concentraciones de hierro por 24h.

En la Figura 25 se observa el largo promedio y área de los somas de neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y distintas condiciones de hierro por 24h.

Las neuritas de las neuronas dopaminérgicas incubadas con BSO 50 μ M y MPP+ 0,1 μ M por 24h en condiciones controles de hierro se acortaron un 36.5% (largo total = 1234 \pm 104 μ m). Este acortamiento fue mayor al que sufrieron las neuronas con el tratamiento sólo con BSO 50 μ M (12,6%, ver Figura 23). La condición más tóxica fue con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M por 24 horas. Esta condición indujo la muerte tanto las neuronas dopaminérgicas como del resto de neuronas del cultivo (Figura 26).

Fue interesante constatar que en condiciones de bajo hierro las neuronas respondieron solo marginalmente al tratamiento con BSO y MPP+, el que acortó las prolongaciones de las neuronas en un 13,1% (largo total = 1690 \pm 52 μ m).

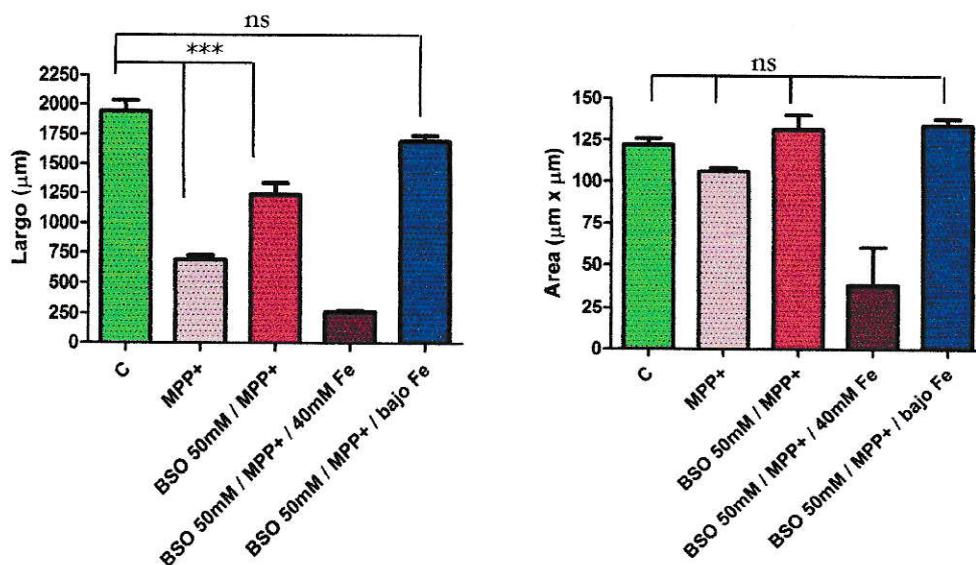


Figura 25: Longitud neurítica total y área promedio de neuronas dopaminérgicas tratadas con BSO 50µM, MPP+ 0,1µM y distintas condiciones de hierro por 24h. En el gráfico se observan los largos totales y áreas de neuronas tratadas con BSO 50µM y MPP+ 0,1µM en condiciones de hierro: bajo (2µM), alto (40µM) y se compararon con el tratamiento control (7µM) y con el tratamiento sólo con MPP+ 0,1µM. Los datos representan el promedio \pm SEM, n=10. ***, $p < 0,001$; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

El área de los somas en los tratamientos BSO 50µM, MPP+ 0,1µM en condiciones controles de hierro y BSO 50µM, MPP+ 0,1µM en condiciones de bajo hierro por 24h no variaron significativamente en relación al área de las neuronas control. En la Figura 26 se observa la inmunocitoquímica de una neurona TH-positiva control y una neurona tratada con BSO 50µM y Fe 40µM por 24h. Se observa claramente como el tratamiento de BSO y alto hierro afectó a todo el cultivo. No solo se acortó el árbol neurítico de las neuronas TH-positiva sino que también hubo muerte neuronal tanto de neuronas TH-positivas como β -3 tubulina-positivas.

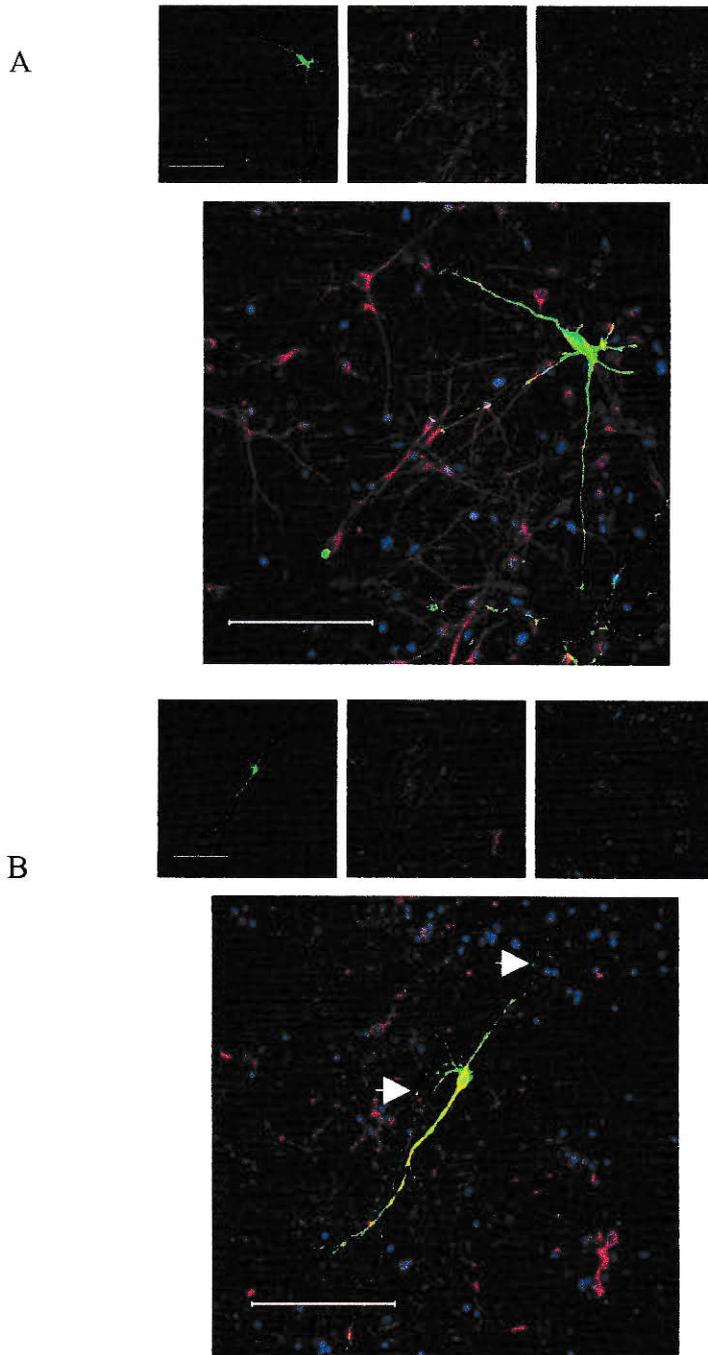


Figura 26: Comparación entre una neurona dopaminérgica control de 8 DIV y una tratada por 24h con BSO 50 μ M y Fe 40 μ M por 24h. Recuadros superiores en A y B, verde: TH, rojo: β -3 tubulina, azul; TO-PRO3. Los recuadros inferiores muestran la fusión de las tres marcas. Se observa una neurona control (A) con numerosas prolongaciones alcanzando cuyo largo neurítico es de $1945 \pm 88\mu\text{m}$, en la figura B se observa una neurona degenerada tratada con BSO 50 μ M y Fe 40 μ M por 24h, con un largo total promedio de $466 \pm 99\mu\text{m}$. Las flechas indican varicosidades. Las demás neuronas del cultivo también se ven afectadas por el tratamiento. Barra = 100 μm .

En las neuronas tratadas con BSO 50 μ M y Fe 40 μ M por 24h se observó un aumento en el número de varicosidades que hacen que las prolongaciones tuvieran un aspecto segmentado (Figura 26B, flechas blancas). Estas varicosidades son claros signos de neurodegeneración ocurrida las prolongaciones[51] y no sólo están presentes en la neurona dopaminérgica, sino que también en las demás neuronas del cultivo en este tratamiento. Este daño a las neuronas desapareció completamente cuando se trataron los cultivos en condiciones de bajo hierro (Figura 27B), donde BSO 50 μ M y MPP+ 0,1 μ M no indujeron un acortamiento significativo.

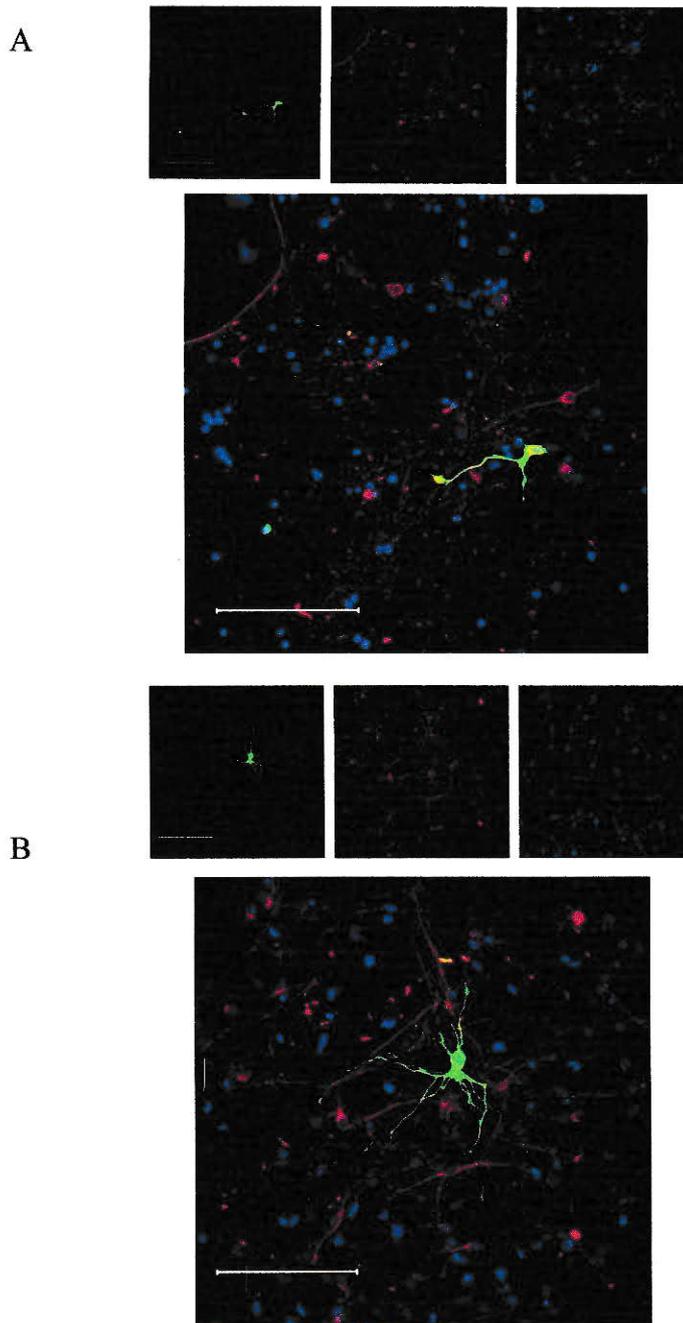


Figura 27: Comparación entre una neurona dopaminérgica tratada con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M y Fe 40 μ M por 24h y una tratada con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M en condiciones control y de bajo Fe por 24h. Recuadros superiores en A y B, verde: TH, rojo: β -3 tubulina, azul; TO-PRO3. Los recuadros inferiores muestran la fusión de las tres marcas. (A) Neurona dopaminérgica tratada con BSO 50 μ M, MPP+ 0,1 μ M en un medio con Fe 40 μ M. En (B) se observa una neurona tratada con BSO y MPP+, pero en condiciones de bajo (2 μ M) de hierro. Barra de calibración = 100 μ m.

6. DISCUSIÓN

En la presente tesis se determinó el efecto de MPP⁺ en el acortamiento de las neuritas en las neuronas TH-positivas y el efecto adicional inducido por hierro, la depleción de glutatión como elementos pro-oxidantes y el efecto de NAC como elemento antioxidante. Para esto se determinó la longitud neurítica total y área del soma de las neuronas dopaminérgicas de cultivos primarios de mesencéfalo de rata de 8 DIV tratados con distintas concentraciones de hierro, MPP⁺, NAC y BSO por distintos tiempos de incubación. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

Caracterización del cultivo primario de mesencéfalo, usando distintos marcadores moleculares.

Para marcar el cuerpo y las prolongaciones de las neuronas de cultivo primario de mesencéfalo, se probaron anticuerpos contra distintas proteínas de citoesqueleto neuronal. Para marcar las neuronas dopaminérgicas se usó el anticuerpo anti-TH. TH es la enzima que cataliza la conversión de tiroxina a dihidroxifenilalanina (DOPA), específica de neuronas dopaminérgicas. Una marcación general de neuronas se hizo con anticuerpos contra proteínas de citoesqueleto, MAP1B y MAP2, para visualizar axones y dendritas, respectivamente y β -3 tubulina, marcador general de neuronas. Las marcas con los anticuerpos MAP1B y MAP2, comparados con la marca de anti-TH no aportaron una mejor visualización de la neurona dopaminérgica, por lo que los cultivos tratados que se mostraron se marcaron con β -3 tubulina.

La caracterización del cultivo mixto de mesencéfalo de rata indicó aproximadamente el 1% de las células presentes corresponden a neuronas dopaminérgicas TH positivas. El rendimiento de neuronas dopaminérgicas obtenido en estos cultivos es similar a lo que se ha descrito [61]. El resto de las células de los cultivos primarios corresponderían a otros tipos neuronales β -3 tubulina-positivos, astrocitos (marcados por GFAP) y otros tipos celulares, posiblemente oligodendrocitos y microglías. Dentro de las neuronas no dopaminérgicas, β -3 tubulina-positivas podrían haber interneuronas y neuronas gabaérgicas [62].

Caracterización y determinación temporal de los cambios morfométricos en neuronas tratadas con MPP+ sobre la degeneración del árbol neurítico.

Para poder caracterizar la degeneración neurítica de estas neuronas dopaminérgicas, se determinó la concentración de MPP+ que produjo un acortamiento sub-máximo de las neuritas en las neuronas TH-positivas. Se observó que MPP+ 0,1 μ M produjo un acortamiento de las prolongaciones de aproximadamente un 50%, sin modificación aparente de los somas de neuronas TH-positivas o de las neuritas de las neuronas β -3 tubulina-positivas.

Los cambios morfológicos producidos por el tratamiento con MPP+ por 24h en estas neuronas fueron notables. Las neuronas controles sin tratamiento presentaron numerosas ramificaciones y un gran largo promedio de sus prolongaciones, a diferencia de las neuronas tratadas con MPP+ 0,1 μ M, la cual presentaron prolongaciones drásticamente acortadas y

casi sin ramificaciones. El área de los somas de estas neuronas medidas no sufrieron cambios significativos con respecto al área promedio de las neuronas controles sin tratamiento, lo que indica que las prolongaciones de estas neuronas son mucho más sensibles que el soma a la degeneración inducida por MPP+. La causa de esta hipersensibilidad es desconocida. Posiblemente podría ser debida a que los transportadores de dopamina, que es por donde ingresa el MPP+, se encuentran mayoritariamente en los terminales de las neuronas dopaminérgicas [32].

Se ha descrito que MPP+ produce alteraciones en el transporte axonal rápido. Específicamente, MPP+ aumenta el transporte retrógrado, dependiente de dineína y disminuye el transporte anterógrado, dependiente de kinesina-1[15], produciendo finalmente una degeneración llamada “dying back”. Las neuropatías de tipo dying back se caracterizan por una secuencia de eventos que parte con la pérdida de función sináptica, pasando por una axonopatía distal y termina con la muerte neuronal[5, 52]. Por lo tanto, la degeneración neurítica de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas inducida por MPP+ correspondería a una neuropatía de tipo dying-back, con un acortamiento progresivo de las prolongaciones de estas neuronas, sin cambios significativos en el área de los somas.

Relación entre la degeneración neurítica inducida por MPP+ y niveles elevados del hierro

El hierro es necesario para las funciones celulares normales, pero es altamente tóxico en exceso, a través de la reacción de Fenton, en donde cataliza la reacción de conversión del H_2O_2 en el radical hidroxilo ($\cdot OH$), una de las especies reactivas de oxígeno más tóxicas.

Se determinó el efecto de distintas concentraciones de hierro en la integridad del árbol neurítico y los somas celulares. Concentraciones entre $2\mu M$ y $40\mu M$ Fe no acortaron en forma significativa las prolongaciones de las neuronas, a diferencia de tratamientos por 24h con Fe $80\mu M$ que indujo un acortamiento cercano al 50%.

En los experimentos de co-incubación de MPP+ con distintas concentraciones de hierro la degeneración neurítica ocurrió principalmente en las primeras 12 horas de tratamiento (Figuras 13 y 15). La degeneración inducida por MPP+ $0,1\mu M$ y Fe $40\mu M$ fue más rápida y más marcada que la ocurrida en el tratamiento solo con MPP+ en condición control ($7\mu M$) de hierro. Este fenómeno fue aún más evidente cuando se trataron los cultivos con MPP+ $1\mu M$. Estos cultivos, tanto los controles, como los tratados con Fe $40\mu M$ sufrieron un gran acortamiento de sus prolongaciones. Este resultado subraya la capacidad que tiene el hierro de potenciar los efectos dañinos sobre la integridad del árbol neurítico que produce la inhibición del complejo I mitocondrial. Es destacable que ambas situaciones, inhibición del complejo I y acumulación de hierro son características encontradas tanto en muestras postmortem de enfermos de Parkinson como en Parkinson experimental [25, 37, 41]. En

los tratamientos con MPP+ 0,1 o 1 μ M con baja concentración (2 μ M) de Fe la degeneración fue menor que en la respectiva condición control.

Estos resultados sugieren que el hierro tiene un papel importante en la degeneración neurítica inducida por MPP+, actuando como amplificador del daño inducido por esta neurotoxina. Es probable que esta degeneración comprenda dos componentes. Uno es el efecto de MPP+ sobre la función mitocondrial y la arquitectura del árbol neurítico y disminuyendo los niveles de ATP en los procesos. El componente hierro cumple un papel clave en el efecto de MPP+, posiblemente potenciando el estrés oxidativo producido por la disfunción del complejo I mitocondrial con la producción de radical hidroxilo.

Mediación del estrés oxidativo celular en la degeneración del árbol neurítico.

La mediación del estrés oxidativo en los efectos de MPP+ y hierro se determinó evaluando el efecto del antioxidante NAC sobre la degeneración del árbol dendrítico inducido por estos compuestos. Incubación de cultivos de mesencéfalo con NAC incrementan la cantidad de glutatión en las células y promueven la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas ante estímulos oxidativos[53].

Observamos que co-incubación con NAC 0,5mM protegió a las neuronas del daño inducido por MPP+ y Fe, disminuyendo significativamente la degeneración axo-dendrítica producida en éstas. El leve acortamiento observado puede ser atribuido a otros factores, como por ejemplo la falta de ATP en los terminales sinápticos dado por la inhibición del

complejo I mitocondrial producido por MPP+[37] o por el acortamiento dado por la interacción que se ha reportado que tiene MPP+ con proteínas de transporte axonal, descrito anteriormente [15].

Se ha descrito, que tratamientos con NAC 0,6mM aumentan el área de los somas de las neuronas dopaminérgicas[53]. En este trabajo no se encontró un aumento significativo del área promedio de los somas con respecto a la condición control, una indicación que la concentración de NAC usada no produce cambios morfológicos observables en las neuronas TH-positiva.

Interesantemente, en los tratamientos con NAC y MPP+ en condiciones de bajo hierro la neuronas TH-positivas presentaron un acortamiento no significativo (6%) de sus prolongaciones en comparación a las neuronas incubadas con MPP+ en condición control. Es posible que en condiciones de bajo hierro la carga oxidativa generada por MPP+ sea contrarrestada eficazmente por los sistemas antioxidantes celulares. Es también posible que los bajos niveles de hierro no intermedien la reacción de Fenton disminuyendo de esta manera la producción del radical hidroxilo y por lo tanto la reactividad de los ROS producidos.

En resumen, tratamientos con NAC en estos cultivos primarios protegieron a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración neurítica inducida por MPP+ potenciada por hierro. En condiciones de bajo hierro se logró una protección casi total del efecto de MPP+. Estos

resultados resaltan el papel fundamental del hierro y del estrés oxidativo en la degeneración del árbol neurítico inducida por la inhibición del complejo I mitocondrial por MPP+.

Efecto de la depleción de GSH en el largo de las prolongaciones de neuronas dopaminérgicas tratadas con distintas concentraciones de hierro y MPP+ en el tiempo.

BSO es un inhibidor de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa, enzima clave en la síntesis de glutatión, por lo tanto, tratamientos con este compuesto inducen una disminución en los niveles celulares de GSH[43, 50]. Al igual que los tratamientos con NAC, fue necesario encontrar la concentración mínima efectiva de BSO, ya que en concentraciones elevadas es altamente tóxico para las células. Se encontró que en condiciones controles de hierro, BSO 50 μ M no acortó significativamente las prolongaciones neuronales ni modificó el área promedio de los somas usándose esta concentración en estudios posteriores.

La inhibición de la síntesis de glutatión y tratar las células en conjunto con un reto oxidativo con Fe 40 μ M por 24h produjo daños severos en la arquitectura neuronal, acortando drásticamente las prolongaciones de las neuronas dopaminérgicas tratadas. El daño observado fue mucho mayor al efecto de BSO 50 μ M o de Fe 40 μ M por separado. Posiblemente este daño fue producido como resultado de la producción de radicales libres catalizada por hierro y por la disminuida protección ante estímulos oxidativos que tenían las neuronas en los tratamientos, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de glutatión.

En este tratamiento se observó que las neuronas son severamente afectadas a las 24h, acortándose las neuritas de las neuronas dopaminérgicas en un 76% y también dañando al resto de las neuronas en el cultivo.

La serie de eventos básicos involucrados en la degeneración del árbol neurítico son: desensamble de microtúbulos, hinchazón del axón formando varicosidades, fragmentación del axón y por último desintegración de los fragmentos por fagocitos locales[51]. En las neuronas tratadas con BSO y alto hierro se observaron numerosas varicosidades, un claro síntoma de neurodegeneración de tipo “dying back”, en donde hay una retracción de neurofilamentos hacia el soma [7, 51].

En los tratamientos con BSO, en condiciones de bajo hierro, no se vio degeneración en las neuronas; dando cuenta de que el hierro con su actividad pro-oxidante y su gran capacidad de producir ROS tiene un marcado rol en la degeneración de las prolongaciones de estas neuronas dopaminérgicas.

El tratamiento con BSO y hierro simuló muy bien las condiciones en las que las neuronas dopaminérgicas se encuentran en la SNpc en la EP, pues hay evidencia que sugiere que bajos niveles de GSH y altas concentraciones de hierro son características de la enfermedad de Parkinson y posible causa de la muerte de neuronas dopaminérgicas en cerebros de pacientes con Parkinson[54-56].

Los tratamientos con MPP⁺ en la presencia de hierro y BSO fueron los más tóxicos utilizados en este estudio. Tratamientos con BSO y MPP⁺ en condiciones control (7 μ M de

Fe) produjeron un acortamiento mayor de las neuritas comparado con el tratamiento sólo con BSO (Figura 24), pero produjeron un acortamiento menor al tratado sólo con MPP+ por 24h (Figura 13). Se ha descrito, que tratamientos con BSO aumentan la producción de la principal proteína antiapoptótica Bcl-2, en las células sobrevivientes al tratamiento[57], en tanto que MPP+ es una neurotoxina que induce apoptosis en las células tratadas[58]. El menor acortamiento observado en condiciones de MPP+ y BSO podría deberse a la inducción por BSO de respuestas antiapoptóticas en estas neuronas dopaminérgicas. Como estos cultivos fueron tratados con concentraciones sub-máximas de BSO es posible que estas neuronas hayan generado mecanismos de protección, a través del aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y así MPP+ causó un menor daño en las neuronas tratadas.

Es necesario destacar que si bien es cierto, numerosos trabajos dan cuenta de la muerte de neuronas dopaminérgicas a las 24 horas de tratamiento con MPP+, en todos esos trabajos, las concentraciones usadas de esta neurotoxina son mucho mayores que las usadas en esta tesis. 0,1µM MPP+ es una concentración muy baja, considerada sub-óptima y que no generó daños evidentes en las neuronas dopaminérgicas. Es pertinente analizar que efectos tiene 0,1µM MPP+ a tiempos más largos y si induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas después de 24 horas.

Tratamientos con BSO y MPP+ en condiciones de alto hierro dañaron profundamente a todo el cultivo, tanto las neuronas TH-positivas como las demás neuronas β-3 tubulina-positivas del cultivo primario. Lo más probable es que este daño masivo fue debido al fuerte estrés oxidativo que fueron sometidos los cultivos en los que, a la inhibición del

complejo I inducida por la neurotoxina MPP⁺ se sumó la generación de ROS altamente tóxicos generados por hierro y un bajo nivel de respuesta antioxidante inducido por la inhibición de la síntesis de GSH por BSO.

Interesantemente, bajas concentraciones de hierro protegieron completamente a las neuronas del efecto combinado de la inhibición del complejo I mitocondrial (MPP⁺) y la disminución de la capacidad antioxidante (BSO). La comparación de un cultivo tratado con BSO y MPP⁺ en 40 μ M Fe con uno tratado con Fe 2 μ M, el cual se encuentra aparentemente inalterado, confirma una vez más la enorme influencia que tiene el hierro sobre la degeneración neurítica, producida por MPP⁺ y por niveles bajos de glutatión en las neuronas dopaminérgicas.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo, propongo una posible secuencia de eventos que ocurrirían en la degeneración neurítica inducida por MPP⁺ en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Al ingresar el MPP⁺ a los terminales sinápticos de las neuronas a través del transportador de dopamina inhibiría al complejo I mitocondrial, aumentando el estrés oxidativo y disminuyendo los niveles de ATP. Este aumento del estrés mediaría la desregulación de los transportadores de hierro, induciéndose así la entrada aumentada de hierro a la neurona. Un posible mediador de este efecto es la proteína reguladora IRP1, que es activada por estrés oxidativo[59]. El aumento de hierro cumpliría un papel fundamental en la progresión del daño al catalizar, a través de la reacción de Fenton, el cambio del peróxido de hidrógeno, un oxidante suave y eliminable por los sistemas de defensa antioxidante de la célula, a radical hidroxilo, uno de los elementos más tóxicos conocidos. Niveles elevados de hierro intracelular aumentarían, además, el consumo

de glutatión, disminuyendo de esta forma las defensas antioxidantes[43]. El aumento progresivo de estas condiciones induciría el acortamiento también progresivo del árbol neurítico desde las partes más distales, alcanzando finalmente al soma.

Ya que el modelo de estudio utilizado en esta tesis reproduce en gran parte eventos clave que ocurre en la EP, es posible que la secuencia descrita sea aplicable al daño neuronal que ocurre en la enfermedad.

7. RESUMEN, CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

A continuación se listan los principales resultados de esta tesis.

1.- Tratamientos con MPP+ acortaron las neuritas de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc* de rata. Concentraciones crecientes de esta neurotoxina provocaron un daño más severo y en menos tiempo.

2.- Al co-incubar MPP+ con distintas concentraciones de hierro, se observó que en condiciones de alto Fe el daño en estas neuronas es mayor, mientras que al tratar estas neuronas con MPP+ en condiciones de bajo hierro la degeneración neurítica fue significativamente menor. Estos resultados indican que el hierro es un intermediario obligatorio en el daño inducido por MPP+.

3.- La degeneración neuronal inducida por MPP⁺ ocurrió de a través de un proceso del tipo “dying back” esto es, la degeneración se inicia en las partes más distales de las fibras más largas de la neurona, avanzando en el tiempo a las partes más proximales y terminando finalmente con la muerte neuronal, que se vió en los tratamientos más tóxicos.

4.- El antioxidante NAC disminuyó la degeneración del árbol neurítico inducido por MPP⁺ y hierro. Por el contrario, la inhibición de la síntesis de glutatión potenció la degeneración neurítica producida por los tratamientos con Fe²⁺ y MPP⁺. Estos resultados indican que los niveles de glutatión en las neuronas dopaminérgicas son relevantes en la degeneración neurítica inducida por MPP⁺ y que el hierro potencia la degeneración en células con bajos niveles de GSH.

5.- El área promedio de los somas de las neuronas dopaminérgicas no presentó cambios significativos en los distintos tratamientos. Sin embargo, en los tratamientos más tóxicos, MPP⁺ y 40μM Fe y MPP⁺, BSO y 40μM Fe la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas disminuyó significativamente.

Los resultados encontrados en esta tesis demuestran que la acumulación de hierro es un cofactor fundamental en la degeneración del árbol neurítico inducida por la neurotoxina MPP⁺ y sugieren que la acumulación de hierro bajo condiciones de inhibición del complejo I mitocondrial es un posible mecanismo de degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc observada en la EP

Propongo una hipotética secuencia de eventos que podrían resultar en inicialmente la degeneración neurítica y finalmente la muerte neuronal. El proceso se iniciaría con la inhibición del complejo I mitocondrial por tóxicos externos (ej. MPP+) o internos (ej. catabolitos de la dopamina), lo que provocaría un aumento inicial del estrés oxidativo y baja en los niveles de ATP. El aumento del tono oxidativo produciría la activación de IRP1 con el consecuente aumento en la entrada de hierro a las células. La suma de efectos de la inhibición de la actividad mitocondrial y el exceso de hierro produciría un aun mayor aumento del estrés oxidativo, la disminución de los niveles de glutatión y un daño oxidativo masivo. El aumento escalado del estrés oxidativo induciría primero un acortamiento en las prolongaciones neuríticas y, en las etapas finales, a la degeneración del soma y la muerte neuronal.

Este modelo indica que compuestos protectores de daño oxidativo o quelantes de hierro con afinidad con las neuronas dopaminérgicas de la SNpc pueden dar lugar a posibles terapias que detengan la progresión de la enfermedad de Parkinson.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnston, D., et al., *Active properties of neuronal dendrites*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 165-86.
2. Li, H., et al., *Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8473-81.
3. Tsai, J., et al., *Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches*. Nat Neurosci, 2004. **7**(11): p. 1181-3.
4. Hof, P.R., K. Cox, and J.H. Morrison, *Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex*. J Comp Neurol, 1990. **301**(1): p. 44-54.
5. Bossy-Wetzell, E., R. Schwarzenbacher, and S.A. Lipton, *Molecular pathways to neurodegeneration*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S2-9.
6. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
7. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
8. Fahn, S., *Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 1-14.
9. Weintraub, D., C.L. Comella, and S. Horn, *Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment*. Am J Manag Care, 2008. **14**(2 Suppl): p. S40-8.
10. Jenner, P. and C.W. Olanow, *The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease*. Neurology, 2006. **66**(10 Suppl 4): p. S24-36.

11. Marsden, C.D., *Neuromelanin and Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 1983. **19**: p. 121-41.
12. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet Neurol, 2006. **5**(3): p. 235-45.
13. German, D.C., et al., *Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization*. Ann Neurol, 1989. **26**(4): p. 507-14.
14. Smeyne, R.J. and V. Jackson-Lewis, *The MPTP model of Parkinson's disease*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **134**(1): p. 57-66.
15. Morfini, G., et al., *1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2442-7.
16. MacKenzie, E.L., K. Iwasaki, and Y. Tsuji, *Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(6): p. 997-1030.
17. Britton, R.S., et al., *Pathophysiology of iron toxicity*. Adv Exp Med Biol, 1994. **356**: p. 239-53.
18. Rytter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(2): p. 289-309.
19. Beinert, H. and P.J. Kiley, *Fe-S proteins in sensing and regulatory functions*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(2): p. 152-7.
20. Kienzl, E., et al., *Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease?* Life Sci, 1999. **65**(18-19): p. 1973-6.

21. Zoccarato, F., P. Toscano, and A. Alexandre, *Dopamine-derived dopaminochrome promotes H₂O₂ release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca²⁺, and relevance to Parkinson disease*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15587-94.
22. Paris, I., et al., *Dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from rat hypothalamus*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(3): p. 415-9.
23. Sofic, E., et al., *Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain*. J Neural Transm, 1988. **74**(3): p. 199-205.
24. Dexter, D.T., et al., *Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease*. J Neurochem, 1989. **52**(6): p. 1830-6.
25. Hirsch, E.C., et al., *Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis*. J Neurochem, 1991. **56**(2): p. 446-51.
26. Ara, J., et al., *Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7659-63.
27. Przedborski, S., Vila, M, *MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity*. Clinical Neuroscience Research, 2001. **1**(6): p. 407-418.
28. Przedborski, S. and M. Vila, *The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 189-98.
29. Simola, N., M. Morelli, and A.R. Carta, *The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. Neurotox Res, 2007. **11**(3-4): p. 151-67.
30. Iancu, R., et al., *Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice*. Behav Brain Res, 2005. **162**(1): p. 1-10.

31. Mayer, R.A., M.V. Kindt, and R.E. Heikkila, *Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport*. J Neurochem, 1986. **47**(4): p. 1073-9.
32. Del Zompo M, P.M., Ruiu S, Quartu M, Gessa GL and Vaccari A, *Selective uptake into synaptic dopamine vesicles: Possible involvement in MPTP neurotoxicity*. Br J Pharmacol, 1993. **109**(2): p. 411-414.
33. Nicklas, W.J., et al., *MPTP, MPP+ and mitochondrial function*. Life Sci, 1987. **40**(8): p. 721-9.
34. Scotcher, K.P., et al., *Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes*. J Neurochem, 1990. **54**(4): p. 1295-301.
35. Wong, S.S., R.H. Li, and A. Stadlin, *Oxidative stress induced by MPTP and MPP(+): selective vulnerability of cultured mouse astrocytes*. Brain Res, 1999. **836**(1-2): p. 237-44.
36. Cleeter MW, C.J., Schapira AH, *Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: evidence for free radical involvement*. J Neurochem, 1992. **58**(2): p. 786-789.
37. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. J Neurochem, 1990. **54**(3): p. 823-7.
38. Liang, L.P. and M. Patel, *Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease*. J Neurochem, 2004. **90**(5): p. 1076-84.
39. Przedborski, S., et al., *Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4565-71.

40. Ferraro, T.N., et al., *Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse*. *Neuropharmacology*, 1986. **25**(9): p. 1071-4.
41. Mochizuki, H., et al., *Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys*. *Neurosci Lett*, 1994. **168**(1-2): p. 251-3.
42. Brouard, A., et al., *Mesencephalic dopaminergic neurons in primary cultures express functional neurotensin receptors*. *J Neurosci*, 1992. **12**(4): p. 1409-15.
43. Nunez, M.T., et al., *Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(7): p. 953-60.
44. Coombs, J.L., D. Van Der List, and L.M. Chalupa, *Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development*. *J Comp Neurol*, 2007. **503**(6): p. 803-14.
45. Masserano, J.M. and N. Weiner, *Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system*. *Mol Cell Biochem*, 1983. **53-54**(1-2): p. 129-52.
46. Black, M.M., T. Slaughter, and I. Fischer, *Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons*. *J Neurosci*, 1994. **14**(2): p. 857-70.
47. Iwata, M., et al., *A study of a dendritic marker, microtubule-associated protein 2 (MAP-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA)*. *Neurosci Lett*, 2005. **386**(3): p. 145-9.
48. Imamura, K., et al., *Homocysteine is toxic for dopaminergic neurons in primary mesencephalic culture*. *Neuroreport*, 2007. **18**(13): p. 1319-22.
49. Fahn, S. and G. Cohen, *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it*. *Ann Neurol*, 1992. **32**(6): p. 804-12.

50. Anderson, M.E., *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation*. Chem Biol Interact, 1998. **111-112**: p. 1-14.
51. Saxena, S. and P. Caroni, *Mechanisms of axon degeneration: from development to disease*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(3): p. 174-91.
52. Coleman, M., *Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(11): p. 889-98.
53. Colton, C.A., et al., *Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons*. Exp Neurol, 1995. **132**(1): p. 54-61.
54. Jenner, P. and C.W. Olanow, *Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurology, 1996. **47**(6 Suppl 3): p. S161-70.
55. Youdim, M.B. and P. Riederer, *Understanding Parkinson's disease*. Sci Am, 1997. **276**(1): p. 52-9.
56. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Redox imbalance in Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1362-7.
57. D'Alessio, M., et al., *Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells*. Faseb J, 2004. **18**(13): p. 1609-11.
58. Kalivendi, S.V., et al., *1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 151-64.
59. Nunez-Millacura, C., et al., *An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells*. J Neurochem, 2002. **82**(2): p. 240-8.
60. N. de Vries, S. de Flora, *N-acetyl-L-cysteine, 1993*. J. Cell. Biochem. 17F (suppl): p. 270-277.

61. Antonelli, T., et al., *Neurotensin enhances glutamate excitotoxicity in mesencephalic neurons in primary culture*. J Neurosci Res, 2002. **70**(6): p. 766-73.
62. Zeevalk, G. D., *Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(3): p. 1124-30.
63. Sian J., et al., *Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia*. 1994. Ann. Neurol. **36**, 348-355.
64. *Guiding principles for research involving animals and human beings.*, 2002., Am J Physiol Cell Physiol. **282**(6): p: 3 p following instructions for authors.
65. Rodriguez-Pallares, J., et al., *N-acetylcysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells.*,2001., Neuroreport., **12**(18): p. 3935-8.
66. Lipinski, B., *Evidence in support of a concept of reductive stress.*, 2002., Br J Nutr., **87**(1): p. 93-4; discussion 94.

