



UCM-FC
MAG-BMCN
C316
C.A

**“Flujo de hierro en la mitocondria y su implicancia en la
homeostasis celular de hierro”**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas, mención en Biología Molecular, Celular
y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

**Por
CAROLINA S. CARRIEL BURGOS**

Diciembre 2010

**Director de Tesis Dr:
MARCO T. NÚÑEZ GONZÁLEZ**



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

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

Carolina S. Carriel Burgos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 de Julio de 2010 .

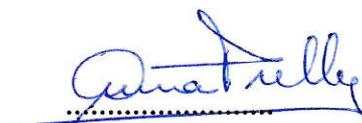
Director de Tesis:

Dr Marco T. Núñez G.

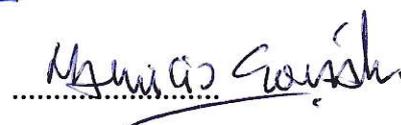


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Ana Preller



Dr. Mauricio González



A mis abuelos Carmen, Elsa y Luis





AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo de la presente tesis:

A los miembros del laboratorio de Biología del Envejecimiento: Vicky, Pabla, Natalia, Francisco, Daniela y Carlitos, por la ayuda brindada durante el desarrollo de la presente tesis.

A mis padres y hermano por su constante apoyo.

A mis compañeros de Universidad por su valiosa ayuda durante la revisión de ésta tesis.

A Joaquín, por su apoyo incondicional.

A la comisión evaluadora por su valioso aporte a ésta tesis, así como también a mi tutor Marco Tulio Núñez, por su confianza y aporte constante a mi desarrollo en el área científica.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO	1
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Metabolismo y homeostasis del hierro celular	16
1.2 El pool de hierro lábil	20
1.3 El sistema IRE/IRP	21
1.4 Mitocondria y Hierro	23
1.5 Metabolismo mitocondrial del Hierro	26
1.5.1 Transportadores mitocondriales	27
1.5.2 Ferritina mitocondrial	29
2. HIPÓTESIS	32
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GENERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1 Materiales	33
4.1.1 Reactivos generales	33



4.1.2 Cultivo Celular	33
4.1.3 Material biológico	33
4.1.4 Anticuerpos y Western blot	34
4.1.5 Fluoróforos	34
4.1.6 Equipos	34
4.2 Métodos	35
4.2.1 Cultivo celular	35
4.2.2 Tratamientos de células SH-SY5Y con variadas ofertas de Fe Extracelular	35
4.2.3 Preparación de suero fetal de bovino bajo en suero	36
4.2.4 Incorporación celular de ^{55}Fe .	36
4.2.5 Western blot	37
4.2.6 Preparación de fracciones mitocondrial y citosólica.	38
4.2.7 Determinación de hierro celular total.	39
4.2.8 Determinación del LIP citosólico	40
4.2.9 Determinación del LIP mitocondrial	41
4.2.10. Tasa de incorporación de Fe citosólico y mitocondrial.	43
4.2.11 Microscopía	43
4.2.12 Análisis estadísticos	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Distribución subcelular de Fe al equilibrio	45
5.2. Incorporación de ^{55}Fe en células SH-SY5Y – Efecto del tratamiento previo con diferentes concentraciones de Fe.	46
5.3 Detección del pool de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y mediante el uso de sondas fluorescentes.	48
5.3.1 Detección de la magnitud de cLIP por Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.	49

5.3.2 Detección de la magnitud de cLIP por Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe.	52
5.4 Participación de agentes oxidantes en la magnitud del cLIP en células SH-SY5Y.	54
5.4.1 Detección de la magnitud de cLIP por Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Participación de mecanismos antioxidantes.	54
5.4.2 Detección de la magnitud de cLIP por Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe. Participación de mecanismos antioxidantes.	57
5.5 Tasa de incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y	59
5.5.1 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y con tratamiento de distintas ofertas de Fe durante 24 horas.	59
5.5.2 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y con tratamiento de distintas ofertas de Fe durante 48 horas.	61
5.6 Detección de la magnitud de mLIP por Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y.	63
5.6.1 Detección de la magnitud de mLIP por Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe	63
5.6.2 Detección de la magnitud de mLIP por Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe.	65
5.7 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil mitocondrial en células SH-SY5Y	67



5.7.1 Detección de la magnitud de mLIP por Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Participación de mecanismos antioxidantes.	67
5.7.2 Detección de la magnitud de mLIP por Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe en presencia de NAC.	69
5.8 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil mitocondrial en células SH-SY5Y.	71
5.8.1 Detección de la tasa de incorporación de hierro externo al pool de hierro lábil mitocondrial utilizando células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de Fe.	71
5.8.2 Detección de la incorporación de hierro externo pool de hierro lábil mitocondrial utilizando células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con concentraciones crecientes de Fe.	73
6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS.	75
6.1. Comparación entre el contenido de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a diversas ofertas de Fe durante 24 y 48 horas	75
6.2. Comparación entre el contenido de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y	77
6.3. Comparación del efecto del antioxidante NAC en la magnitud del LIP citosólico de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.	78
6.4 Comparación del efecto del antioxidante NAC en la magnitud del LIP mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.	79
6.5 Tasa de incorporación de Fe a citosol y mitocondria en células SH-SY5Y tratadas durante 24 y 48 horas con diversas ofertas de Fe externo.	80
7. DISCUSIÓN	81
7.1 Acumulación de hierro al equilibrio en células SH-SY5Y	81

7.2 Distribución subcelular de Fe en células SH-SY5Y	82
7.3 Acumulación de hierro lábil en citosol y mitocondria en función de ofertas crecientes de hierro extracelular y del tiempo de exposición a éstas ofertas.	83
7.4 Efecto de agentes antioxidante en la acumulación de hierro lábil en citosol y mitocondria en función de ofertas crecientes de hierro extracelular y del tiempo de exposición a éstas ofertas.	84
7.5 Incorporación de Fe en compartimentos citosólico y mitocondrial, en células SH-SY5Y tratadas durante 24 y 48 horas con ofertas crecientes de Fe.	86
8. RESUMEN Y CONCLUSIONES	87
9. BIBLIOGRAFÍA	89





ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Esquema del metabolismo celular de Fe	18
Figura 2. Distribución subcelular de Fe en células SH-SY5Y	45
Figura 3. Incorporación de ^{55}Fe en células SH-SY5Y – Efecto del tratamiento previo con Fe.	47
Figura 4. Localización intracelular de los sensores de metales calceína y RPA en células SH-SY5Y y su susceptibilidad a hierro.	49
Figura 5. Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.	51
Figura 6. Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe.	53
Figura 7. Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe y la molécula antioxidante NAC.	56
Figura 8. Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe y la molécula antioxidante NAC.	58
Figura 9. Detección de la incorporación de hierro al cLIP por apagamiento de calceína en células expuestas a distintas concentraciones de Fe durante 24 horas.	60
Figura 10. Detección de la incorporación de hierro al cLIP por apagamiento de calceína en células expuestas a distintas concentraciones de Fe durante 48 horas.	62
Figura 11. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.	64
Figura 12. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.	66



Figura 13. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe y NAC	68
Figura 14. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 48 horas con diversas ofertas de Fe y NAC.	70
Figura 15. Incorporación mitocondrial de Fe en células cargadas con Fe durante 24 horas.	72
Figura 16. Incorporación mitocondrial de Fe en células cargadas con Fe durante 48 horas.	74
Figura 17. Comparación de la magnitud de Fe lábil en células SY5Y expuestas a 24 y 48 horas de ofertas crecientes de Fe	75
Figura 18. Comparación de la magnitud de Fe lábil mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a 24 y 48 horas de ofertas crecientes de Fe	76
Figura 19. Comparación de la magnitud de Fe lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a ofertas crecientes de Fe.	77
Figura 20. Efecto del NAC en el contenido de Fe lábil citosólico de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.	78
Figura 21. Efecto del NAC en el contenido de Fe lábil mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas	79
Figura 22. Tasa de incorporación de Fe a citosol y mitocondria de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica de bovino
CA-AM	Acetoximetil éster de calceína
cLIP	Pool de hierro lábil citosólico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
DFP	Deferiprona
DMT1	Transportador de metales divalentes -1
DTPA	Ácido dietilen triaminpentaacético
Fe	Hierro
Fn	Ferritina
IRE	Elemento de respuesta a hierro
IRP	Proteína de respuesta a hierro
kDa	kilo Dalton
mLIP	Pool de hierro lábil mitocondrial
NTA	Ácido Nitrilotriacético
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPA	Sonda rodamina B-[(1,10-phenantrolin-5-il)aminocarbonil] benzil éster
RTf	Receptor de Tf
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
Tf	Tf
Tween 20:	Polioxietilensorbitan monolaurato

RESUMEN

Debido a su capacidad de formar complejos de coordinación con ligandos orgánicos, el hierro participa en procesos celulares básicos como fosforilación oxidativa, transporte y almacenamiento de oxígeno, metabolismo de neurotransmisores, y síntesis de ADN [1]. En tejido neuronal, participa como cofactor de muchas proteínas involucradas en su normal funcionamiento. Sin embargo, el hierro en sus formas redox-activas forma parte del llamado pool de hierro lábil (LIP) y ha sido asociado con procesos de neurodegeneración o envejecimiento.

La mitocondria es un organelo esencial en la bioenergética celular, pues en su interior ocurre la generación de energía en forma de ATP, y se produce allí la biosíntesis de los grupos Fe-S y Hem [36]. Además, la mitocondria tiene un papel central en el desencadenamiento de la apoptosis en respuesta a daño oxidativo, pues genera especies reactivas de oxígeno tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Dado el requerimiento de Fe para la síntesis de ferro proteínas en la mitocondria y la susceptibilidad mitocondrial a daño oxidativo, es de esperar que existan múltiples componentes involucrados en mantener la homeostasis de Fe en el organelo. Sin embargo, la regulación que permite la homeostasis mitocondrial de hierro aún es en gran parte desconocida. La mayor parte de la información proviene de desórdenes donde están alterados componentes de la biosíntesis del hem o de núcleos Fe-S, componentes esenciales de ferroquelatasas y proteínas involucradas en el ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones [43].

En esta tesis se estudió el flujo y distribución de hierro entre la mitocondria y el citosol en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en diferentes condiciones de aporte de hierro externo. Nuestros resultados indican que las células SH-SY5Y tienen un mecanismo de regulación del contenido de hierro, el cual es sobrepasado en incubaciones prolongadas con altas concentraciones de hierro. La magnitud del LIP citosólico se vió afectada por la presencia de antioxidantes, no así el LIP mitocondrial.

La incorporación de Fe a la mitocondria respondió a la oferta externa de Fe y al tiempo de exposición a éste, de manera que disminuyó la incorporación de hierro a mayor oferta de hierro y viceversa. Este comportamiento evidencia la presencia de mecanismos de regulación del contenido de hierro mitocondrial.

Las mitocondrias de células SH-SY5Y permeabilizadas fueron capaces de acumular Fe, siguiendo una cinética con patrón similar al de las células enteras. Concluimos que el ingreso de hierro a la mitocondria es, a lo menos en parte, independiente de componentes citosólicos.

En resumen, observamos que la mitocondria en condiciones de deficiencia capta hierro preferentemente a los requerimientos de hierro del citosol, en condiciones de sobrecarga el hierro se acumula preferentemente en el citosol. Estas observaciones indican la presencia de un importante mecanismo destinado a mantener la homeostasis del hierro en la mitocondria.

ABSTRACT

Because of its ability to form coordination complexes with organic ligands iron participates in basic cellular processes such as oxidative phosphorylation, oxygen transport and storage, metabolism of neurotransmitters, and DNA synthesis [1]. In neuronal tissue, iron participates as a cofactor of many proteins involved in its normal operation. However, iron in redox-active states forms part of the labile iron pool (LIP) that has been associated with neurodegeneration and aging processes.

The mitochondrion is an essential organelle for cellular bioenergetics and the synthesis of heme and Fe-S groups, essential components of ferrochelatase and proteins involved in the citric acid cycle and electron transport chain [36]. In addition, the mitochondrion has a central role in triggering apoptosis in response to oxidative damage, because it generates reactive oxygen species (ROS) in both physiological and pathological conditions. Given the requirement for the synthesis of iron-containing proteins in mitochondria, and its susceptibility to oxidative damage, we expect that multiple components involved in maintaining Fe homeostasis in the organelle will exist. However, the regulation of mitochondrial iron homeostasis is still largely unknown, most of the available information coming from the study of disorders where components of the biosynthesis of heme or Fe-S clusters are altered[43]

In this thesis we studied the flow and distribution of iron between mitochondria and cytosol in SH-SY5Y cells, under different conditions of external iron supply. Our results indicate that SH-SY5Y cells have a regulatory mechanism for iron content, which is surpassed in prolonged incubations with high iron concentrations. We ascertained that there is involvement of oxidizing agents in the deregulation of the cytosolic LIP, since their levels

decreased to normal in the presence of antioxidants. Interestingly, the mitochondrial LIP was not affected by prolonged incubations with iron, and the size of the mitochondrial LIP was not affected by antioxidants.

The incorporation of Fe into mitochondria responded to the external supply of Fe and to time of exposure to it, so as to reduce the incorporation of iron if the offer was large and vice versa. This behavior evidences the presence of regulatory mechanisms of mitochondrial iron content.

Mitochondria of permeabilized cells were able to accumulate Fe, following a kinetic pattern similar to that of whole cells. We conclude that the entry of iron into mitochondria is, at least in part, independent of cytosolic components.

In summary, we observed that under iron deficiency conditions, mitochondria captures iron preferentially to the requirements of the cytosol, whereas under iron overload conditions iron preferentially accumulates in the cytosol. These observations indicate the presence of a strong mechanism for the maintenance of iron homeostasis in mitochondria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo y homeostasis del hierro celular

El Fe es un metal presente en la estructura de muchas enzimas y otras proteínas. Su configuración electrónica le otorga propiedades químicas únicas, tales como un potencial redox que le permite alternar entre sus estado de oxidación Fe^{+2}/Fe^{+3} y la capacidad de formar complejos de coordinación con ligandos orgánicos. Esto le permite participar en procesos como transporte y almacenamiento de oxígeno en el grupo hem de la hemoglobina circulante, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y la síntesis de DNA.[1]

Si bien el hierro es esencial para la vida, el exceso de hierro libre es potencialmente tóxico pues cataliza la generación de especies reactivas de oxígeno, ROS, que inducen la generación de daño oxidativo en la célula [2]. Por esta razón, debe existir un delicado mecanismo de regulación de la incorporación, almacenamiento, y movilización segura del metal tanto dentro de la célula [3], como en tejidos y sitios celulares específicos. En los procesos de transporte, manejo y metabolismo de Fe participan diversas proteínas [1-4].

En el plasma sanguíneo, el Fe se encuentra unido a Transferrina (Tf) en una forma químicamente no reactiva, una vez incorporado a la célula, el metal puede ingresar a distintos compartimentos donde se encuentra en diferentes estados de reactividad. Principalmente se dirige a la mitocondria, lugar de síntesis de los grupos prostéticos que lo contienen, para constituir las proteínas cuya actividad o función están dadas por la presencia

de Fe en su estructura. Este hierro corresponde al Fe funcional de la célula, cuya reactividad está restringida a las reacciones redox específicas de la proteína. Sin embargo, las proteínas con cofactores que contienen Fe son blanco de daño oxidativo debido a que el hierro es altamente reactivo cuando entra en contacto con el oxígeno (Reacción de Fenton).

En todos los tipos celulares la proteína citosólica ferritina almacena hierro en el estado Fe (III), incorporado en un sólido cristalino con fórmula $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$, el cual se encuentra en la cavidad interna de la proteína [5].

En la Figura 1 se muestran los distintos componentes moleculares que participan en el metabolismo celular de Fe. El Fe de la dieta ingresa al torrente sanguíneo a través del intestino delgado. El Fe que se encuentra en el lumen intestinal predominantemente en forma férrica, es reducido a Fe^{2+} por la reductasa férrica Dcytb presente en la membrana apical de estas células [6], y posteriormente entra a través del transportador de metales divalentes (DMT1) [7]. En los demás tipos celulares, el hierro normalmente entra unido a Tf, la cual al unirse a su receptor (TfR) forma un complejo (TfR-Tf- Fe^{3+}) el cual es internalizado. Una vez que el Fe ha ingresado a la célula, puede seguir dos destinos: (i) ser almacenado en ferritina para su posterior eliminación en el proceso normal de descamación intestinal o (ii) pasar a la circulación general y ser distribuido al resto de las células del organismo, mediante el transporte a través de la membrana basolateral del enterocito por el transportador ferroportina 1 (FP1) [6-8], y posterior re-oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} por la oxidasa de membrana HcFe-Stina [9], para ser incorporado en apo-Tf.

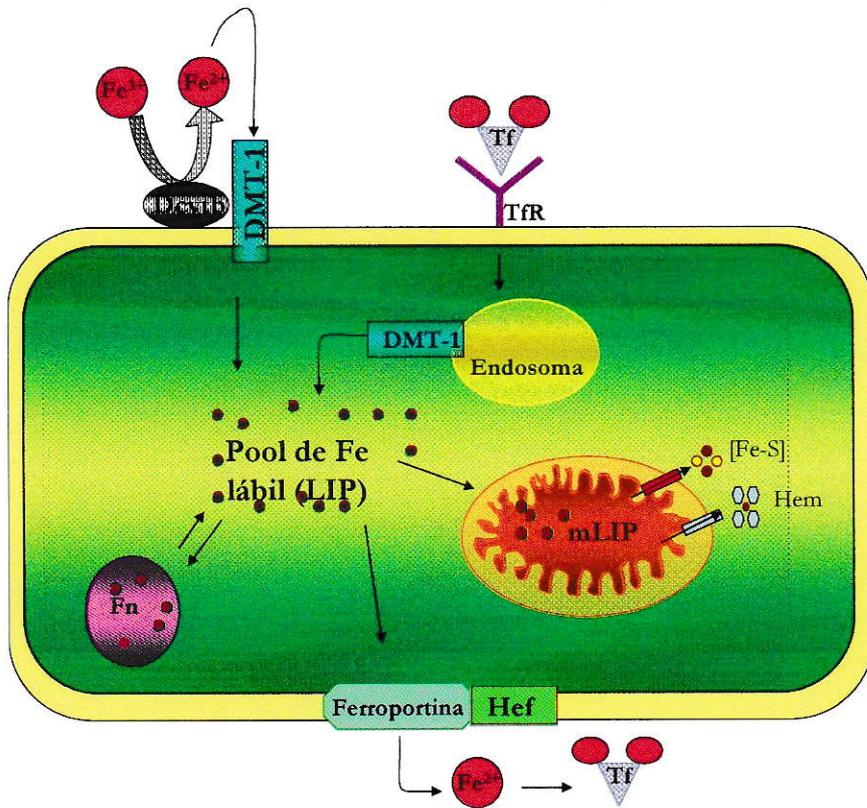


Figura 1. Esquema del metabolismo celular de Fe. El hierro puede ingresar a la célula por dos vías: cuando se encuentra unido a Tf, es internalizado por endocitosis mediada por receptor (TfR-Tf- Fe^{3+}), este complejo se desensambla producto del pH ácido del endosoma, y el Fe disociado atraviesa la membrana endosomal a través de DMT1 y llega al citosol. Cuando el Fe no está unido a Tf (inorgánico), o en el caso de los enterocitos, el Fe de la dieta, es reducido por Dcytb y transportado en forma Fe^{2+} por el transportador DMT1. Sea cual sea la vía de entrada, el Fe^{2+} forma un "pool" de tránsito, desde ahí hierro en exceso se almacena en ferritina, el hierro necesario para la síntesis de ferro-proteínas es dirigido a la mitocondria, y una fracción menor se encuentra en el núcleo. El Fe abandona la célula a través del exportador de FPN1, el cual se encuentra unido a HeFe-Stina, encargada de oxidar el Fe^{2+} a Fe^{3+} para que posteriormente éste se una a Tf y se incorpore a la circulación.

La proteína Tf puede transportar 1 o 2 átomos de Fe en su estado férrico (Fe^{3+}), el cual se conoce como hierro unido a Tf (transferrin bound iron, TBI), además existe una fracción de hierro que circula en la sangre no unido a Tf (NTBI, non-transferrin bound iron), asociado a componentes del plasma sanguíneo con baja afinidad. En casi todos los tejidos, el hierro unido a Tf es entregado vía endocitosis mediada por receptor. En otros tejidos, como cerebro, riñón, hígado, está presente DMT1, por lo que existen 2 vías de incorporación de Fe en esos casos [1]. El hierro unido a Tf no sólo proviene de la dieta sino que también es suministrado por macrófagos, los cuales reciclan el Fe de glóbulos rojos senescentes a través de la fagocitosis y el catabolismo del Hem. La salida de Fe de los macrófagos es a través de FPN1, que también juega un papel importante en la salida de hierro de células neuronales [10]. La ferroxidasa heFe-Stina oxida el hierro transportado previo a la unión a apoTf circulante.

La homeostasis de Fe en el organismo está basada en el balance entre las pérdidas obligatorias (1-2 mg/día), la absorción intestinal regulada y el reciclaje efectivo de Fe por los macrófagos, con almacenamiento del Fe no funcional en el hígado. Para mantener este balance entre enterocitos duodenales, macrófagos y reservorios hepáticos de Fe, existe hepcidina, un péptido de 25 aminoácidos sintetizado principalmente en el hígado [11] y secretado al plasma. En condiciones de sobrecarga de hierro, hepcidina actúa inhibiendo la salida de hierro desde macrófagos, reservorios hepáticos y además inhibiendo la absorción de Fe por parte de los enterocitos [12]. Estos eventos ocurren mediante la internalización del transportador de salida de hierro FP1 y mediante la interacción de hepcidina con la proteína

HFE [13], que regula negativamente tanto a DMT1 como al receptor de Tf, provocando así la disminución de la concentración de hierro al interior de la célula [13-16].

1.2 El pool de hierro lábil

En las células, una fracción importante del hierro se encuentra unido a enzimas y proteínas especializadas en su transporte y almacenamiento. Sin embargo, entre el 3-5% del hierro intracelular se encuentra unido con baja afinidad a aniones orgánicos, péptidos o glicanos. Este hierro se conoce como Pool de Hierro Lábil citosólico (cLIP) y tiene funciones muy importantes: es una fuente de hierro que está rápidamente disponible para ser incorporado a proteínas, y además puede ser blanco de terapias farmacológicas en pacientes con sobrecarga sistémica de hierro, pero a su vez, este hierro es redox activo, pues promueve rápidamente la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton [17- 18].

Para estudiar los flujos de hierro lábil en la célula intacta se han utilizado sondas fluorescentes, las cuáles unen Fe con baja afinidad, lo que provoca un cambio en su conformación y el apagamiento de su fluorescencia. El apagamiento de la fluorescencia de la sonda es proporcional al hierro lábil presente al interior de la célula. Las sondas utilizadas no son específicas para Fe, también pueden unirse a otros metales como calcio o magnesio, pero con una afinidad tres órdenes de magnitud menor. La especificidad del método para la evaluación del contenido de hierro intracelular está dada por la adición de Deferiprona (DFP), quelante con alta afinidad por Fe, que actualmente se encuentra en uso clínico. DFP desplaza el Fe de la sonda, devolviéndole a ésta su fluorescencia máxima [19]

Para determinar el contenido de hierro lábil en los distintos compartimentos de la célula, se han desarrollado sondas fluorescentes con destinación específica: al citosol [20] compartimentos endosomales y lisosomas [21], y en particular mitocondria [22-24]. Es posible visualizar el hierro lábil siguiendo la fluorescencia de la sonda con microscopía fluorescente o confocal [22], y cuantificar utilizando un lector de fluorescencia de microplacas [25]

1.3 El sistema IRE/IRP

En células eucariontes, la expresión de genes involucrados en el transporte y almacenamiento de Fe depende principalmente de proteínas de unión a ARN específicos, regulando la expresión de éstos genes de manera traduccional [27]. El sistema Elemento de Respuesta a Hierro/Proteína Reguladora de Hierro (IRE/IRP) permite regular el contenido de hierro que se encuentra en proteínas con núcleos Fe-S, en el interior del grupo Hem y almacenado en Ferritina [15, 26].

El sistema IRE/IRP está conformado por las proteínas reguladoras IRP-1 e IRP-2 [13-14] que, en función de la concentración de Fe lábil citosólico (cLIP), se unen a secuencias IRE de ARNm de proteínas relacionadas con la homeostasis de Fe. La actividad de unión a éstas secuencias IRE depende de un núcleo [4Fe-4S] que se encuentra en la proteína IRP-1, el cual detecta el nivel citosólico de hierro y regula la traducción de mensajeros de acuerdo a este nivel. Cuando los niveles de hierro lábil son bajos, el núcleo [4Fe-4S] se disocia a [3Fe-4S], que es la forma activa de unión a IREs. La unión de IRP a IRE **estabiliza** los mensajeros de proteínas como DMT1 y RTf que presentan la secuencia IRE en la región 3'

no codificante y **reprime** la traducción de aquellos que la tienen en 5', como por ejemplo, el mensajero de la proteína de almacenaje ferritina. Esto asegura que en situación de deficiencia de hierro aumente su incorporación (por aumento en la expresión de DMT1 y RTf) [13]. Cuando los niveles de hierro lábil son altos, el centro [3Fe-4S] cambia a [4Fe-4S], perdiendo la capacidad de unión a IRE. Esto provoca una disminución de la expresión de las proteínas encargadas de captar Fe, como DMT1 y RTf y un aumento en la expresión de ferritina, con lo cual disminuye la incorporación celular y el exceso de hierro se almacena en forma inocua para la célula en el interior de ferritina, que puede almacenar hasta 4.500 átomos de Fe [4, 28]. Sin embargo, a pesar de que las células se encuentren con sobrecarga de Fe, existe una incorporación basal de éste que se mantiene, provocando el aumento del pool de hierro lábil en el tiempo [15, 29].

No sólo el Fe es capaz de modular el sistema IRE/IRP, sino que también puede activarse por stress oxidativo [30], óxido nítrico [31], hipoxia [32] y por acumulación de hierro[33] .

A lo largo de la vida [34] ó en células expuestas a tratamientos con hierro [29, 35] el Fe se acumula intracelularmente. Dentro de ferritina, el Fe es muy poco reactivo, sin embargo el LIP redox activo aumenta paralelamente al Fe almacenado en ferritina y al contenido total de Fe [29].

1.4 Mitocondria y Hierro

La mitocondria es un organelo esencial en la bioenergética celular. En su interior se genera energía en forma de ATP, se regulan los niveles de Ca^{2+} citosólico y se produce allí la

biosíntesis de complejos [Fe-S] y Hem [36]. Además, la mitocondria tiene un papel central en el daño oxidativo, pues está generando constantemente especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto en condiciones fisiológicas como patológicas[37].

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) funcionan como segundos mensajeros de la señalización redox en condiciones fisiológicas. En condiciones patológicas, o durante el proceso de envejecimiento, las enzimas encargadas de mantener los niveles adecuados de ROS son sobrepasadas, generándose una acumulación de ROS que produce un desbalance entre mecanismos de detoxificación y estrés oxidativo, generando daño oxidativo y disfunción mitocondrial [38-39]. Especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que se producen normalmente en la célula, pueden combinarse con metales reducidos, como Fe^{2+} o Cu^+ , y mediante la reacción de Fenton generar el radical hidroxilo, ($\cdot OH$), el más tóxico de los radicales de oxígeno, que produce mutaciones en ADN, denaturación de proteínas y peroxidación de membranas, que acarrear defectos funcionales y perturbaciones en la homeostasis iónica [2].

Un óptimo funcionamiento de la mitocondria está relacionado con la integridad de los componentes que aseguran la generación de energía para la célula, principalmente con la generación de núcleos Fe-S, los cuales se encuentran asociados a múltiples proteínas incluyendo proteínas mitocondriales.

El metal participa generalmente en los procesos de transferencia de electrones, siendo un componente integral de proteínas de la cadena transportadora de electrones:

entre 10 y 12 proteínas de los complejos de transferencia de electrones contienen los núcleos Fe-S y más de 8 contienen grupos Hem en su centro activo [40].

Ejemplos de proteínas Fe-S de la mitocondria son: la proteína Rieske, asociada a subunidades de citocromo b y c1; ferroquelatasa, que participa en la síntesis de Hem adicionando Fe a la protoporfirina IX para la síntesis del Hem; enzimas del ciclo del ácido cítrico, como la aconitasa mitocondrial y la succinato deshidrogenasa, NADH: ubiquinona óxidorreductasa, entre otras. Dada la importancia de los núcleos Fe-S, una disminución en la incorporación de Fe o una deficiencia en su síntesis generan disfunción mitocondrial. Se ha reportado que cuando ocurre disfunción mitocondrial, se altera tanto la producción de energía, como de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por ejemplo, la deficiencia de hem altera la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) y aumenta la producción de oxidantes [41].

Una producción ineficiente de energía puede ocurrir por daño oxidativo o inhibición específica de las proteínas de la cadena de transporte de electrones, que se asocian con un aumento en la producción no específica de ROS. Los núcleos Fe-S son particularmente sensibles a daño oxidativo. Por ejemplo, se ha identificado un núcleo Fe-S redox activo en el complejo I (NADH deshidrogenasa), asociado a la producción de superóxido, el cual es afectado por el envejecimiento, limitando la transferencia de electrones. Es claro que el metal juega un papel crucial en el metabolismo mitocondrial [42]

Dado el requerimiento de Fe para la síntesis de ferroproteínas en la mitocondria y la susceptibilidad mitocondrial a daño oxidativo, es de esperar que existan múltiples componentes involucrados en modular la incorporación, salida y almacenamiento de Fe en el organelo. Sin embargo, la regulación de la homeostasis mitocondrial de hierro aún es en gran parte desconocida. La mayor parte de la información proviene de desórdenes genéticos donde están alterados componentes de la biosíntesis del hem o de complejos Fe-S [43] y que conllevan alteraciones en su metabolismo. Esta información ha permitido identificar múltiples proteínas mitocondriales que participan en el flujo de hierro hacia y desde la mitocondria y en la biosíntesis de los grupos prostéticos Fe-S y Hem. Aunque el papel del tráfico mitocondrial de hierro en la regulación de la homeostasis celular del metal no es conocido, la evidencia disponible apoya la hipótesis que la mitocondria es un compartimiento central dentro de esta homeostasis.

1.5 Metabolismo mitocondrial del Hierro

La mitocondria juega un papel fundamental en metabolismo de hierro, ya que en su interior se sintetizan los grupos prostéticos Hem y núcleos Fe-S, vitales para la función celular del hierro y su propio mecanismo de regulación (IRP). La regulación del ingreso y contenido de Fe de la mitocondria debería ser muy estricta, pues un aporte insuficiente de hierro tiene efecto en la actividad metabólica y respiratoria del organelo, mientras que un exceso de Fe “libre” o redox-activo dentro de la mitocondria promueve la generación de especies reactivas de oxígeno, generando daño oxidativo.

Al igual que el LIP citosólico, una fracción del Fe que ingresa a la mitocondria permanece asociada a ligandos de baja afinidad, lo que fue definido como pool de hierro lábil mitocondrial (mLIP [44]). De la misma manera que con el LIP citosólico, lo más probable es que la distribución del Fe que ingresa a la mitocondria a las diferentes vías metabólicas ocurre a partir de este mLIP.

Para llevar a cabo la síntesis de los centros Fe-S, se requiere el ingreso de hierro a la matriz mitocondrial. Se ha postulado la existencia de una transferencia directa del Fe proveniente del medio extracelular, lo cual podría ocurrir por asociación física entre el transportador de membrana plasmática DMT1 o algún otro ligando que se asocia al Fe dejándolo de una forma no lábil, o bien entre el endosoma conteniendo el complejo RTf-Tf-Fe y la membrana mitocondrial: la hipótesis “kiss and run” propone el contacto físico directo entre las membranas endosomal y mitocondrial, sin entrada del Fe al LIP citosólico [45].

Cabantchik y cols[46] utilizando quelantes citosólicos con alta afinidad por Fe, propusieron la existencia de un “corredor citosólico” por donde el Fe transita hasta llegar a la mitocondria, sin llegar a formar parte del pool de hierro lábil citosólico, además dejan en evidencia un pequeño retraso en la entrada de Fe al citosol con respecto al ingreso de hierro a la mitocondria, lo que sugiere que la homeostasis de hierro en la mitocondria, podría ser independiente de la homeostasis de Fe en el citosol, lo cual estaría estrechamente relacionado con la necesidad primaria de Fe por parte de la mitocondria, para desarrollar sus funciones de manera óptima.

1.5.1 Transportadores mitocondriales

Durante años se desconocieron las proteínas que estaban involucradas en el ingreso de hierro a la mitocondria, pero ya en el año 2002, Foury y Roganti[47] descubrieron una familia de transportadores mitocondriales: Mrs3p y Mrs4p de *S. cerevisiae*, las cuales son proteínas homólogas que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria. Mrs3p y Mrs4p pertenecen a la familia de transportadores mitocondriales (MCF), cuya función es transportar metabolitos y cofactores entre el citosol y la mitocondria.

En el año 2006, Shaw y cols [48] investigaron desórdenes hematológicos en pez cebra, y confirmaron la existencia de transportadores de Fe, transportadores que fueron conocidos como mitoferrina 1 y 2. Dentro de las mutantes obtenidas, una en particular, la mutación *fris* mostraba un fenotipo de anemia hipocrómica severa a las 36 horas post- fertilización, las pocas mutantes *fris* que sobrevivieron y alcanzaron el estado juvenil (2 meses), presentaron crecimiento retardado y cardiomegalia producto de la anemia hipocrómica. Al realizar un mapeo del locus *fris*, se identificaron las mutaciones que provocaban pérdida de función del gen, cuyo producto génico es la proteína mitoferrina.

Mitoferrina pertenece a la familia de transportadores de solutos en la membrana mitocondrial interna de células eucariontes, SLC25. Se identificó además una proteína que presenta un 65% de identidad aminoacídica identificada como mitoferrina 2. Ambas proteínas presentan cerca de un 38% de identidad con sus ancestros MSR3/4 presentes en levaduras. Tanto en humanos como en ratones se han descrito transportadores homólogos a MSR3/4, pero su función en mamíferos aún no es muy clara .[49]

Una vez dentro de la matriz mitocondrial el Fe puede ser incorporado a la vía de biosíntesis de los núcleos Fe-S [50-51]; ser utilizado en la síntesis de Hem [52]; o bien almacenado en ferritina mitocondrial [53-54]. Una fracción de los núcleos Fe-S es incorporada a proteínas mitocondriales y el resto es exportado hacia el citosol vía el transportador de membrana ABCB7 [55-56], donde se incorpora a apoproteínas. El grupo hem es transportado desde la mitocondria a través del transportador putativo HCP1 (Heme Carrier Protein 1), descrito para ciertos tipos celulares[57].

El transportador ABCB7, pertenece a la familia de los transportadores “half-type ATP-binding cassette” (ABC). La expresión de ABCB7 en levaduras mutantes para el gen *Atm 1* (gen ortólogo a ABCB7 en levaduras) disminuye tanto la acumulación de Fe mitocondrial como el daño al ADN mitocondrial[55]. Mutaciones del gen *abc7* en humanos producen anemia sideroblástica ligada a X con ataxia (XLSA/A), un desorden que se manifiesta con la acumulación de hierro mitocondrial y la formación de agregados de ferritina en los glóbulos rojos (denominados sideroblastos), coherente con la función de exportación de los complejos Fe-S hacia el citosol[58].

1.5.2 Ferritina mitocondrial

Parte del Fe que no es utilizado para la síntesis de núcleos Fe-S puede ser almacenado en la proteína Ferritina Mitocondrial (mFt), la cual es codificada por un gen nuclear sin intrones, y sintetizada como un precursor de 30 kDa destinado a la mitocondria por una secuencia líder de 60 aminoácidos[53]. Esta proteína se ha identificado en humanos, ratones, *Drosophila* y plantas [59-60] .

Se expresa en variados tejidos (islotos de Langerhans, testículos, neuronas) que tienen en común la abundancia relativa de mitocondrias más que alguna función específica relacionada con el metabolismo de Fe. Sin embargo se detectaron altos niveles de expresión en los sideroblastos de pacientes con anemia sideroblástica, cuyas mitocondrias se sobrecargan con hierro por un defecto en la síntesis de Hem[61].

Se ha reportado que defectos en los transportadores o en las proteínas relacionadas con la síntesis de los grupos prostéticos Fe-S y Hem inducen una sobrecarga de hierro mitocondrial, lo cual es altamente tóxico para este organelo que está generando especies reactivas del oxígeno constantemente. Por ejemplo, en el caso de la anemia sideroblástica asociada al cromosoma X (XLSA), donde existe una mutación del gen que codifica la enzima ALAS2 que participa en la síntesis de Hem, los pacientes presentan sideroblastos con depósitos considerables de hierro mitocondrial, el cual se encuentra principalmente almacenado en ferritina mitocondrial[62].

Al sobreexpresar ferritina mitocondrial tanto en líneas celulares murinas[63] como en células HeLa [54], se depletó el LIP citosólico y se detectó un aumento en la expresión del receptor de Tf. El Fe incorporado desde el medio externo se dirige preferencialmente a la mitocondria, a expensas de las necesidades del citosol. Estos antecedentes señalan a mFt con un rol relevante en estados patológicos de acumulación de hierro mitocondrial, y la importancia de la mitocondria en la regulación celular del Fe. Sin embargo, aún hay desconocimiento acerca del intercambio de hierro entre mitocondria y citosol y los mecanismos que lo regulan. Otros investigadores midieron el transporte de Fe a través de la

medición de ^{55}Fe incorporado al grupo Hem y posteriormente haciendo extracción química del Hem- ^{55}Fe , concluyendo que la incorporación de Fe requiere potencial de membrana pero no ATP, solo el Fe^{2+} es funcional para generar Hem, y que el Fe que ingresa no se acumula sino es incorporado al Hem directamente. Este enfoque es novedoso, pero sólo consideró el Fe destinado a síntesis de Hem y no el que se utiliza en los grupos prostéticos Fe-S, se almacena en mFt o forma parte del pool de tránsito, mLIP[52].

Para determinar la compartimentalización y estado redox del Fe en el interior mitocondrial se midió el Fe en mitocondrias aisladas con batofenantrolina disulfonato, un quelante cuya unión a hierro forma complejos coloreados que se siguen espectrofotométricamente, con lo cual se pudo diferenciar el Fe “libre” del que se encuentra unido constitutivamente a proteínas. Esta fue la primera demostración de la existencia en la mitocondria de un “Fe no hem no Fe-S”, disponible en la mitocondria para diferentes usos, como síntesis de grupos prostéticos Fe-S y hem[64]. El desarrollo de sondas fluorescentes que permiten seguir este hierro en células vivas se ha extendido a la mitocondria con la caracterización de sondas con destinación mitocondrial[23]. Este método no invasivo permite determinar concentraciones de Fe en la mitocondria y permite hacer un seguimiento de la cinética de ingreso de Fe a este organelo.

Diversas investigaciones destacan que el flujo de Fe hacia la mitocondria es importante y en casos patológicos, donde la mitocondria falla en la capacidad de incorporar el Fe inorgánico a los grupos prostéticos Fe-S y Hem, la entrada de hierro continúa ocurriendo, incluso a expensas de los niveles citosólicos, es decir, no existe regulación negativa de la entrada [47,

65]. Como en esta patología la acumulación de hierro produce aumento de ROS, daño y disfunción mitocondrial, cabe preguntarse si existen mecanismos que regulen la incorporación y distribución de hierro mitocondrial, en condiciones donde la función de biosíntesis de Fe-S y Hem no está alterada. Además, siendo la mitocondria un sitio de producción fisiológica de especies reactivas, debería haber un sistema de almacenamiento seguro del hierro inorgánico que entra para evitar la reacción de Fenton y la producción del altamente reactivo radical hidroxilo[76]. En esta tesis se determinaron las características de la homeostasis del hierro mitocondrial y su relación con la homeostasis de hierro citosólico en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2. HIPÓTESIS

La mitocondria posee un sistema de regulación de la acumulación de hierro independiente del sistema de regulación citosólico. La homeostasis del hierro mitocondrial tiene preferencia sobre la homeostasis citosólica de tal manera que en condiciones de deficiencia de hierro, la mitocondria capta Fe desde el citosol mientras que en condiciones de exceso limita esta incorporación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el transporte, distribución y homeostasis de hierro en citosol y mitocondrias de células SH-SY5Y.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el proceso de acumulación de hierro total citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe externo.
2. Caracterizar la regulación de los flujos de hierro en citosol y mitocondria respecto al estado de acumulación de Fe extracelular en células SH-SY5Y
3. Caracterizar la regulación de los flujos de hierro en citosol y mitocondria según tiempo de exposición de células SH-SY5Y a ofertas crecientes de Fe
4. Caracterización del efecto de agentes antioxidantes en la regulación de los flujos de hierro en citosol y mitocondria de células SH-SY5Y

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos generales

De Sigma-Aldrich se obtuvo Ponceau S, Tween 20, Triton X-100, inhibidor de proteasas, DTT, PMSF, Chelex 100. De Merck N-N'-Methylenediacrylamine, NaOH, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , KCl, KH_2PO_4 , NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, HCl, EDTA, Glicerol, Glucosa. De Winkler Acrilamida; Tris; glicina. De Invitrogen se obtuvo Benchmark PreStained Protein Ladder

4.1.2 Cultivo Celular

Gibco: Medio Mínimo esencial (MEM), medio de cultivo F-12, aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino (SFB), mezcla de antibióticos/antimicóticos, Tripsina 5 mM EDTA.

De Laboratorio Sanderson se obtuvo agua de calidad inyectable.

4.1.3 Material biológico

La línea celular SH-SY5Y (American Type Culture Collection #CRL-2266, Rockville, MD) es una línea celular derivada de un triple clonamiento (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y) de la línea celular SK-N-SH de células de neuroblastoma[66]. Estas células poseen un único marcador que se encuentra en el cromosoma 1, con una inserción compleja de una copia adicional de un segmento 1q en el brazo largo, que genera una trisomía de 1q. Se ha

reportado que estas células alcanzan confluencia a concentraciones mayores a 1×10^6 células/cm², y que exhiben niveles moderados de actividad dopamina beta-hidroxilasa[67].

4.1.4 Anticuerpos y Western blot

Para el Western blot contra DMT1 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo y como anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific), mientras que para el Western blot contra actina se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma N° Cat. A5441), y anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific).

4.1.5 Fluoróforos

Se utilizó la sonda Calceína-AM (Invitrogen C-3100, Molecular Probes) para detectar el Fe lábil citosólico, mientras que para detectar el hierro lábil mitocondrial, se utilizó la sonda RPA obtenida por síntesis orgánica en el Laboratorio del Dr. Bruce Cassels, del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, U. de Chile, de acuerdo al método de Petrat y cols. (2002)[23].

4.1.6 Equipos

Microscopio confocal, Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Gottingen, Alemania); Lector de placas ELISA SUNRISE (Tecan Trading AG, Suiza); Centrífuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Alemania). Lector de microplacas Sinergy 2, Biotek; Contador de radioactividad Beta, Packard; Fuente de Poder PS 4010-2 (Sigma Aldrich); Cámaras electroforéticas (Bio Rad Laboratories Inc., California, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se mantuvieron en cultivo en incubador a 37°C, con atmósfera de 5% CO₂, de acuerdo a procedimientos rutinarios del laboratorio y del tipo celular [66]. El medio de cultivo utilizado fue MEM: F12 (1:1) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), aminoácidos no esenciales 0.1 mM y antibiótico/antimicótico 1x. Se crecieron por 6-7 días con cambio de medio cada 2 días. La concentración de Fe basal en el medio de cultivo (F12: MEM + 10% SFB), determinada por espectrometría de absorción atómica fue de aproximadamente 7µM.

4.2.2 Tratamientos de células SH-SY5Y con variadas ofertas de Fe extracelular

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de poliestireno con tapa, de 30 o 100 mm de diámetro o placas de 12 o 24 pozos, y fueron mantenidas en cultivo en el medio indicado por 6 días. En estas condiciones, las células alcanzaban un 90-95% de confluencia al cabo de una semana. Al cabo de 2 días se cambió el medio MEM-F12 por medio de cultivo con suero tratado con Chelex-100, para disminuir el contenido de Fe en el medio de cultivo (Concentración de Fe en medio con suero tratado con Chelex: 0,5µM). Este medio se mantuvo por 2 días para posteriormente realizar los tratamientos.

Los tratamientos con hierro se realizaron aportando hierro adicional al medio utilizando el complejo hierro:nitrilotriacetato (Fe-NTA) en una proporción molar 1:2,2. Las concentraciones utilizadas se encontraron en el rango 1 a 20 µM de Fe añadido sobre el

nivel basal del medio (aproximadamente 7 μM). Para inducir la deficiencia de Fe se agregó el quelante de hierro desferroxamina (DFO) para obtener concentraciones finales de Fe 1 y 4 μM [29, 68]. Este quelante reduce la concentración disponible de Fe en el medio de cultivo, y también reduce el contenido intracelular de Fe por ciclos de endocitosis-exocitosis. En otros experimentos, las células se incubaron con distintas concentraciones de Fe más el antioxidante N- acetil cisteína (NAC) 250 μM durante 24 y 48 horas según el experimento.

4.2.3 Preparación de suero fetal de bovino bajo en hierro.

El SFB bajo en Fe fue preparado titulando el SFB con 300 g/L de Chelex 100 a pH 4,5. Luego se incubó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante, para finalmente subir el pH a 7,4 con NaOH, en éstas condiciones se incubo por una noche a 4°C. Con ésta metodología, la concentración de Fe en el medio de cultivo fue 0,5 μM .

4.2.4 Incorporación celular de ^{55}Fe .

La incorporación celular de Fe se midió en las células exponiéndolas a una solución del isótopo radioactivo ^{55}Fe , de concentración y actividad específica conocida. En una medición típica, las células fueron cultivadas por 1 semana en placas de 6 pocillos. Se excluyeron los pozos que alcanzaban menos de 80% de confluencia. La solución de transporte se preparó inmediatamente antes del ensayo, agregando al buffer o medio de cultivo la cantidad suficiente de stock radioactivo para una concentración final de 0,5 μM $^{55}\text{FeCl}_3$. El hierro total de la solución se llevó a 10 μM agregando hierro frío no radiactivo (9,5 μM), en forma de Fe-Ascorbato (1:20) o Fe-NTA (1:2,2), a partir de un stock 1 mM de FeCl_3 en HCl 0,01 mM. Las células se despegaron agregando Tris salino-EDTA, dejando a 37°C por 5 min y

soltando con pipeteo suave. La suspensión celular se utilizó para determinación de proteína total por el método del ácido bicinonínico y medición de radioactividad en contador de centelleo líquido[29, 68].

4.2.5 Western blot

Para preparar los extractos celulares, las células SH-SY5Y expuestas a diferentes ofertas de Fe se disgregaron de la placa de cultivo con Tris salino-EDTA mediante la incubación por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron colectadas por centrifugación a 600 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en Buffer de Lisis (50 µL/1x10⁶células) formado por una solución tampón de lisis (NP-40 0,5%, HEPES 10 mM/pH 7,5; MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, PMSF 1 mM, glicerol 5%, DTT 1 mM, que contenía un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,7 µg/ml) (100:1 [v/v]) e incubado en hielo por 15 minutos. El homogenizado fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos, y se almacenó el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas mediante el método del Ácido bicinonínico (BCA)[69].

Para la separación electroforética, se cargaron 20 µg de proteína en un gel de acrilamida al 10%, en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1,5 horas a 300 mA y 4°C. Luego de la transferencia, la membrana fue teñida con Ponceau-S para determinar si efectivamente se realizó la transferencia de proteínas. Luego la membrana se lavó durante 5 minutos en agitación con TBS-T20 (Tris-HCl pH 7, NaCl 150 mM y Tween-20 0,2%) para

eliminar el Ponceau-S. Posteriormente la membrana fue bloqueada con el buffer TBS-T20 con 5% de leche descremada durante 1 hora con agitación suave a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario contra las proteínas DMT1 y actina se realizó durante toda la noche a 4°C y agitación suave. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T20 para eliminar el anticuerpo primario unido inespecíficamente a la membrana. A continuación se incubó durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo o anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano en leche descremada 0,5% en solución TBS-T20. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T20, y se reveló usando el kit quimioluminiscente y autorradiografía (Pierce). La señal quimioluminiscente se detectó mediante placas fotográficas (Kodak)

4.2.6 Preparación de fracciones mitocondrial y citosólica.

Se siguió el protocolo descrito por Vance [78]: las células SH-SY5Y se crecieron durante 2 días en medio de cultivo normal, luego se cambió por medio de cultivo con suero bajo en Fe, y se mantuvieron con este medio por 2 días, hasta que alcanzaron un 90% de confluencia (15×10^6 células), luego fueron expuestas a diversas ofertas de Fe (1,4, 7, 10 y 20 μM) durante 24 horas. Las células fueron disgregadas desde la placa de cultivo con Tris salino-EDTA mediante una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron colectadas por centrifugación a 600 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células 3 veces con PBS frío, centrifugando a 600 x g durante 5 minutos entre cada lavado. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 1,5 mL de Buffer de Extracción 1x (HEPES 10 mm/pH 7,5; manitol 200 mM, sacarosa 70 mM y

EGTA 1 mM) que contenía 15 μ L de un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 0,5 μ g/ml, pepstatina 0,7 μ g/ml, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) e incubado en hielo por 15 minutos. Después de 10-15 minutos se extrajeron volúmenes de 20 μ L para determinación de contenido de hierro total y determinación de concentración de proteínas. Las células se rompieron con 50-60 golpes de homogenizador Dounce y el homogenizado se centrifugó a 600 x g por 10 min a 6°C. El sobrenadante se traspasó a otro tubo y se centrifugó a 11.000 x g por 10 minutos a 6°C. El precipitado se considera la fracción mitocondrial y el sobrenadante la fracción citosólica. La fracción mitocondrial se lavó y suspendió en buffer de extracción sin inhibidor de proteasas, se centrifugó a 11.000 x g a 6°C durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet mitocondrial en 150 μ L de buffer de almacenamiento 1x (HEPES 10 mM/pH 7,5, sacarosa 250 mM, ATP 1 mM, ADP 80 mM, succinato de sodio 5 mM, KH_2PO_4 2 mM y DTT 1 mM) y fue almacenado junto con la fracción citosólica a -20°C. De acuerdo a antecedentes de nuestro laboratorio, con éste procedimiento se obtuvieron fracciones enriquecidas de mitocondrias, como fue posible observar al detectar proteínas mitocondriales mediante western blot.

4.2.7 Determinación de hierro celular total.

Para estos experimentos, las células se lavaron 3 veces con PBS, se despegaron en frío con Tris salino con EDTA y se trabajaron en hielo en todo el proceso. Tras centrifugación a 1300 x g, el pellet celular se lavó con Tris salino sin EDTA y se volvió a centrifugar, luego se resuspendió en un volumen no mayor a 50 μ L de Tris salino sin EDTA. Para la determinación de hierro en las fracciones subcelulares se realizó el fraccionamiento tal como se describió en la sección correspondiente, y se utilizaron soluciones tratadas con

Chelex. El contenido de Fe celular y en fracciones mitocondrial y citosólica se midió en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (Sigma 6100, Perkin Elmer) (Dr. Miguel Arredondo, laboratorio de Micronutrientes, INTA, Universidad de Chile), tras lisis con ácido nítrico concentrado a 60 °C por 12 horas. Se utilizó como control interno MR-CCHEN-002 (*Venus antiqua*) y DOlt-2 (*Dogfish liver*) para validar las determinaciones de hierro[70]. El resultado se expresó como nmol Fe/mg proteína total.

4.2.8 Determinación del LIP citosólico

Las células, cultivadas en placas de cultivo de poliestireno con tapa, de fondo plano (Corning o NUNC) de 12 y 24 pocillos, se lavaron con PBS, y luego se incubaron por 10 min a 37°C con el éster no fluorescente acetoximetil calceína CA-AM (Invitrogen C-3100, Molecular Probes) en concentración final 0.25 µM en buffer HBSS-Glucosa pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, glucosa 5 mM) y el quelante de Fe extracelular DTPA 200 µM. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS, y se dejaron 5 min adicionales en el incubador con solución HBSS-Glucosa fresca, para permitir la hidrólisis completa de la sonda por las esterasas citosólicas. Antes del ensayo se agregó HBSS fresco a 37°C. La cuantificación de la fluorescencia se registró en lector de microplacas (Sinergy 2, Biotek) con control de temperatura (37°C) con filtros de excitación 480/20 nm y emisión en 530/20 nm. Se registró la fluorescencia basal de cada pocillo por 5 minutos a intervalos de 30 segundos entre cada lectura. Luego se agregó DFP 400 µM, quelante hidrofílico y permeable a la célula, y se siguió el aumento de fluorescencia por 15-

20 min. La diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada al agregar el quelante y la fluorescencia basal es proporcional a la magnitud del Fe^{2+} reactivo del citosol, LIP[17].

4.2.9 Determinación del LIP mitocondrial

Para evaluar la magnitud del pool de Fe lábil se utilizó la sonda RPA, que se acumula específicamente en mitocondria. Las características fluorescentes del RPA están dadas por la rodamina, la que por su carga positiva da la destinación mitocondrial. Además, el componente 1,10-fenantrolina le da capacidad de unión a Fe^{2+} (Fe: RPA 1:3)[46]. Al unir Fe, el RPA disminuye su fluorescencia, la que puede ser recuperada agregando un quelante con alta afinidad por Fe. Durante el desarrollo de esta tesis se utilizó el quelante DFP, el cual accede a la mitocondria quelando el hierro lábil presente.

La carga con RPA se realizó por 10 min en el incubador a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ con RPA $0,5 \mu\text{M}$ en HBSS con glucosa 5 mM, pH 7,4. Tras remover la solución con sonda, y lavar con HBSS 2 veces, se agregó HBSS-Glucosa 5 mM con BSA 1 mg/mL, para remover RPA adsorbido inespecíficamente a la placa. Se dejó esta solución por 5 min y luego se lavó con HBSS-glucosa, antes del ensayo se agregó HBSS fresco a 37°C .

Para asegurar que el hierro que se está detectando corresponde a hierro presente en la mitocondria y no a hierro citosólico, las células fueron permeabilizadas con digitonina $20 \mu\text{M}$ durante 1 minuto. La digitonina es una saponina proveniente de *Digitalis purpurea*, permeabiliza la membrana plasmática sin pérdida de la estructura celular y la función mitocondrial [79]. Brevemente, las células marcadas con sonda se lavaron con PBS 2 veces y

luego se incubaron a 37°C en 5% CO₂ por 1,5 minutos con el buffer de permeabilización (HEPES-Tris 20 mM pH 7,2, KCl 120 mM, NaCl 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, antipaína, leupeptina y pepstatina 1 µg/mL y digitonina, 10 µg/10⁶ células), tras lo cual se removió el mismo, se lavó suavemente con buffer de permeabilización sin digitonina y se resuspendió en buffer de permeabilización sin digitonina. Posteriormente, se trasladaron rápidamente al lector de fluorescencia estabilizado a 37°C para realizar los experimentos. La medición de la fluorescencia se efectuó en un lector de microplacas con control de temperatura (37°C) con filtros de excitación 530/20 nm y emisión en 590/30 nm. Se registró la fluorescencia basal de cada pozo por 5 min a intervalos de 30 seg entre cada lectura. A juzgar por el patrón de marcación con RPA, el potencial de membrana mitocondrial no fue afectado ya que la sonda permaneció en la mitocondria, lo que ocurre sólo si esta conserva su potencial.

Para experimentos de ingreso de hierro a la mitocondria, se usó FAS 40 µM. El FAS es una forma de Fe²⁺ no complejado a quelantes. Esta solución es conocida por su biodisponibilidad, pero en soluciones a pH neutro es poco estable, se oxida y forma precipitados férricos. Por esto, es necesario utilizar soluciones preparadas recientemente y en experimentos con tiempos cortos (< 1 h). Para determinar acumulación de Fe lábil mitocondrial se usó DFP 400 µM – quelante específico de Fe[71] y con acceso a compartimentos sub-celulares. Un resumen del procedimiento es como sigue: a) carga con la sonda fluorescente RPA; b) permeabilización con digitonina; c) determinación de línea base (5 min); d) adición de FAS y seguimiento de la fluorescencia por 20 min, y e) tratamiento con el quelante de hierro para la restauración máxima de la fluorescencia. Se siguió el restablecimiento de la fluorescencia por 10-15 min. La diferencia entre la

fluorescencia máxima alcanzada tras agregar el quelante y la fluorescencia basal es proporcional a la magnitud del mLIP[22].

4.2.10. Tasa de incorporación de Fe citosólico y mitocondrial.

Para determinar la tasa de incorporación de Fe a citosol y mitocondria, células SH-SY5Y fueron cargadas con las sondas calceína o RPA, respectivamente, se siguió la fluorescencia basal como se describió anteriormente, y luego se agregó sulfato de hierro amonio (FAS) 40 μM . Se registró el descenso de la fluorescencia para ambas sondas, hasta que ésta se mantuvo constante, con el fin de determinar la velocidad de ingreso de Fe, luego se agregó el quelante DFP que permitió determinar el contenido de hierro lábil para cada condición. Los valores obtenidos se graficaron utilizando el programa Prism de GraphPad. La tasa de incorporación se determinó realizando un ajuste exponencial simple de las pendientes correspondientes a cada descenso de fluorescencia.

4.2.11 Microscopía

Se aplicó el mismo procedimiento de carga de las sondas para seguir cambios de fluorescencia para la visualización de las células en el microscopio confocal de fluorescencia. Las células para microscopía se sembraron en placas de 35 mm y se procedió a observar con microscopio confocal (LSM META510, Carl Zeiss) con lente Plan-Apochromat 63X/1.4. Para cada inmunolocalización se utilizó una apertura de 370 μm y se obtuvieron apilamientos de cortes ópticos de 0,92 μm cada uno y se proyectaron entre 9 y 10 imágenes para obtener la foto final.

4.2.12 Análisis estadísticos

Las determinaciones de proteína, radioactividad y Fe total, fueron realizadas en duplicado y se repitieron los experimentos en por lo menos tres corridas independientes. Cuando se trabajaron células en microplacas de 12 o 24 pocillos, los resultados provienen de los promedios de triplicados de por lo menos tres experimentos independientes. Para analizar las diferencias entre promedios con ANOVA (una o dos vías) o prueba t de Student, se utilizó el programa GraphPad, versión 4.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego CA). Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Distribución subcelular de Fe al equilibrio

Se determinó el efecto del aumento en la oferta de hierro extracelular en su acumulación y distribución sub-celular. Para esto, se cultivaron células SH-SY5Y con medio bajo en hierro durante 2 días, para detectar los cambios en contenido de Fe asegurando que nuestra condición basal ($0,5\mu\text{M}$) es menor a la primera condición de tratamiento ($1\mu\text{M}$). Al cabo de ese tiempo el medio se cambió por medio fresco con diferentes ofertas de hierro ($1,4,7,10$ y $20\mu\text{M}$), se incubó por 24 horas y se determinó el contenido de Fe en citosol, mitocondria y en célula total mediante espectrometría de absorción atómica (Figura 2).

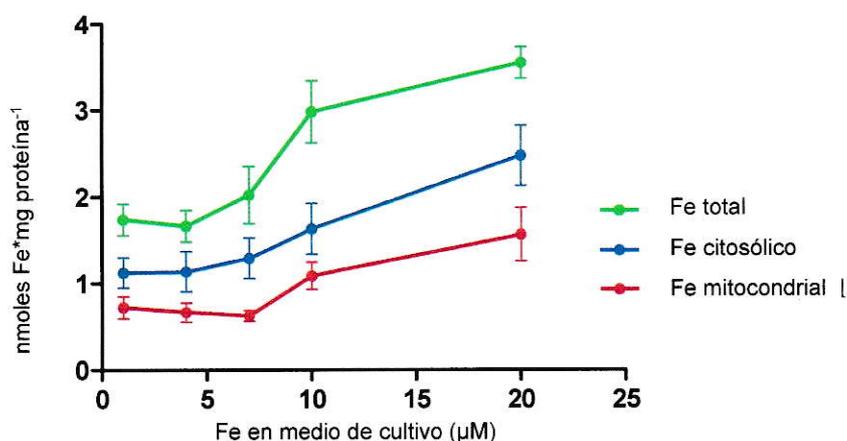


Figura 2. Distribución subcelular de Fe en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 24 horas a diversas ofertas de Fe. Luego fueron disgregadas con Tris salino-EDTA, y se realizó fraccionamiento subcelular como se describió en los métodos. El contenido de Fe se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica y los resultados se expresaron en nmoles de Fe/mg de proteína total. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicados.

Se observó que el contenido de hierro total, citosólico y mitocondrial no varió significativamente entre 1 y $4\mu\text{M}$. A la concentración de Fe externo $7\mu\text{M}$ se observó un

aumento pequeño en el hierro citosólico sin un cambio observable en el contenido de hierro mitocondrial. Incrementos de la concentración de hierro extracelular en el rango 7-20 μM indujeron un aumento sostenido tanto del hierro citosólico como del mitocondrial sin diferencias significativas en las tasas de aumento (pendientes: citosol: 0.079 ± 0.011 ; mitocondria: 0.062 ± 0.022).

5.2. Incorporación de ^{55}Fe en células SH-SY5Y – Efecto del tratamiento previo con diferentes concentraciones de Fe.

Para determinar si los niveles de hierro intracelular afectan la entrada de hierro a las células, se cultivaron células SH-SY5Y durante 6-7 días con diversas ofertas de hierro extracelular y se determinó entonces la incorporación de hierro radioactivo (^{55}Fe) por 1 h. En condiciones de cultivo en un medio con Fe 1 μM , la incorporación de ^{55}Fe fue el mayor valor determinado (Figura 3A). Esta incorporación fue disminuyendo a medida que aumentó la oferta extracelular de hierro. Este comportamiento en la incorporación de hierro fue concordante con la expresión del transportador DMT1 (Figura 3B). En condiciones de deficiencia de Fe, en la que habría un posible aumento en los requerimientos por éste metal, la expresión del transportador DMT1 fue la más elevada. A medida que la concentración de hierro en la etapa de cultivo previo aumentó, la expresión de DMT1 disminuyó. La clara disminución en la expresión del transportador se confirmó al realizar el análisis cuantitativo de ésta expresión, utilizando como control de carga en el Western blot la proteína actina (Figura 3B).

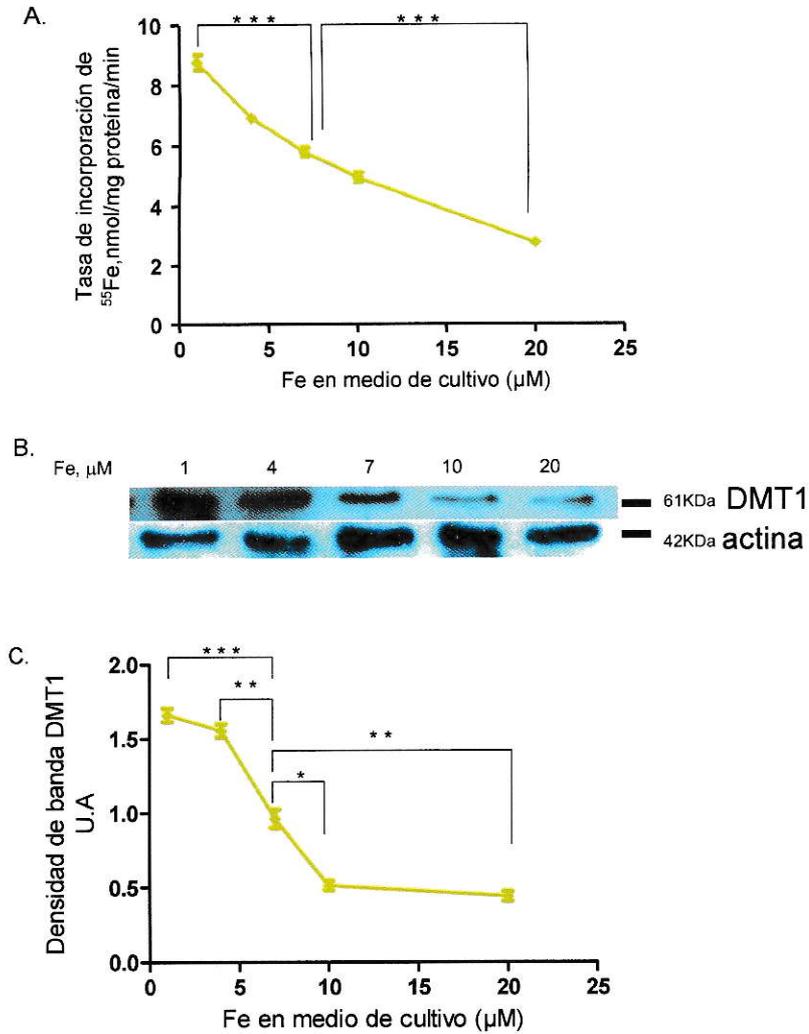


Fig. 3. Incorporación de ⁵⁵Fe en células SH-SY5Y – Efecto del tratamiento previo con Fe. (A): Las células fueron cultivadas por 6 días con las concentraciones de Fe indicadas, se eliminó el medio de cultivo y se realizó el ensayo de incorporación de hierro incubando las células por 1 hr con ⁵⁵Fe-FAS 5 µM en medio DMEM. Valores son promedios de 3 experimentos independientes en triplicado ± DE. Se determinó la expresión del transportador DMT1 mediante Western Blot (B), y se cuantificó la densidad de banda (C). Para el control de carga se realizó el Western Blot anti actina. (ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05).

5.3 Detección del pool de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y mediante el uso de sondas fluorescentes.

Dada la importancia de la regulación del contenido de Fe en términos de homeostasis celular, y del potencial daño oxidativo que puede causar la presencia de Fe lábil o reactivo, se estudió la cinética y magnitud de la fracción de Fe lábil citosólico y mitocondrial, cLIP y mLIP utilizando las sondas calceína-AM y RPA respectivamente. Ambas sondas disminuyen drásticamente su fluorescencia al quelar hierro lábil. Estudios previos han reportado que calceína se distribuye en el citosol[17] y en menor medida en lisosomas y mitocondria; mientras que la localización de RPA se ha determinado como exclusivamente mitocondrial[23]. Para corroborarlo, se observaron células marcadas con calceína o RPA por microscopía confocal (Figura 4). Calceína se distribuyó ampliamente y en toda el área celular (Fig. 4A), y su fluorescencia disminuyó drásticamente al agregar hierro en forma de sulfato de hierro amonio (FAS) 40 μ M (Fig.4B), mientras que la marca de RPA se aprecia como perinuclear (Fig.4C) y disminuye al agregar la misma concentración de FAS (Fig.4D).

Con estos controles realizados, se utilizaron estas sondas para estimar los cambios de magnitud de los compartimentos citosólico y mitocondrial de Fe en respuesta a la oferta extracelular y registrar la entrada de Fe a estos compartimentos, para evaluar la existencia de una regulación mediada por el Fe celular.

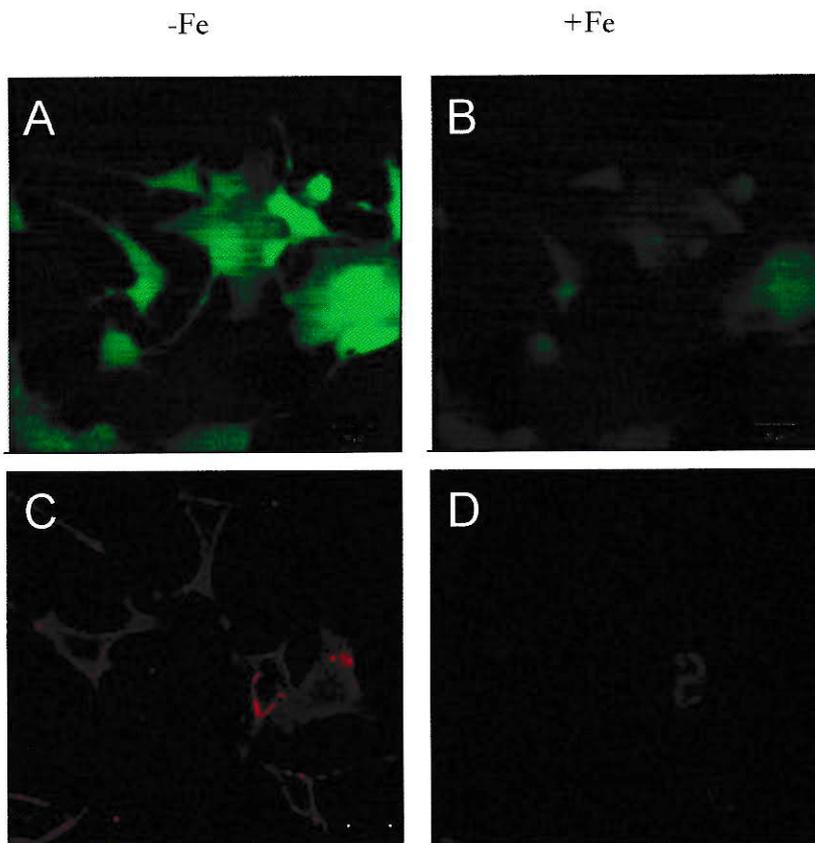


Figura 4. Localización intracelular de los sensores de metales calceína y RPA en células SH-SY5Y y su susceptibilidad a hierro. Se muestra la localización y fluorescencia de calceína en estado basal (A) y después de un estímulo de 40 μM FAS (B), donde se observó una drástica disminución de la fluorescencia. Lo mismo ocurrió con la fluorescencia de RPA, de localización principalmente mitocondrial (C) y sensible a FAS el cual produjo su apagamiento (D).

5.3.1 Detección de la magnitud de cLIP por recuperación de fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.

Se determinó la magnitud de Fe lábil citosólico en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con concentraciones de Fe crecientes (1, 4, 7, 10 y 20 μM). Se cargaron las células con la sonda calceína y luego se registró la fluorescencia basal en el lector de microplacas durante 5 minutos. Se agregó el quelante específico de Fe, DFP para recuperar la fluorescencia. De éste modo, la magnitud de la fluorescencia recuperada es directamente proporcional al Fe lábil para cada oferta de Fe extracelular (Figura 5A). En la Figura 5B, se

observa una diferencia significativa en la fluorescencia inicial para condiciones de deficiencia ($1\mu\text{M}$) y la condición control, lo que indica que la magnitud de Fe lábil citosólico es función de la concentración a la cual fueron expuestas las células, con tendencia a estabilizarse a concentraciones en el rango $10\text{-}20\ \mu\text{M}$ de hierro. En la figura 5C, el contenido de Fe lábil citosólico se evidencia por el aumento de fluorescencia al agregar un quelante con mayor afinidad por hierro que calceína, lo que resulta en la recuperación de la fluorescencia de ésta. La recuperación de la fluorescencia es directamente proporcional al pool de hierro lábil citosólico. Nuevamente, se observa que el pool de hierro lábil es proporcional a la concentración de hierro extracelular durante la etapa de pre-incubación, con una tendencia a estabilizarse a concentraciones de hierro entre 10 y $20\ \mu\text{M}$.

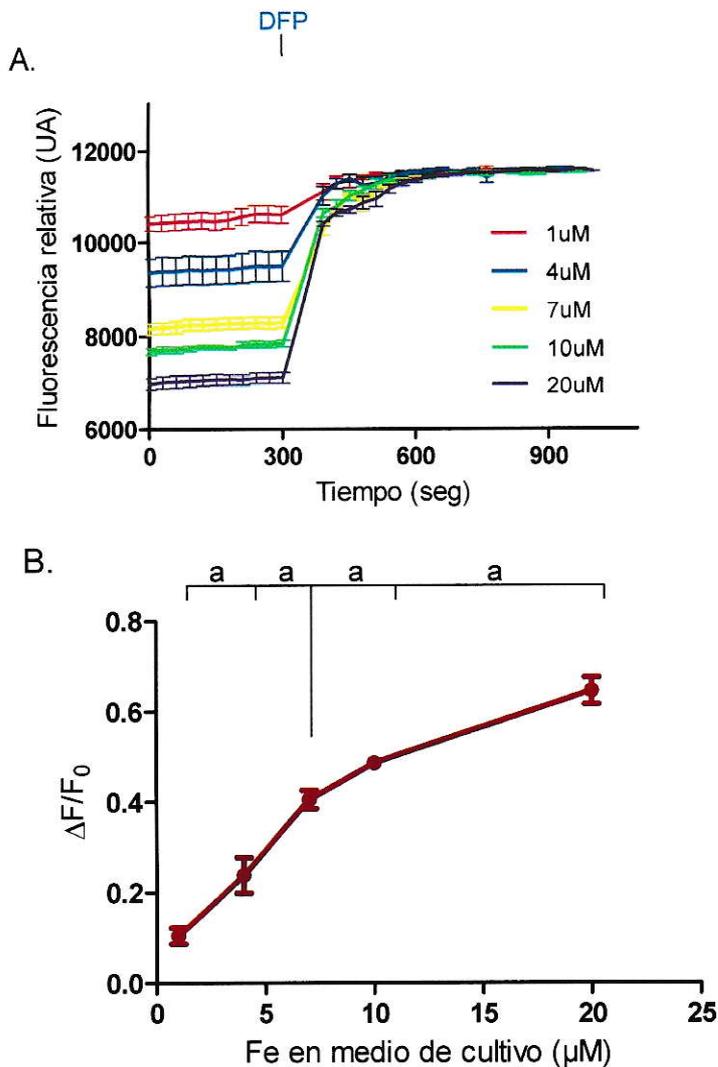


Figura 5. Recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Las células SH-SY5Y fueron sembradas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron con la sonda calceína-AM y se registró la fluorescencia inicial (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró el cambio de fluorescencia durante 10-12 minutos (Fig A). Se determinó el delta de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) para cada condición (B). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

El conjunto de estos resultados indica que a las 24 horas de exposición, la magnitud del pool de hierro lábil citosólico tiende a estabilizarse, probablemente debido a que se han gatillado mecanismos de regulación para evitar que éste Fe potencialmente citotóxico

interactúe con especies como H_2O_2 , formando radicales libres mediante la reacción de Fenton.

5.3.2 Detección de la magnitud de cLIP por recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe.

Siguiendo la misma metodología descrita para el experimento anterior, las células SH-SY5Y fueron expuestas durante 48 horas a diversas ofertas de hierro, con el fin de determinar si aún la célula es capaz de mantener relativamente constantes los niveles de cLIP, como los observados a las 24 horas. De igual manera que en el tratamiento durante 24 horas, se observa una diferencia significativa en la fluorescencia inicial en condiciones de deficiencia y sobrecarga de Fe (Figura 6). En células con ofertas de Fe mayores a la condición control ($7 \mu M$), las fluorescencias iniciales son considerablemente menores que en el tratamiento por 24 horas, lo que da cuenta de un aumento en el cLIP como resultado del mayor tiempo de exposición a ofertas de Fe externo (Figura 6A y 6B). Bajo estas condiciones no se observó la estabilización entre 10 y $20 \mu M$ de hierro observada en tratamientos durante 24 horas, lo que indica que a tiempos prolongados de exposición a Fe, las células pierden la capacidad de mantener el cLIP a niveles constantes.

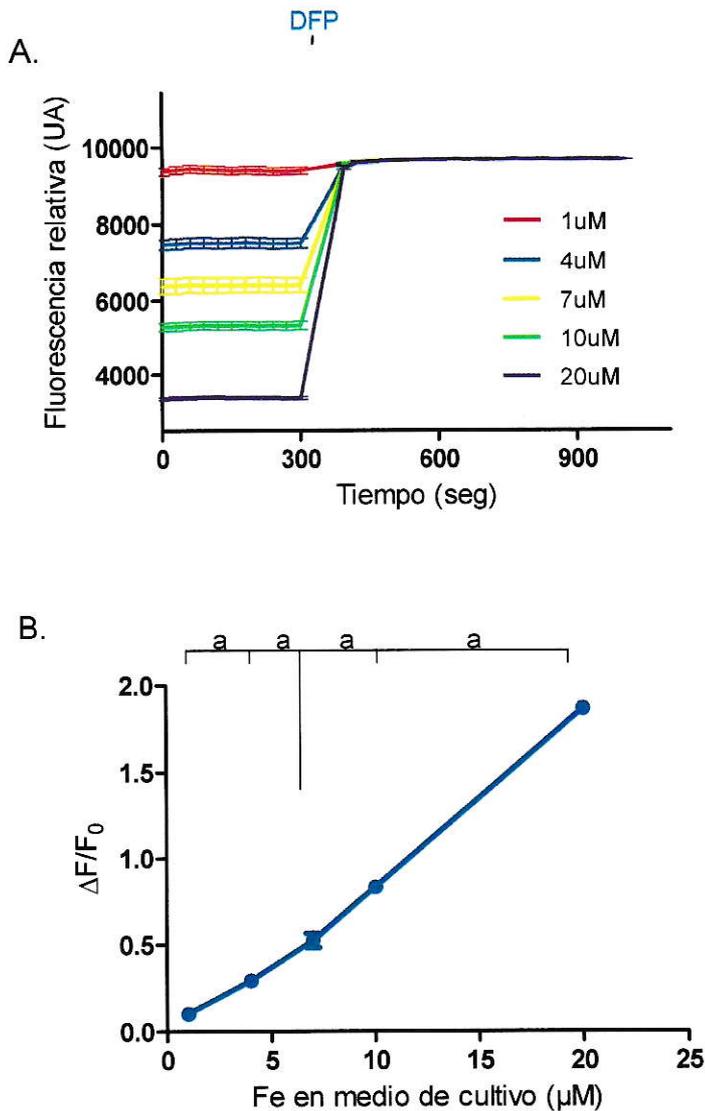


Figura 6. Recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe. Las células SH-SY5Y fueron sembradas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda calceína-AM y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μ M y se registró la recuperación de la fluorescencia de la sonda durante 10-12 minutos (A). Se determinó el delta de fluorescencia para cada condición (B). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μ M).

5.4 Participación de agentes oxidantes en la magnitud del cLIP en células SH-SY5Y.

5.4.1 Detección de la magnitud de cLIP por recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.

En células eucariontes, la homeostasis celular de Fe es regulada de forma post transcripcional por las proteínas IRP-1 e IRP-2, las cuales se unen a elementos IRE de ARN mensajeros de proteínas relacionadas con transporte y almacenaje de hierro (DMT1, ferritina) regulando su degradación de acuerdo a los requerimientos de hierro en la célula.

Como se mencionó anteriormente, el hierro es capaz de reaccionar con peróxido de hidrógeno, y esta reactividad está estrechamente ligada a la generación de especies reactivas del oxígeno, el stress y el daño oxidativo. Antecedentes de Pantopoulos y Hentze (1998) evidencian que células expuestas a peróxido de hidrógeno reducen la síntesis de la proteína almacenadora de hierro ferritina, y estimulan la expresión del mRNA del receptor de Tf (RTf), siendo ambas respuestas post traduccionales, y cuyo origen se debe al desensamblaje del grupo prostético 4Fe-4S presente en la proteína IRP-1. Dados éstos antecedentes, y considerando una posible desregulación de IRP-1 por estrés oxidativo, se hizo interesante indagar acerca del efecto de agentes antioxidantes en el contenido de hierro lábil tanto en citosol como en mitocondria, con respecto a la oferta externa y a la duración de la exposición de éstas células a las distintas ofertas de Fe.

Con el fin de indagar acerca de cuál es la participación de agentes oxidantes en la regulación de Fe lábil en el citosol, células SH-SY5Y fueron incubadas durante 24 horas con diversas concentraciones de Fe junto con el antioxidante N-acetil cisteína (NAC); esta molécula es un análogo y precursor de glutatión reducido, el cual es el antioxidante celular por excelencia.

Al exponer a células SH-SY5Y a NAC 250 μM , observamos que existe una disminución en la magnitud del cLIP al comparar con tratamientos de Fe pero sin NAC. En condiciones de cultivo con Fe 20 μM , el valor de $\Delta F/F_0$ obtenido en la presencia de NAC (0.09; Fig. 7C) se compara favorablemente con el valor obtenido en ausencia de NAC (0.6; Fig. 5C). Estos resultados indican que podría existir la participación de agentes antioxidantes en la regulación del cLIP.

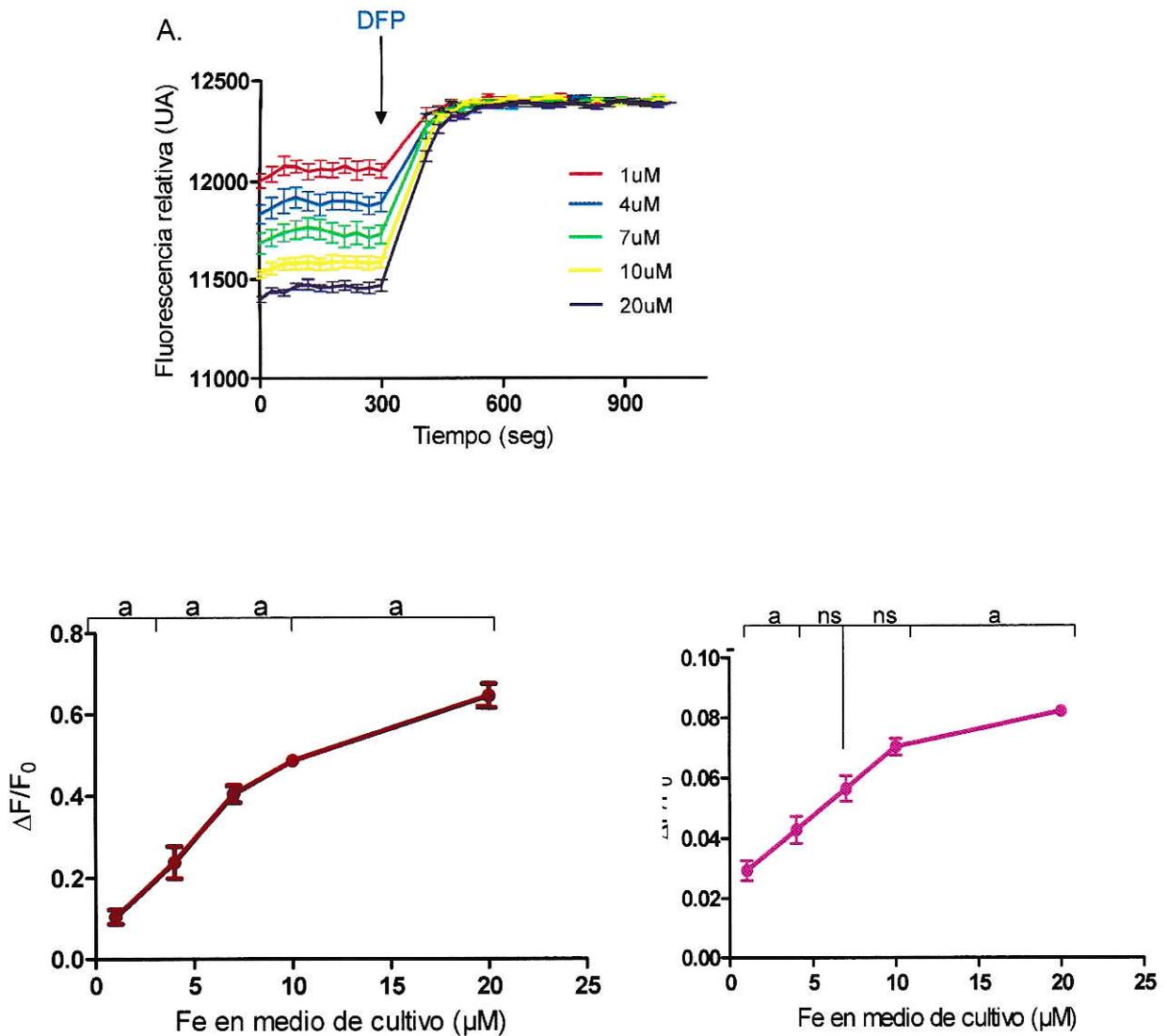
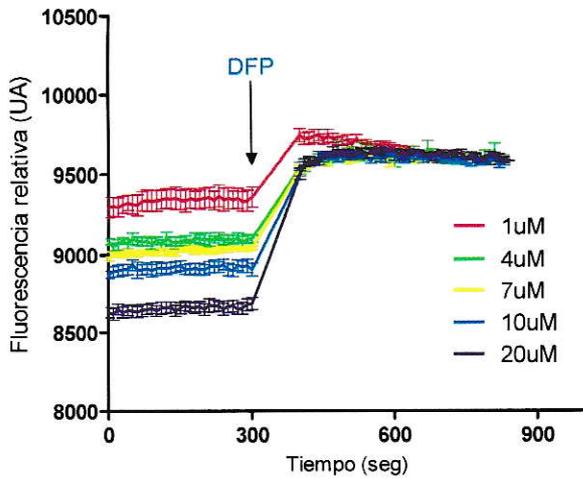


Figura 7. Recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe y la molécula antioxidante NAC. Las células SH-SY5Y fueron sembradas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe junto con NAC 250 μM . Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda calceína-AM y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró la recuperación de fluorescencia de la sonda durante 10-12 minutos (Fig A). Comparación de resultados de tratamientos sin NAC (B) vs tratamientos agregando NAC a cada condición (C). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

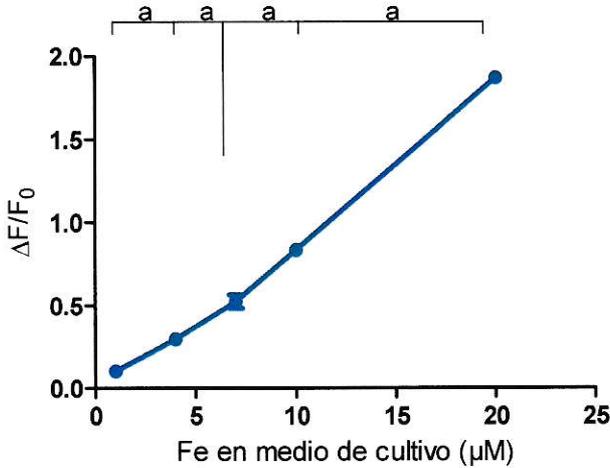
5.4.2 Detección de la magnitud de cLIP por recuperación de la fluorescencia de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe. Participación de mecanismos antioxidantes.

Para determinar si agentes oxidantes podían ayudar a mantener un cLIP bajo a un mayor tiempo de exposición, se prolongó el tratamiento de Fe durante 48 horas, condiciones en la que habíamos observado una franca desregulación de los niveles de cLIP. Al registrar la fluorescencia basal de células SH-SY5Y sometidas por 48 horas a distintas concentraciones de Fe junto con una dosis de NAC 250 μ M (Fig. 8A). Se observó que en presencia de NAC el contenido de hierro lábil citosólico disminuyó notoriamente (Fig. 8C), en comparación con el tratamiento en ausencia de NAC (Fig. 8B). Estos resultados sugieren que estímulos oxidantes desregulan la concentración del pool de hierro lábil citosólico.

A.



B.



C.

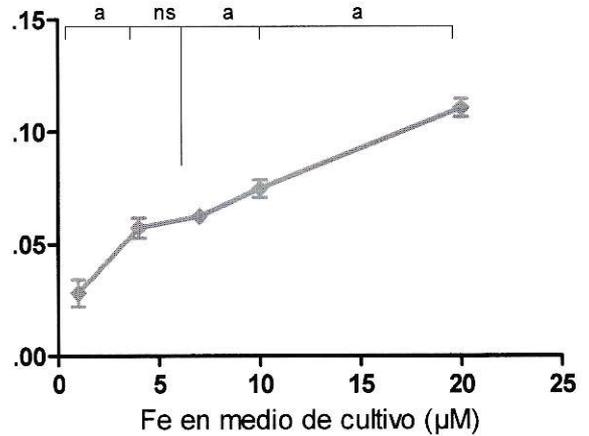


Figura 8. Recuperación de fluorescencia de de calceína en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe y la molécula antioxidante NAC. Las células SH-SY5Y fueron sembradas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe junto con NAC 250 μ M. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda Calceína-AM y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μ M y se registró la recuperación de fluorescencia de de la sonda durante 10-12 minutos (Fig A). Comparación de resultados de tratamientos sin NAC (B) vs tratamientos agregando NAC a cada condición (C). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μ M)

5.5 Tasa de incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y

5.5.1 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y con tratamiento de distintas ofertas de Fe durante 24 horas.

Nos pareció interesante otro aspecto relacionado con la dinámica del Fe lábil citosólico: el saber cómo varía la tasa de incorporación de éste metal como función del contenido del cLIP. Con este propósito, células SH-SY5Y fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones de Fe extracelular 1, 4, 7, 10 y 20 μM . Luego de este tiempo, se incubaron con calceína-AM 0,25 μM en un medio sin hierro y se registró la fluorescencia basal de calceína durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo se agregó hierro en forma de sulfato de hierro amonio (FAS) 40 μM , y se registró durante 15 minutos la caída de fluorescencia de calceína por aumento del cLIP. Luego se agregó el quelante de Fe DTPA para descartar fluorescencia extracelular, se registró la fluorescencia por unos minutos, y luego se agregó el quelante permeable a membranas DFP, que permite recuperar la fluorescencia de calceína (Figura 9 A). Los datos obtenidos nos indican que frente a un incremento en la oferta extracelular de hierro, la tasa de incorporación de éste disminuye, lo que indica que el ingreso de Fe a la célula está condicionado por la necesidad del metal, sin embargo, a concentraciones de Fe 20 μM , la entrada de hierro continúa ocurriendo, a pesar de la disminución de la expresión del transportador DMT1 (Fig. 2B), lo que nos indica que no existe regulación negativa estricta de la entrada de hierro. Esta situación favorece la acumulación de Fe en células expuestas a altas concentraciones de éste metal.

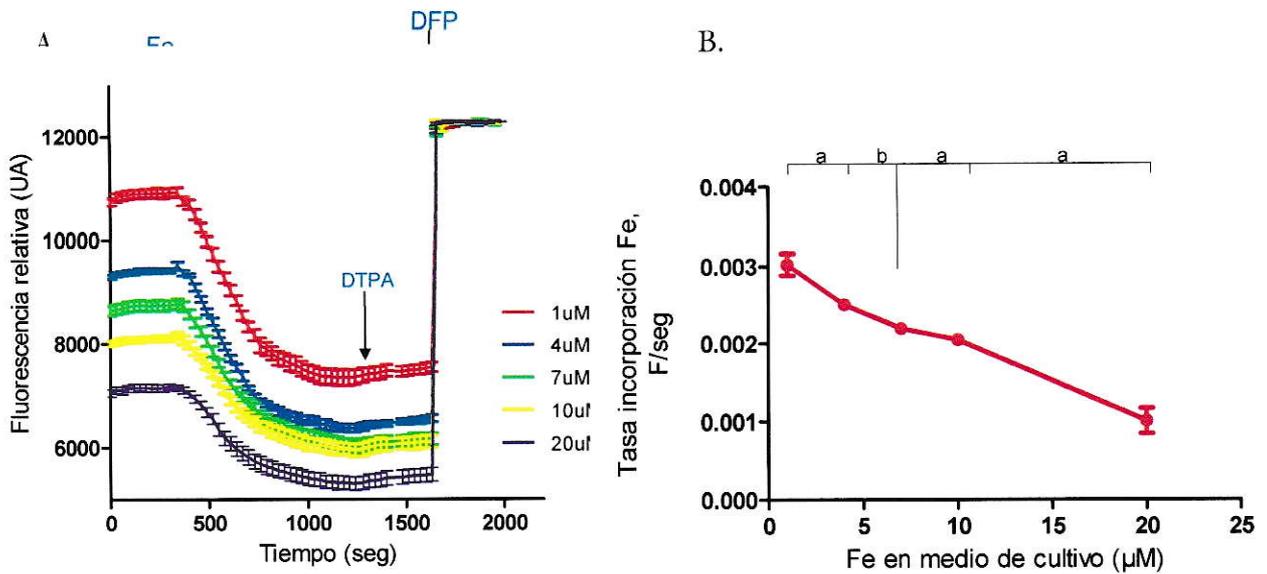


Figura 9. Detección de la incorporación de hierro al cLIP por pérdida de fluorescencia de calceína en células expuestas a distintas concentraciones de Fe durante 24 horas. Las células fueron cargadas con calceína (CA) y la cuantificación de la fluorescencia a 37 °C se registró con un lector de fluorescencia para microplacas (excitación 480 nm, emisión 530 nm). Se registró la fluorescencia basal de cada pozo por 5 min a intervalos de 30 segundos. Se agregó 40 µM sulfato ferroso de amonio (FAS) y se siguió el apagamiento de la fluorescencia de CA durante 15 min con lecturas aproximadamente cada 30 segundos. La diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada y la basal es proporcional a la magnitud del Fe²⁺ reactivo del citosol (cLIP). Posteriormente se agregó 1 mM del quelante de hierro no permeante DTPA, para eliminar la contribución de CA extracelular y después 400 µM del quelante permeable a la membrana DFP (Fig. 9A). DFP sustrae Fe de la CA recuperando ésta la fluorescencia apagada por su unión. En la Figura 9B se grafica la tasa de incorporación de Fe por segundo. Los valores son promedios ± DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) p<0,001; (b) p<0,01; (c) p<0,05. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 µM)

5.5.2 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y con tratamiento de distintas ofertas de Fe durante 48 horas.

Para determinar cómo influye el tiempo de exposición a diversas ofertas de Fe extracelular en la tasa de incorporación de Fe y en el contenido de Fe lábil, células SH-SY5Y fueron incubadas durante 48 horas utilizando el mismo diseño del experimento anterior. Al igual que las células sometidas a tratamiento durante 24 horas, la incorporación de Fe disminuyó a medida que aumentaba el Fe extracelular, aunque de manera más drástica, probablemente debido a la prolongada exposición. Al igual que en la incubación por 24 horas, la incorporación de hierro al citosol nunca llega a niveles cero a pesar de mantener tratamientos prolongadas a altas concentraciones de Fe (Figura 10B).

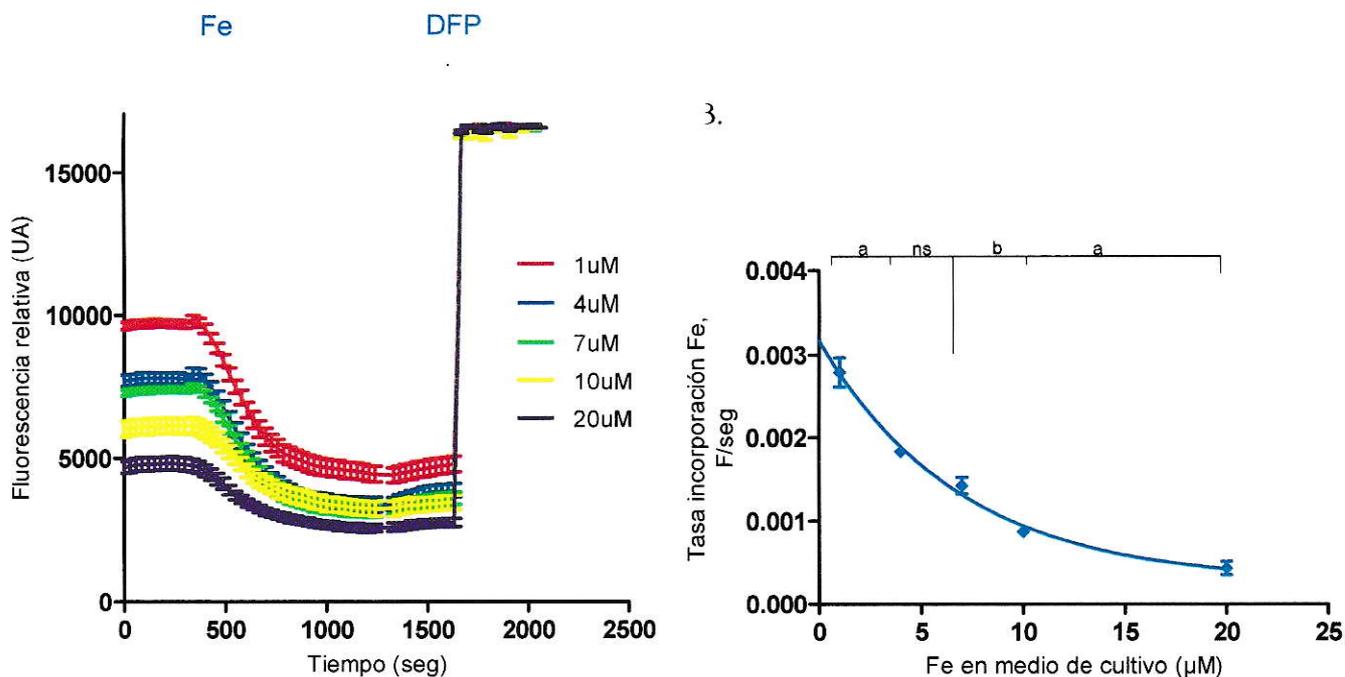


Figura 10. Detección de la incorporación de hierro al cLIP por pérdida de fluorescencia de calceína en células expuestas a distintas concentraciones de Fe durante 48 horas. Las células fueron cargadas con calceína (CA) y la cuantificación de la fluorescencia a 37 °C se registró con un lector de fluorescencia para microplacas (excitación 480 nm, emisión 530 nm). Se registró la fluorescencia basal (F_0) de cada pozo por 5 min a intervalos de 30 segundos. Se agregó 40 μM sulfato ferroso de amonio (FAS) y se siguió el apagamiento de la fluorescencia de CA durante 15 min con lecturas aproximadamente cada 30 segundos. La diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada y la basal es proporcional a la magnitud del Fe^{2+} reactivo del citosol (cLIP). Posteriormente se agregó 1 mM del quelante de hierro no permeante DTPA, para eliminar la contribución de CA extracelular y después 400 μM del quelante permeable a la membrana DFP (Fig. 10A). DFP sustrae Fe de la CA recuperando ésta la fluorescencia apagada por su unión. En la Figura 10B se grafica la tasa de incorporación de Fe por segundo. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

5.6 Detección de la magnitud de mLIP por recuperación de fluorescencia de RPA en células SH-SY5Y.

5.6.1 Detección de la magnitud de mLIP por recuperación de fluorescencia de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe.

Se determinó la magnitud de Fe lábil mitocondrial en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con concentraciones de Fe en el rango 1 a 20 μM . Se cargaron las células con la sonda RPA y luego se registró la fluorescencia basal en el lector de microplacas durante 5 minutos. Para asegurar que el apagamiento de la fluorescencia de RPA se debe exclusivamente al hierro lábil presente en la mitocondria, las células fueron permeabilizadas con digitonina con el fin de trabajar con células permeabilizadas y determinar la participación de componentes citosólicos en el ingreso de Fe a la mitocondria. Se registró nuevamente la fluorescencia basal (F_0) y luego se agregó el quelante específico de Fe, DFP para recuperar la fluorescencia. De éste modo, la magnitud de la fluorescencia recuperada es directamente proporcional al Fe lábil para cada oferta de Fe extracelular.

En el estado inicial después de la carga de RPA, la fluorescencia inicial (F_0) más elevada, es decir, el mLIP más bajo, lo presentaron las células deficientes en hierro. F_0 disminuyó en el rango 1-10 μM de hierro, estabilizándose en el rango 10-20 μM (Figura 11A y 11B). Esta estabilización es una evidencia de que el mLIP es regulado.

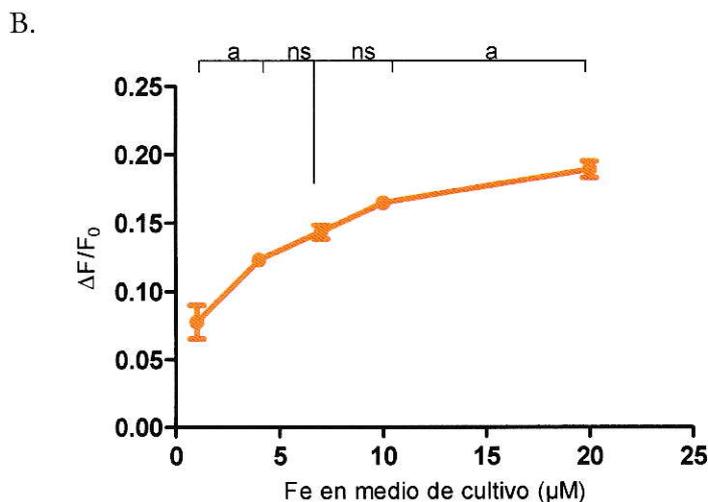
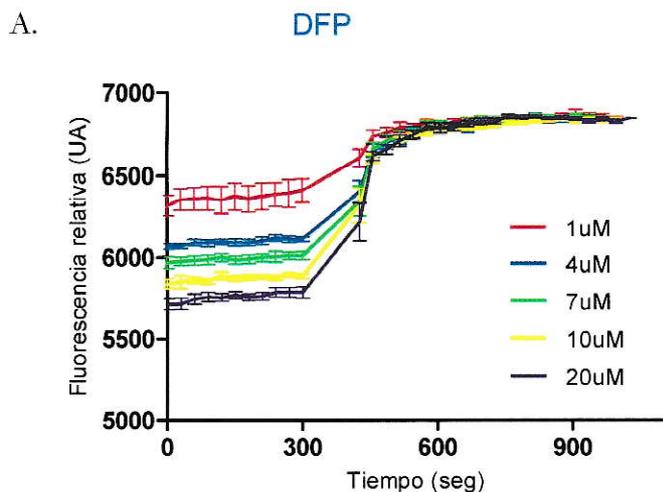


Figura 11. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Las células SH-SY5Y fueron expuestas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda RPA y se registró la fluorescencia basal durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró la recuperación de fluorescencia de de la sonda durante 10-12 minutos (A) y se determinó el delta de fluorescencia para cada condición (B). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

La determinación del mLIP con RPA arrojó resultados similares a los obtenidos para calceína durante 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de Fe. La magnitud del mLIP aumentó 2,3 veces al comparar la condición de deficiencia de Fe (1 μM) con la condición de sobrecarga de Fe (20 μM) (Figura 11C). Este resultado sugiere la presencia de un mecanismo regulatorio del contenido de hierro lábil mitocondrial.

5.6.2 Detección de la magnitud de mLIP por recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe.

Similarmente al estudio del LIP citosólico, se determinó el efecto del tiempo de exposición a diversas ofertas de Fe extracelular en la tasa de incorporación de Fe y en el contenido de Fe lábil mitocondrial. Para esto, las células SH-SY5Y fueron incubadas durante 48 horas utilizando el mismo diseño del experimento anterior. En general, la fluorescencia inicial fue más elevada en comparación a la incubación por 24 horas, es decir, el mLIP fue más bajo. Un mLIP excepcionalmente bajo lo presentaron células cultivadas en Fe 1 μM , comparado con células cultivadas con Fe 1 μM durante 24 horas (Figura 12B). Posiblemente el poco hierro que ingresa a la mitocondria es utilizado para mantener los niveles adecuados de los grupos prostéticos Fe-S y Hem. A partir de Fe 7 μM , se observó que a medida que aumenta la oferta de Fe extracelular también aumenta el apagamiento de la sonda, lo que indica un aumento del mLIP (Fig. 12C). A diferencia del tratamiento durante 24 horas, aquí el mLIP no se mantuvo constante, lo que sugiere la pérdida de la capacidad de este.

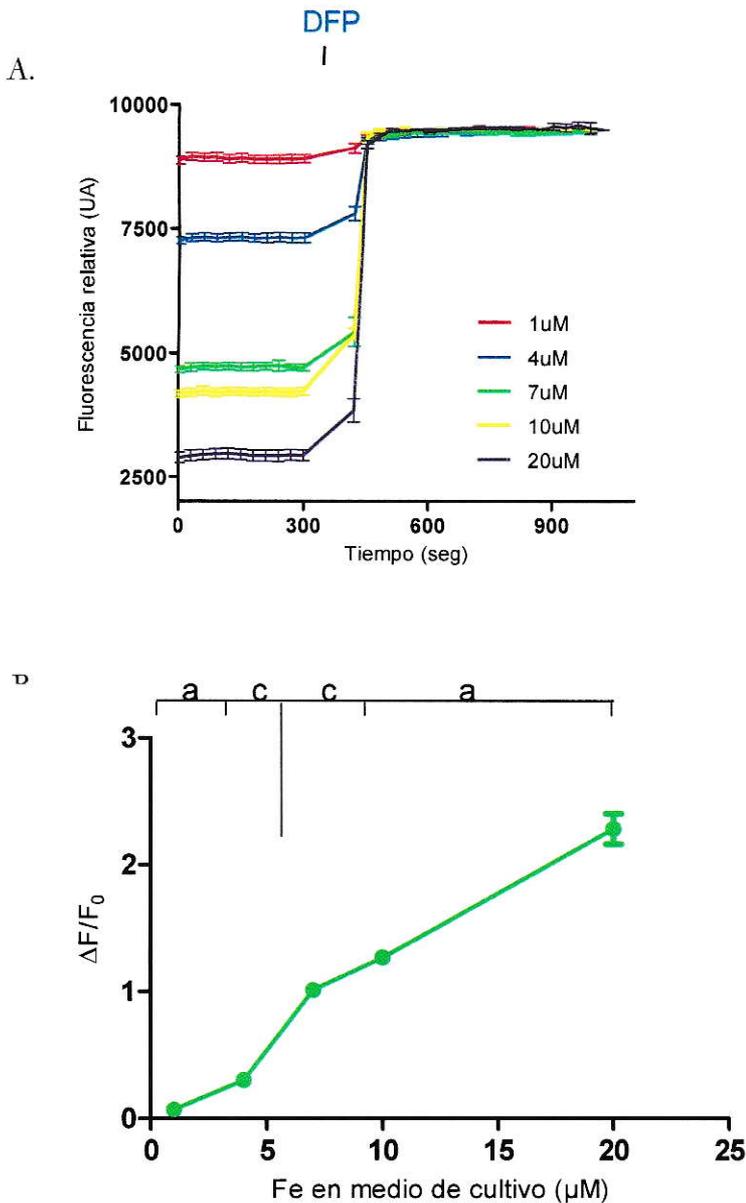


Figura 12. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Las células SH-SY5Y fueron expuestas durante 48 horas a ofertas crecientes de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda RPA y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró la recuperación de fluorescencia de la sonda (A), y se determinó el delta de fluorescencia para cada condición (B). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM).

5.7 Incorporación de Fe a pool de hierro lábil mitocondrial en células SH-SY5Y

5.7.1 Detección de la magnitud de mLIP por recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con diversas ofertas de Fe. Participación de mecanismos antioxidantes.

El principal regulador del cLIP es el sistema IRE/IRP, que actúa disminuyendo o aumentando los niveles de expresión de proteínas involucradas en el ingreso y almacenaje de hierro en la célula. En la mitocondria, los mecanismos regulatorios de su LIP son desconocidos. Hasta ahora el conocimiento que se tiene proviene de diversas enfermedades genéticas relacionadas con la acumulación de hierro mitocondrial, el rol de ferritina mitocondrial (MtFt) y de transportadores de Fe en la mitocondria. Cabe preguntarse, ¿Hay un sistema capaz de evaluar una sobrecarga de hierro en la mitocondria? ¿Qué mecanismos se activan para paliar el efecto de la acumulación de Fe? Nuestros resultados indican que efectivamente el ingreso de hierro a la mitocondria es un proceso regulado, pero que también se desregula si las células se someten a períodos prolongados (24 horas) de cultivo en altas concentraciones de hierro.

Es posible que la desregulación de la homeostasis del hierro mitocondrial esté mediada por el estrés oxidativo inducido por la acumulación progresiva de hierro. Para determinar si estímulos oxidativos están involucrados en la desregulación del mLIP, las células fueron incubadas con diversas ofertas de hierro durante 24 horas junto con 250 μ M de NAC. Posteriormente fueron expuestas a la sonda RPA, permeabilizadas, y luego se registró la

fluorescencia basal (Figura 13A) y la recuperación de fluorescencia de la sonda al agregar DFP (Figura 13 B).

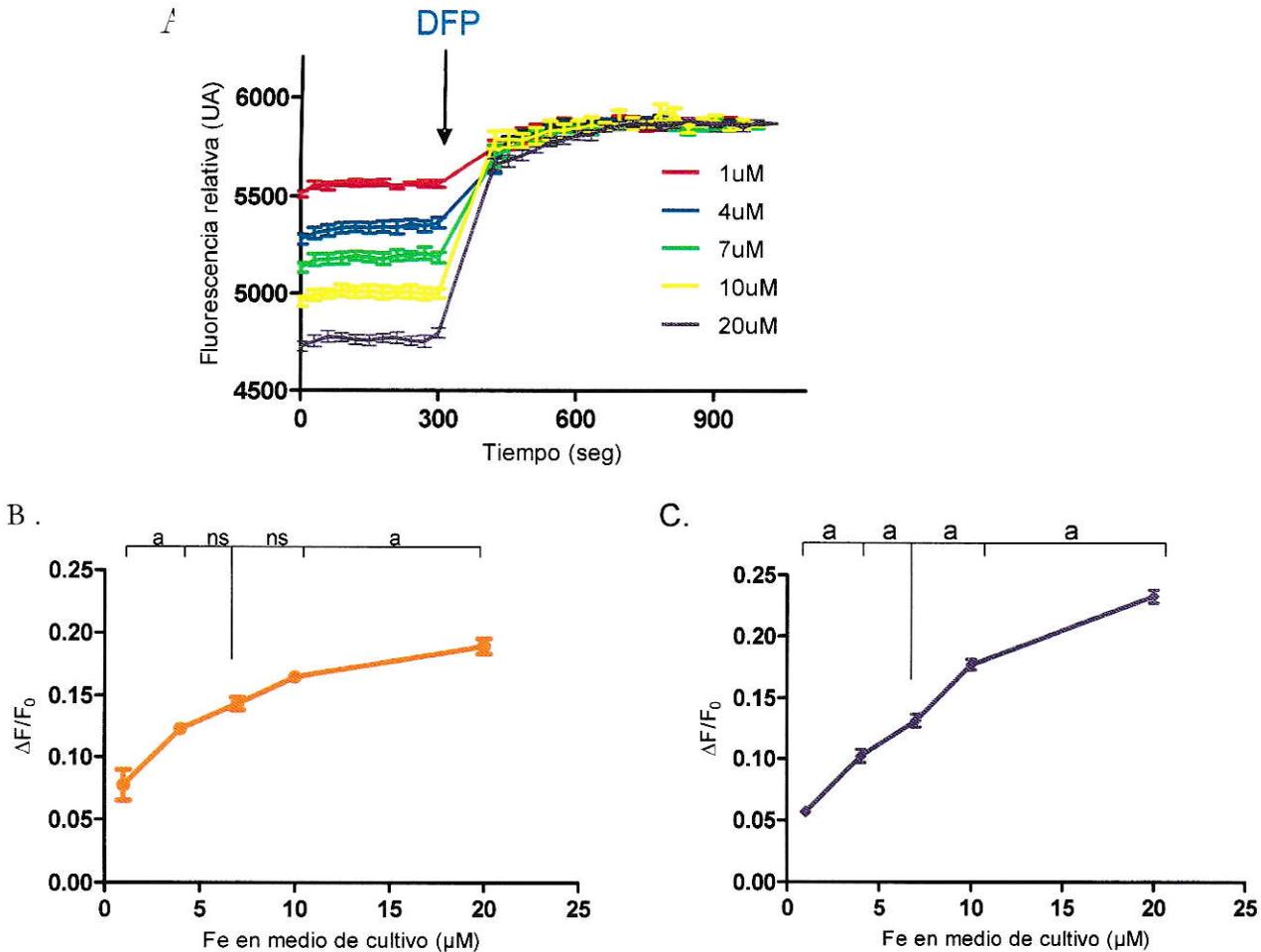


Figura 13. Recuperación de fluorescencia de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 24 horas con diversas ofertas de Fe y NAC. Las células SH-SY5Y fueron expuestas durante 24 horas a ofertas crecientes de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda RPA y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró el Recuperación de fluorescencia de de la sonda durante 10-12 minutos (A). Comparación de resultados de tratamientos sin NAC (B) vs tratamientos agregando NAC a cada condición (C).. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

Los resultados muestran que al igual que en el tratamiento durante 24 horas sin NAC, existe una tendencia a la estabilización de la magnitud del LIP en éste organelo.. Aparentemente no hay efectos del NAC en la magnitud del mLIP, ya que las magnitudes de Fe lábil son bastante similares con tratamientos en ausencia y presencia de NAC.

5.7.2 Detección de la magnitud de mLIP por recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con diversas ofertas de Fe en presencia de NAC.

En experimentos anteriores se determinó qué ocurre con la pérdida de la homeostasis del hierro mitocondrial en células expuestas a hierro por 48 horas, por lo que fue interesante determinar qué ocurre con el mLIP en un tratamiento con hierro durante 48 horas en presencia de NAC. El experimento arrojó los resultados que se muestran en la figura 14, donde podemos ver que se mantiene ese patrón de pérdida de regulación del LIP mitocondrial, de la misma manera que en el tratamiento durante 48 horas en ausencia de NAC (Fig. 14 B), y no se observa un efecto en la magnitud del LIP para ambos casos, lo que da cuenta que posiblemente existan otros mecanismos que contribuyan a aumentar el mLIP, como, por ejemplo, el aumento en la expresión de transportadores de entrada de hierro a la mitocondria.

A.

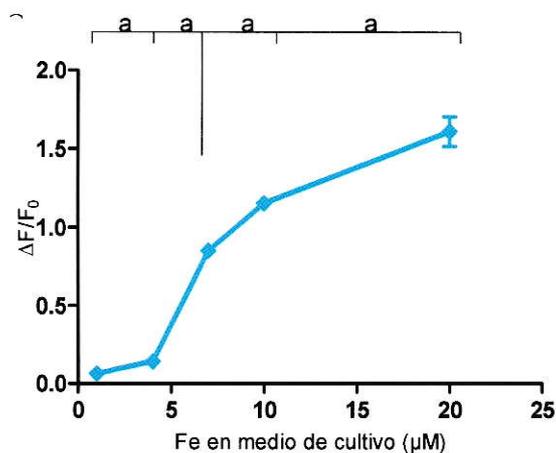
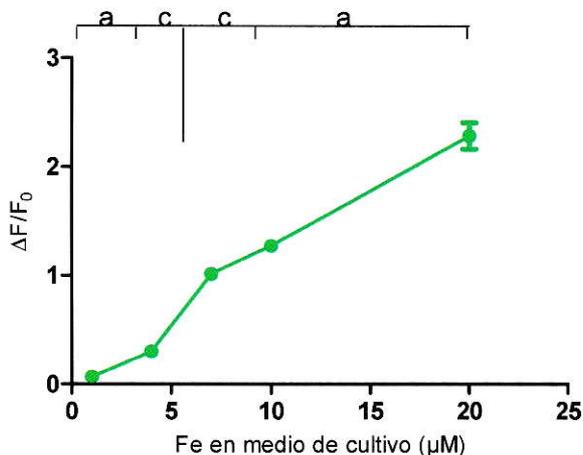
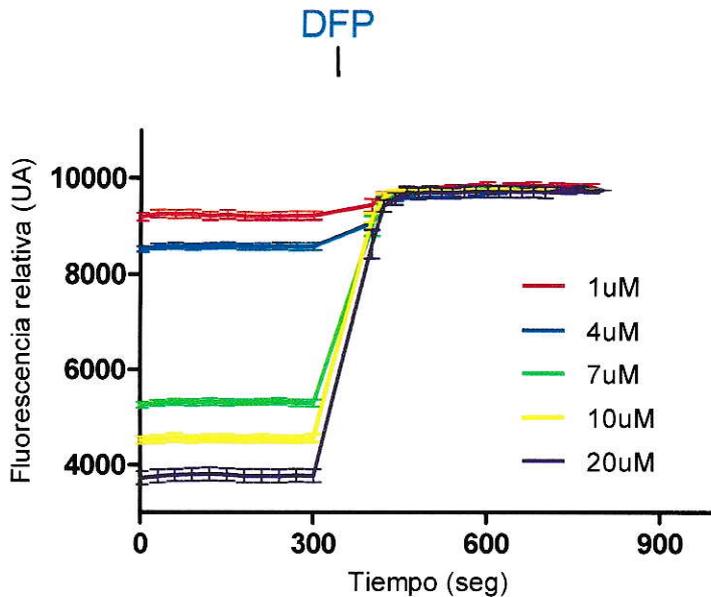


Figura 14. Recuperación de fluorescencia de de RPA en células SH-SY5Y en función del tratamiento durante 48 horas con diversas ofertas de Fe y NAC. Las células SH-SY5Y fueron expuestas durante 48 horas a ofertas crecientes de Fe. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con la sonda RPA y se registró la fluorescencia basal (F_0) durante 5 minutos. Luego se agregó el quelante DFP 400 μM y se registró la recuperación de la fluorescencia durante 10-12 minutos (Fig A Comparación de resultados de tratamientos sin NAC (B) vs tratamientos agregando NAC a cada condición (C). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

5.8 Incorporación de Fe al pool de hierro lábil mitocondrial en células SH-SY5Y.

5.8.1 Detección de la tasa de incorporación de hierro externo al pool de hierro lábil mitocondrial utilizando células SH-SY5Y tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de Fe.

Para caracterizar la entrada de Fe a la mitocondria, las células fueron expuestas a diferentes ofertas de hierro extracelular, luego cargadas con RPA, y permeabilizadas para asegurar que el hierro detectado corresponde efectivamente a hierro mitocondrial. Se agregó hierro en forma de FAS y se registró la fluorescencia durante aproximadamente 20 minutos, y luego se agregó DFP. El aumento de fluorescencia con DFP se debe a la recuperación de la fluorescencia inicial por liberación del Fe agregado durante el ensayo, más el aporte del mLIP previo.

Se observó que la entrada de hierro (FAS) a la mitocondria fue inversamente proporcional a la concentración de Fe en el medio extracelular. El Fe externo se incorporó rápidamente al pool mitocondrial, en un proceso saturable, donde los niveles de equilibrio se alcanzaron dentro de los primeros 18 minutos desde la adición de Fe externo (Fig. 15A). En condiciones de deficiencia de hierro, se observó un ingreso rápido de éste, a concentraciones crecientes la tasa de incorporación de hierro disminuyó con respecto a la condición 1 μM . Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones 4, 7 y 10 μM de Fe ($p > 0,05$), probablemente producto de un acondicionamiento de la mitocondria al ingreso de hierro, pues a medida que aumenta la oferta externa, la necesidad de metal disminuye. Cuando la oferta externa fue de 20 μM , se

observó una disminución significativa en la velocidad de ingreso del metal ($p < 0,01$) con respecto a la condición de deficiencia de Fe. Sin embargo, a pesar de la sobrecarga de hierro, al igual que en citosol, la incorporación de hierro a la mitocondria nunca se hace cero. (Figura 15B.)

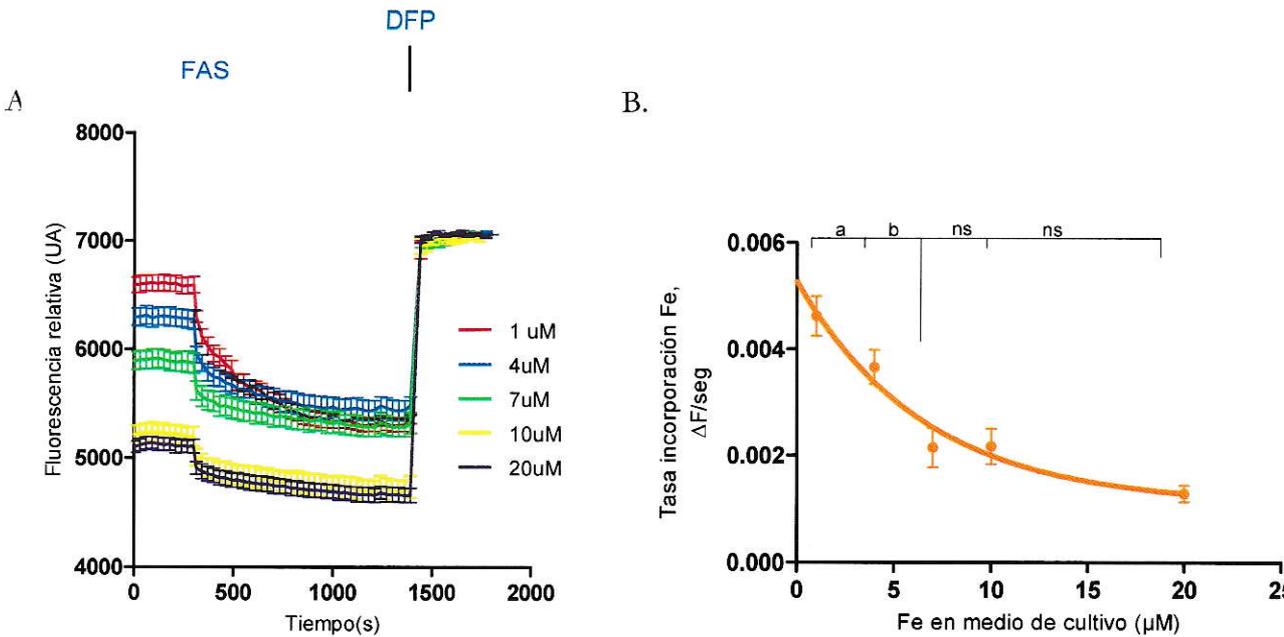


Figura 15. Incorporación mitocondrial de Fe en células cargadas previamente con Fe durante 24 horas. Las células se cargaron con la sonda RPA (0,5 μM) tal como se describió en los Métodos. La cuantificación de la fluorescencia se registró en lector de microplacas (excitación 530 nm, emisión 590 nm) a 37 °C. Tras determinar la fluorescencia basal de cada pozo, se agregó hierro sulfato amonio (FAS) 40μM y se registró la pérdida de fluorescencia de la sonda. Posteriormente se agregó DFP para quelar el mLIP y restaurar la fluorescencia de RPA. La adición de DFP muestra la fluorescencia máxima de RPA libre. Los valores son promedios ± DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe 7 μM)

5.8.2 Detección de la incorporación de hierro externo pool de hierro lábil mitocondrial utilizando células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con concentraciones crecientes de Fe.

Con el propósito de determinar cómo influye el tiempo de incubación con hierro en la incorporación de este a la mitocondria, células SH-SY5Y fueron incubadas durante 48 horas con las mismas concentraciones de Fe utilizadas en experimentos anteriores, y luego se registró fluorescencia basal, se agregó FAS 40 μM , y se siguió el apagamiento de la fluorescencia producto de la unión de RPA con el Fe lábil. Para recuperar la fluorescencia y determinar la magnitud del mLIP, se utilizó nuevamente el quelante específico de hierro DFP (Fig. 16A). Al igual que las células sometidas a tratamiento durante 24 horas, la incorporación de Fe aumento en condiciones de deficiencia, y se hizo mínima en condiciones de sobrecarga. Al igual que en el experimento de 24 horas, parece ser que los mecanismos que regulan la velocidad de entrada de hierro son efectivos, puesto que no se presentaron diferencias significativas en la tasa de incorporación de hierro entre las condiciones 4, 7 y 10 μM para tratamientos durante 24 y 48 horas. Una disminución en la expresión del transportador de entrada mitoferrina (Parakdar y cols. 2009) podría ser la causa de este flujo disminuido.

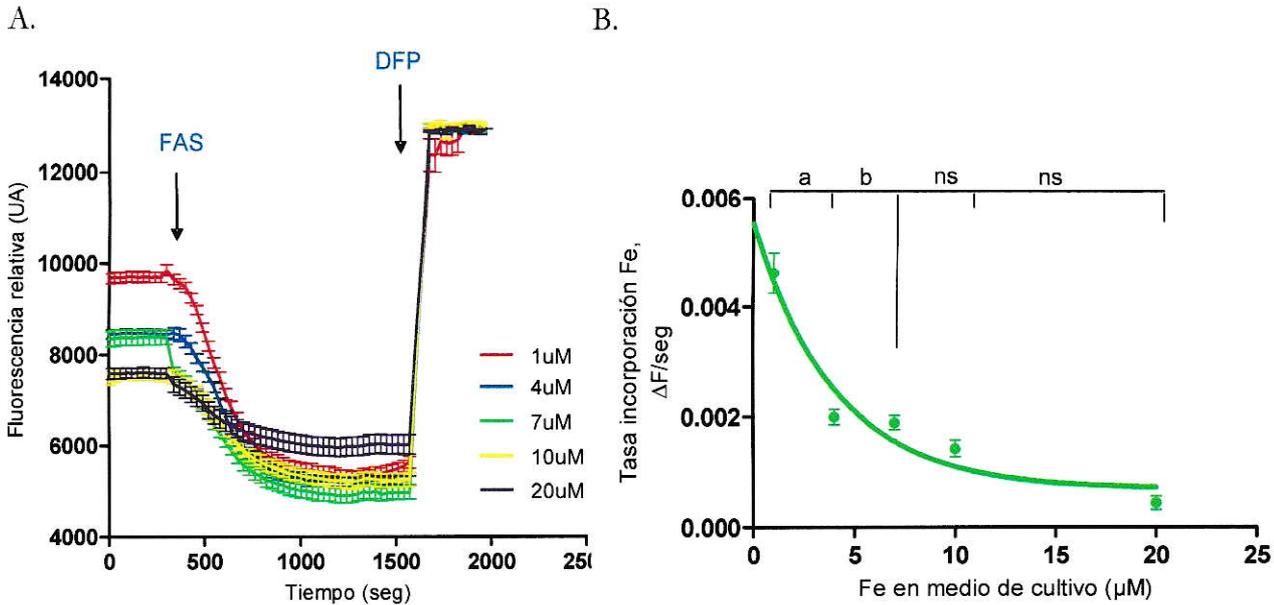


Figura 16. Incorporación mitocondrial de Fe en células expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 48 horas.

Las células se cargaron con la sonda RPA ($0,5 \mu\text{M}$) tal como se describió en los métodos. La cuantificación de la fluorescencia se registró en lector de microplacas (excitación 530 nm , emisión 590 nm) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Tras determinar la fluorescencia basal de cada pozo, se agregó hierro sulfato amonio (FAS) $40 \mu\text{M}$ y se registró la pérdida de fluorescencia de la sonda. Posteriormente se agregó DFP para quelar el mLIP y restaurar la fluorescencia de RPA. La adición de DFP muestra la fluorescencia máxima de RPA libre. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ANOVA, análisis de Tukey para comparaciones múltiples, (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,05$. Se muestran las estadísticas de todas las concentraciones con respecto a la condición control (Fe $7 \mu\text{M}$)

6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS.

6.1. Comparación entre el contenido de hierro lábil citosólico en células SH-SY5Y expuestas a diversas ofertas de Fe durante 24 y 48 horas.

Los resultados mostrados en las figuras 5 y 6 se resumen en la figura 17, donde podemos observar que frente a tratamientos con ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas existe un aumento en el contenido de Fe lábil citosólico en células SH-SY5Y. El incremento de la magnitud de LIP a 24 horas de exposición a Fe tiende a estabilizarse por concentraciones por sobre $7 \mu\text{M}$, mientras que en células expuestas a éstas ofertas por 48 horas se pierde ésta “estabilización”, y la magnitud del LIP es considerablemente mayor.

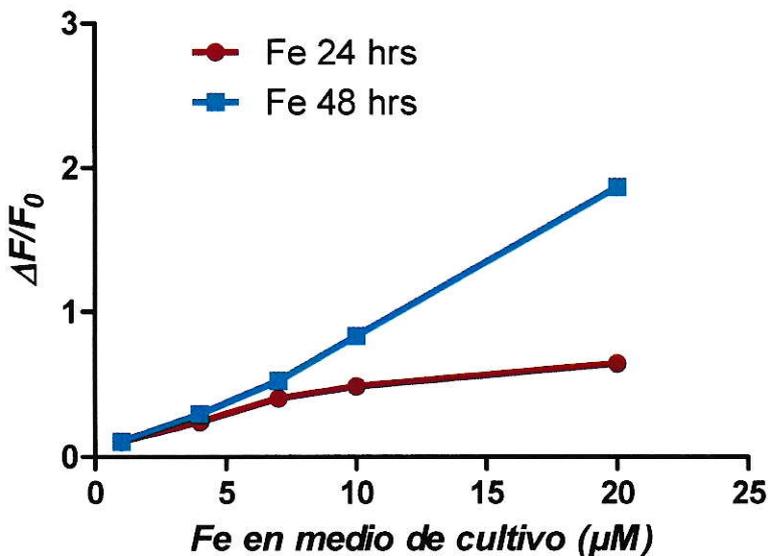


Figura 17. Comparación de la magnitud de Fe lábil en células SH-SY5Y expuestas a 24 y 48 horas de ofertas crecientes de Fe. Se observa una magnitud de LIP considerablemente mayor en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones frecuentes de Fe durante 48 horas.

6.2. Comparación del contenido de hierro lábil mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.

Las figuras 11 y 12 se resumen en la figura 18, podemos ver que en la mitocondria el incremento del contenido de Fe lábil presenta un comportamiento similar que en citosol, frente a ambos tratamientos existe un incremento en el LIP, el cual tiende a estabilizarse a las 24 horas de tratamiento, tendencia que no se observa a las 48 horas de tratamiento. La magnitud del mLIP a las 48 horas es varias veces mayor que a las 24 horas de tratamiento.

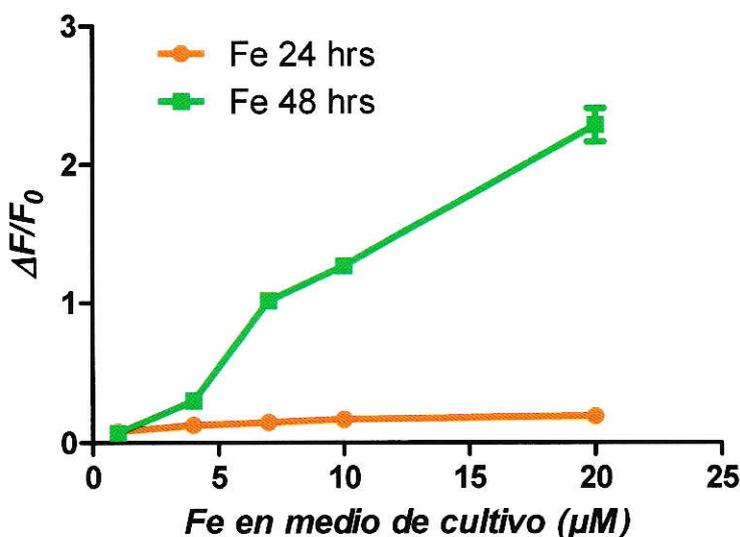
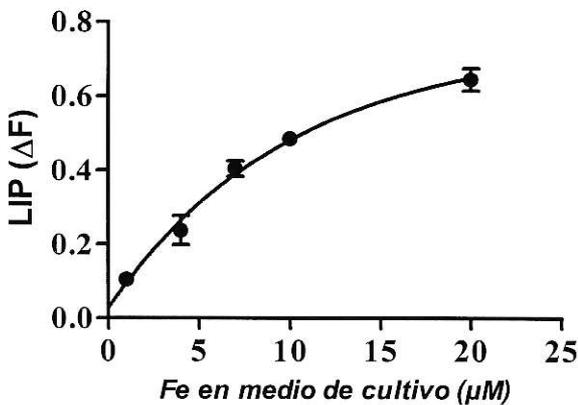


Figura 18. Comparación de la magnitud de Fe lábil mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a 24 y 48 horas de ofertas crecientes de Fe. Se observa una magnitud de LIP mitocondrial considerablemente mayor en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones frecuentes de Fe durante 48 horas.

6.2. Comparación entre el contenido de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y

En las figuras 17 y 18 observamos que a las 24 horas las magnitudes del LIP tanto citosólico como mitocondrial son considerablemente bajos respecto al tratamiento durante 48 horas. Esto se resume en la Figura 19, donde podemos observar con mayor claridad la “estabilización” de la magnitud del LIP. Observamos también que en condiciones de deficiencia de Fe, el LIP citosólico corresponde al 16% del valor máximo de LIP alcanzado (oferta de Fe 20 μM), mientras que el LIP mitocondrial corresponde al 40% del LIP mitocondrial máximo alcanzado. Esto sugiere que en condiciones de escasez del metal la mitocondria regula hacia arriba su LIP en preferencia al citosol.

A.



B.

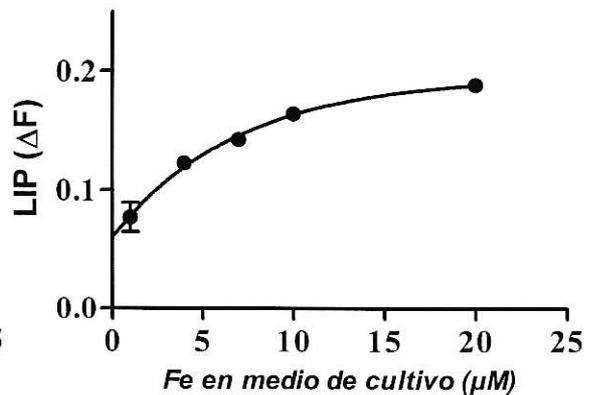
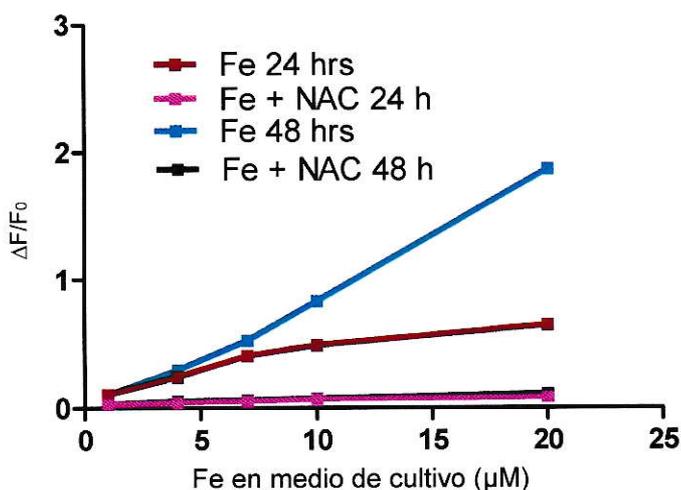


Figura 19. Comparación de la magnitud de Fe lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a ofertas crecientes de Fe. Se observa un incremento en el LIP en ambos compartimentos, en condiciones de deficiencia observamos que en la mitocondria la magnitud del LIP es 2,5 veces mayor a Fe 20 μM comparado con Fe 1 μM , mientras que el LIP citosólico en similares condiciones, es 6,25 veces mayor.

6.3 Comparación del efecto del antioxidante NAC en la magnitud del LIP citosólico de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.

En la figura 20 se resume el efecto de la molécula N-acetil cisteína en la magnitud del LIP citosólico de células SH-SY5Y expuestas a 24 y 48 horas a ofertas crecientes de Fe junto a NAC. Se observa que el tratamiento con NAC produce la drástica disminución del LIP citosólico tanto a 24 como a 48 horas (Fig. 20A), con valores similares tanto a las 24 como a las 48 horas de exposición a ofertas crecientes de Fe.

A.



B.

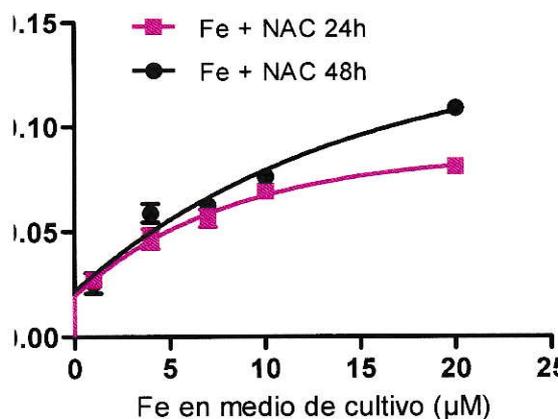


Figura 20. Efecto del NAC en el contenido de Fe lábil citosólico de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas. (A) Se observa el drástico efecto del NAC en la magnitud del LIP citosólico, disminuyendo éste drásticamente tanto a las 24 (curva rosada) como a las 48 horas (curva azul). (B) Ampliación del gráfico que da cuenta del drástico efecto del NAC en la magnitud del LIP, llevando los niveles de LIP a las 48 horas de tratamiento a niveles similares que los detectados en células tratadas durante 24 horas con Fe.

6.4 Comparación del efecto del antioxidante NAC en la magnitud del LIP mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas.

En la figura 21 se resume el efecto de NAC en la magnitud del LIP mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a 24 y 48 horas a ofertas crecientes de Fe. A diferencia de lo ocurrido con el LIP citosólico, el LIP mitocondrial no se vió afectado por la presencia de ésta molécula.

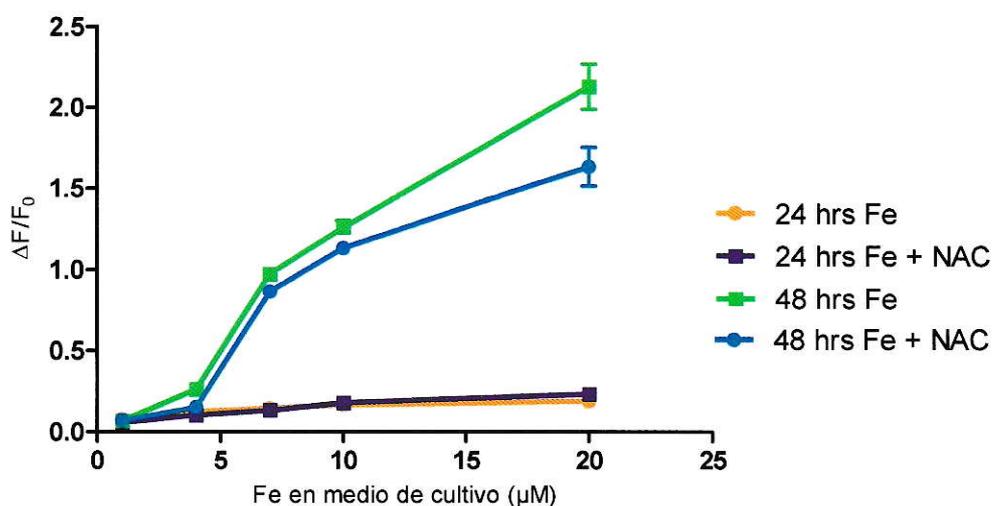


Figura 21. Efecto del NAC en el contenido de Fe lábil mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas. No fue posible observar el efecto de la molécula antioxidante N-acetil cisteína (NAC) tanto durante 24 como durante 48 horas de exposición de células SH-SY5Y a ofertas crecientes de Fe.

6.5. Tasa de incorporación de Fe a citosol y mitocondria en células SH-SY5Y tratadas durante 24 y 48 horas con diversas ofertas de Fe externo.

Como se mencionó anteriormente, se determinó la tasa de incorporación de Fe en ambos compartimentos siguiendo la pendiente del descenso de la fluorescencia a través del tiempo ajustándolo a un decaimiento exponencial simple. Los resultados se resumen en la figura 22, donde no se observan diferencias significativas en la tasa de incorporación de Fe tanto en citosol (22A) como en mitocondria (22B). A las 24 horas la tasa de incorporación de Fe al citosol disminuyó a un 33%, mientras que a las 48 horas disminuyó a un 14% de la incorporación de Fe en condiciones de deficiencia. Se observó que no existe una regulación negativa absoluta al ingreso de Fe a ambos compartimentos, pues la tasa de incorporación no llegó a cero bajo ninguna condición experimental.

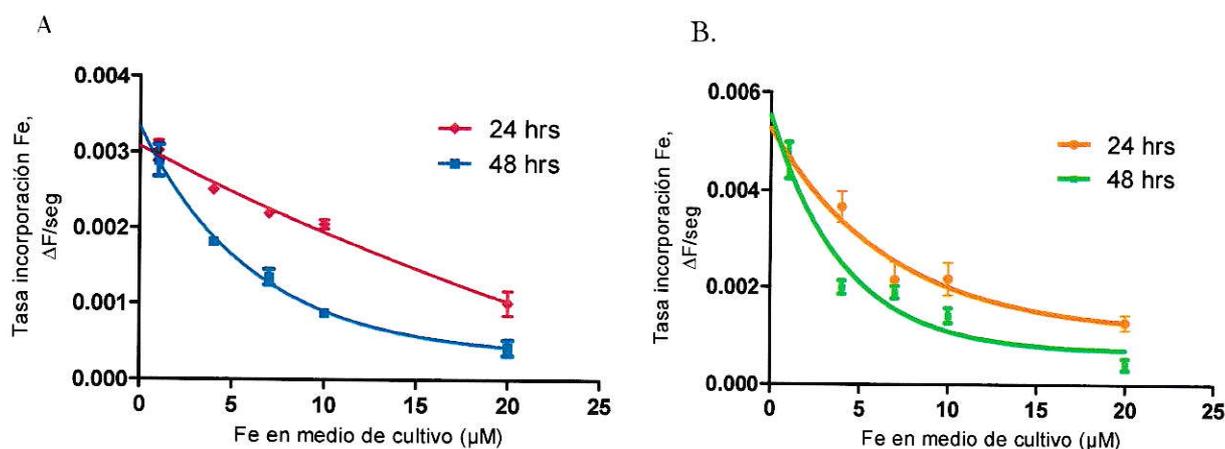


Figura 22. Tasa de incorporación de Fe a citosol y mitocondria de células SH-SY5Y expuestas a ofertas crecientes de Fe durante 24 y 48 horas. No fue posible observar diferencias significativas en la tasa de incorporación de Fe tanto en citosol (A) como en mitocondria (B).

7. DISCUSIÓN

El hierro es un elemento central para la vida. Forma parte de proteínas que juegan un rol fundamental en el óptimo funcionamiento de la célula, pero un exceso de éste metal resulta letal, pues cataliza la generación de especies reactivas del oxígeno. En particular, mediante la reacción de Fenton el Fe^{2+} genera el radical hidroxilo, una de las moléculas más reactivas producida en los seres vivos, que peroxida lípidos y proteínas e induce mutaciones en el material genético.. Gran parte del Fe redox-activo activo es transportado a la mitocondria, donde pasa a formar parte de los grupos prostéticos Fe-S y el grupo Hem. La mitocondria, por lo tanto, debe contar con un suplemento hierro adecuado para cumplir su función de síntesis pero no en exceso como para inducir la producción del radical hidroxilo.

Bajo la hipótesis que la homeostasis del hierro mitocondrial tiene preferencia sobre la homeostasis citosólica, en esta Tesis se estudió la dinámica del Fe lábil citosólico y mitocondrial como función de la oferta y niveles de hierro celular.

Los resultados de esta Tesis indican que en condiciones de deficiencia de Fe, éste se encuentra en mayor proporción en su forma lábil en la mitocondria que en el citosol, posiblemente para asegurar la formación de grupos prostéticos Fe-S y Hem. Bajo condiciones de exceso en la oferta de hierro, tanto el citosol como la mitocondria aumentan sus LIPs, pero con una clara regulación de sus niveles. Sin embargo, el aumento del LIP entre condiciones de bajo y alto hierro es considerablemente menor en la mitocondria (2,5 veces) que en el citosol (6,25 veces). Estos resultados indican que la magnitud tanto el cLIP

como el slip es regulada. El menor margen de variación del mLIP en comparación con el cLIP indica que los niveles del mLIP son más estrictamente regulados.

7.1 Distribución subcelular de Fe en células SH-SY5Y.

Aunque la mitocondria juega un rol central en la formación de diversas ferro-proteínas, los mecanismos que regulan tanto su contenido de Fe total se desconocen. Al exponer células SH-SY5Y a ofertas crecientes de Fe, se observó que existe un aumento en la magnitud de hierro total que es función del aumento de hierro en el medio de cultivo (Figura 2). Esto se relaciona con antecedentes ya conocidos desde el año 1985 que correlacionan la acumulación intracelular progresiva de hierro en células neuronales con el envejecimiento.

Este comportamiento fue observado tanto en citosol como en mitocondria, donde el contenido de Fe, en términos de mol/mg proteína, fue menor que en citosol. Pero ¿cómo es posible que en condiciones de sobrecarga de Fe, éste se acumule en un organelo que genera especies reactivas en condiciones fisiológicas? Antecedentes de nuestro laboratorio indican que el hierro es capaz de inducir la expresión del ARNm y de la proteína ferritina mitocondrial tanto en condiciones de deficiencia como de sobrecarga de hierro, lo que daría cuenta de éste aumento en el contenido de hierro en ambas condiciones.

La ferritina mitocondrial es una proteína compuesta por subunidades de ferritina similares a la subunidad H de la ferritina citosólica, que presenta actividad ferroxidasa. Campanella y cols[72] en el año 2008, demostraron que la expresión mFt en células HeLa, disminuye el daño oxidativo frente a una amplia variedad de condiciones desfavorables, entre ellas exceso

de H_2O_2 . Esta protección se atribuye a la actividad ferroxidasa, puesto que una variante de FtMt con la actividad ferrooxidasa inhibida, no genera protección frente al daño oxidativo.

El aumento más pronunciado del contenido de Fe total en citosol comparado con el aumento del Fe total mitocondrial, da indicios sobre la sensibilidad del sistema regulador de Fe mitocondrial en comparación al de Fe citosólico. Esto queda en evidencia además al determinar la magnitud del cLIP v/s mLIP, como se discutirá mas adelante.

7.2 Incorporación de ^{55}Fe en células SH-SY5Y – Efecto del tratamiento previo con diferentes concentraciones de Fe.

La incorporación de ^{55}Fe en células previamente expuestas a ofertas crecientes de Fe mostró una marcada disminución en la tasa de incorporación de Fe a medida que aumenta la oferta de Fe extracelular. Esta disminución en el ingreso de hierro se relacionó directamente a la disminución de la expresión del transportador DMT1, posiblemente debido a la inactivación de las IRP y la consecuente desestabilización del ARNm de DMT1 [4, 28].

7.3 Acumulación de hierro lábil en citosol y mitocondria en función de ofertas crecientes de hierro extracelular y del tiempo de exposición a estas ofertas.

Se determinó cómo varía el contenido de Fe lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a diversas ofertas de Fe. Durante el tratamiento durante 24 horas se observó en ambos compartimentos que el LIP es muy bajo en condiciones de deficiencia de Fe, puesto que es un elemento de primaria necesidad y se destina principalmente a la síntesis de grupos prostéticos Fe-S, por lo tanto en condiciones de deficiencia de Fe, la mayor parte de éste se encuentra asociado a proteínas. A medida que aumenta la oferta

extracelular, el LIP aumentó en ambos compartimentos, parece perderse esa estabilización, y la magnitud del LIP- tanto citosólico como mitocondrial- aumenta paralelamente al aumento en la oferta extracelular de Fe (Figuras 17 y 18), probablemente debido a que los mecanismos encargados de mantener los niveles de LIP constantes se ven sobrepasados por el Fe lábil acumulado, el cual debe haber provocado un aumento de los niveles de ROS en ambos compartimentos. Cabe recordar que exponiendo a estas células a este rango de oferta de Fe extracelular (1-20 μ M) durante 24 y 48 horas, la viabilidad celular no se ve afectada [10] por lo cual los cambios detectados no son producto de la muerte celular debido a las concentraciones de Fe utilizadas.

7.4 Efecto de agentes antioxidante en la acumulación de hierro lábil en citosol y mitocondria en función de ofertas crecientes de hierro extracelular y del tiempo de exposición a éstas ofertas.

Al ver que la magnitud del LIP tanto citosólico como mitocondrial se mantienen constantes durante el tratamiento de 24 horas, y aumentan en forma sostenida durante tratamiento por 48 horas, nos preguntamos si este último incremento se debía a un aumento en el tono oxidativo en ambos compartimentos. Antecedentes aportados por Pantoupolos y Hentze[73] dejan en evidencia la estrecha conexión entre homeostasis de Fe y stress oxidativo, puesto que se demostró que H_2O_2 desensambla el grupo prostético [4Fe-4S] presente en IRP-1, lo que genera una rápida respuesta de ésta proteína reduciendo la síntesis de la proteína de almacenaje ferritina, y aumentando la síntesis del receptor de Tf y de DMT1. Ambos aumentos podrían mediar una mayor incorporación de hierro.

Para determinar el efecto de agentes oxidantes en el contenido de LIP tanto en citosol como en mitocondria, se utilizó el antioxidante NAC, precursor del glutatión, el antioxidante por excelencia en la célula. Los resultados muestran que el NAC disminuyó considerablemente el contenido de Fe lábil citosólico (Figura 20). El mayor efecto del NAC quedó en evidencia en condiciones de sobrecarga de hierro. Esto concuerda con resultados de Kaur y cols[74] quienes demostraron que la depleción de glutatión en células dopaminérgicas genera un incremento en el contenido de hierro lábil celular, el cual está acompañado de un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Inesperadamente, se observó que el tratamiento con NAC no afectó el contenido de mLIP, tanto a las 24 como a las 48 horas de exposición a ofertas crecientes de Fe. Una interpretación a esta observación es que la mitocondria posee un sistema muy eficaz de regular su nivel de antioxidantes. Alternativamente, el GSH producido a partir de NAC podría no estar entrando a la mitocondria. La mitocondria no tiene la capacidad de sintetizar GSH *de novo*, debe importarlo desde el citosol, una vez en la mitocondria ejerce un efecto protector marcado por una disminución de marcadores de stress oxidativo y marcadores apoptóticos en fibroblastos de pacientes con Alzheimer, enfermedad neurodegenerativa que presenta una característica acumulación de hierro en neuronas dopaminérgicas [75]. Se ha descrito que el ingreso de GSH a la mitocondria es a través de transportadores RmGshT [76] y éste transporte es dependiente de ATP. Al existir un alto contenido de Fe lábil, y una disminución en la producción de ATP, el ingreso de GSH a la mitocondria podría estar disminuido.

7.5 Incorporación de Fe en compartimentos citosólico y mitocondrial, en células SH-SY5Y tratadas durante 24 y 48 horas con ofertas crecientes de Fe.

La entrada de Fe al LIP citosólico (Figura 22A.) fue significativamente mayor en las células deficientes, y disminuyó al aumentar la cantidad de Fe del medio externo. Esto contrasta con los resultados de contenido de Fe total, donde la acumulación se incrementó con la carga de Fe. Por lo tanto, el Fe excedente tiene que encontrarse en otro compartimento(s) celular, posiblemente ferritina.

La velocidad de incorporación de Fe tanto a citosol como mitocondria fue inversamente proporcional a la oferta de hierro durante la pre-incubación por 24 o 48 horas (Figura 22). Esta observación deja en evidencia la presencia de mecanismos regulatorios de la entrada de Fe a ambos compartimentos. A pesar de este antecedente, aún se desconoce el mecanismo por el cual el hierro ingresa a la mitocondria desde el medio extracelular. Se ha descrito una suerte de “corredor fisiológico” por donde el hierro ingresa a la mitocondria sin formar parte del pool de hierro lábil citosólico, y el ya conocido mecanismo de “kiss and run” propuesto por Ponka [45]

En resumen, observamos que la mitocondria tiene un sistema homeostático para el hierro que prevalece sobre el sistema homeostático del citosol. Debido a que la mitocondria juega un papel fundamental en la homeostasis de Fe, es por lo tanto un blanco muy atractivo para futuras investigaciones que permitan vislumbrar los mecanismos que subyacen su capacidad de mantener 2 de sus componentes intrínsecos – ROS y Fe – conviviendo de manera inocua para la célula.

8. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes obtenidos en esta tesis se resumen como sigue:

1. Las células SH-SY5Y acumularon Fe en relación a la oferta externa. El patrón de acumulación de Fe total celular fue de tipo exponencial, en el rango 1-10 μM , y se estabilizó a partir de concentraciones externas de Fe de 20 μM .
2. Los niveles de Fe lábil citosólico y mitocondrial llegaron a equilibrio en células expuestas a concentraciones crecientes de hierro durante 24 horas dejando evidencia que en ambos compartimentos existe un mecanismo encargado de regular los niveles de Fe interno. Esta regulación se perdió al prolongar el tratamiento por 48 horas, probablemente debido a que los mecanismos que mantienen los niveles de LIP constantes se ven sobrepasados por el estrés oxidativo generado por el Fe.
3. Agentes antioxidantes participan en la regulación del LIP citosólico, pues reducen sus niveles tanto a las 24 como a las 48 horas de tratamiento. Por otro lado, el LIP mitocondrial no se vio afectado por la adición de antioxidantes, por lo que se concluye que la magnitud del pool de hierro lábil mitocondrial no es dependiente del stress oxidativo. Posiblemente existan mecanismos que regulan la síntesis de transportadores de hierro desde el citosol a la mitocondria o participación de otras moléculas antioxidantes distintas a GSH.

4. La incorporación de Fe respondió a la oferta externa de Fe y al tiempo de exposición a este, de forma de disminuir la incorporación de hierro si la oferta es grande y viceversa. Este comportamiento evidencia la presencia de mecanismos de regulación del contenido de hierro mitocondrial.

5. La mitocondria en ausencia de citosol fue capaz de acumular Fe, en una cinética con patrón similar al de las células enteras. Bajo estas condiciones, i.e. en ausencia de componentes externos, el transporte de hierro por la mitocondria mostró una cinética de saturación, lo que indica que el ingreso de hierro a la mitocondria es posiblemente mediado por transportador(es) y es, a lo menos en parte, independiente de componentes citosólicos.

Dados nuestros resultados se concluye que efectivamente la mitocondria en condiciones de deficiencia capta hierro preferentemente a los requerimientos de hierro del citosol, mientras que en condiciones de sobrecarga el hierro se acumula preferentemente en el citosol. Estas observaciones indican la presencia de un mecanismo destinado a mantener la homeostasis del hierro en la mitocondria. La acumulación de hierro no sólo se ha relacionado con el envejecimiento, sino además, con numerosas enfermedades neurodegenerativas, como el Mal de Alzheimer o el Mal de Parkinson. Por esto, es clave determinar los mecanismos que participan en la homeostasis de Fe, y la pérdida de esta, en la mitocondria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson, N., *Metal ion transporters and homeostasis*. EMBO J, 1999. **18**(16): p. 4361-71.
2. Eaton, J.W. and Qian M. , *Molecular bases of cellular iron toxicity*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 833-40.
3. Chung, J. and Wessling-Resnick M., *Molecular mechanisms and regulation of iron transport*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2003. **40**(2): p. 151-82.
4. Eisenstein, R.S., *Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 627-62.
5. Liu, X. and E.C. Theil, *Ferritin reactions: direct identification of the site for the diferric peroxide reaction intermediate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8557-62.
6. McKie, A.T., Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ, *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.
7. Gunshin, H., Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
8. Donovan, A., Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
9. Vulpe, C.D., Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. *Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 195-9.
10. Aguirre P, Mena N, Tapia V, Arredondo M, Núñez MT, *Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1*. BMC Neuroscience, 2005. **6**: p. 3.
11. Ganz, T., *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. Blood, 2003. **102**(3): p. 783-8.
12. Ganz, T., *Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 29-35, 507.

13. Arredondo M, Tapia V, Rojas A, Aguirre P, Reyes F, Marzolo MP, Núñez MT. *Apical distribution of HFE-b2-microglobulin is associated with inhibition of apical iron uptake in intestinal epithelia cells.* *Biometals*, 2006. **19**:379-388
14. Haile, D.J. Hentze MW, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD. *Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements.* *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(11): p. 5055-61.
14. Leibold, E.A. and B. Guo, *Iron-dependent regulation of ferritin and transferrin receptor expression by the iron-responsive element binding protein.* *Annu Rev Nutr*, 1992. **12**: p. 345-68.
15. Arredondo M., Orellana A, Garate M.A and Nuñez M. T. *Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells.* *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G275-80.
16. Mena, N.P., Esparza A, Tapia V, Valdés P, Núñez MT. *Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(1): p. G192-8.
17. Breuer, W., S. Epsztejn, and Z.I. Cabantchik, *Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells.* *FEBS Lett*, 1996. **382**(3): p. 304-8.
18. Kruszewski, M., *The role of labile iron pool in cardiovascular diseases.* *Acta Biochim Pol*, 2004. **51**(2): p. 471-80.
19. Sohn, Y.S., Breuer W, Munnich A, Cabantchik ZI. *Redistribution of accumulated cell iron: a modality of chelation with therapeutic implications.* *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1690-9.
20. Breuer, W., S. Epsztejn, and Z.I. Cabantchik, *Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II).* *J Biol Chem*, 1995. **270**(41): p. 24209-15.
21. Glickstein, H., El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. *Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells.* *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3242-50.
22. Petrat, F., U. Rauen, and H. de Groot, *Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK.* *Hepatology*, 1999. **29**(4): p. 1171-9.
23. Petrat, F., de Groot H, Sustmann R, Rauen U. *The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity.* *Biol Chem*, 2002. **383**(3-4): p. 489-502.
24. Rauen, U., Springer A, Weisheit D, Petrat F, Korth HG, de Groot H, Sustmann R. *Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities.* *ChemBiochem*, 2007. **8**(3): p. 341-52.
25. Esposito, B.P., W. Breuer, and Z.I. Cabantchik, *Design and applications of methods for fluorescence detection of iron in biological systems.* *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(4): p. 729-32.

26. Iwai, K., Drake SK, Wehr NB, Weissman AM, LaVaute T, Minato N, Klausner RD, Levine RL, Rouault TA., *Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 4924-8.
27. Theil, E.C., *Iron, ferritin, and nutrition.* Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 327-43.
28. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 1-13.
29. Tapia, V., M. Arredondo, and M.T. Nunez, *Regulation of Fe absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status.* Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 1): p. G443-7.
30. Pantopoulos, K., G. Weiss, and M.W. Hentze, *Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3781-8.
31. Bouton, C., Chauveau MJ, Lazereg S, Drapier JC. *Recycling of RNA binding iron regulatory protein 1 into an aconitase after nitric oxide removal depends on mitochondrial ATP.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31220-7.
32. Toth, I., Yuan L, Rogers JT, Boyce H, Bridges KR. *Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4467-73.
33. Nunez-Millacura, C., Tapia V, Muñoz P, Maccioni RB, Núñez MT. *An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells.* J Neurochem, 2002. **82**(2): p. 240-8.
34. Stohs, S.J., *The role of free radicals in toxicity and disease.* J Basic Clin Physiol Pharmacol, 1995. **6**(3-4): p. 205-28.
35. Sturm, B., H. Goldenberg, and B. Scheiber-Mojdehkar, *Transient increase of the labile iron pool in HepG2 cells by intravenous iron preparations.* Eur J Biochem, 2003. **270**(18): p. 3731-8.
36. Lill, R. and G. Kispal, *Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria.* Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 352-6.
37. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
38. Lenaz, G., Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Merlo Pich M, Paolucci U, Parenti Castelli G, Ventura B. *Role of mitochondria in oxidative stress and aging.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 199-213.
39. Wei, Y.H. and H.C. Lee, *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging.* Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(9): p. 671-82.

40. Rouault, T.A. and W.H. Tong, *Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 345-51.
41. Atamna, H., P.B. Walter, and B.N. Ames, *The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 345-53.
42. Atamna, H., Killilea DW, Killilea AN, Ames BN., *Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14807-12.
43. Foury, F. and O. Cazzalini, *Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria*. FEBS Lett, 1997. **411**(2-3): p. 373-7.
44. Petrat, F., H. de Groot, and U. Rauen, *Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 1): p. 61-9.
45. Ponka, P., *Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells*. Blood, 1997. **89**(1): p. 1-25.
46. Shvartsman, M., Kikkeri R, Shanzer A, Cabantchik ZI. *Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(4): p. C1383-94.
47. Foury, F. and T. Roganti, *Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24475-83.
48. Shaw, G.C., Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zon LI, Paw BH., *Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation*. Nature, 2006. **440**(7080): p. 96-100.
49. Li, F.Y., Leibiger B, Leibiger I, Larsson C., *Characterization of a putative murine mitochondrial transporter homology of hMRS3/4*. Mamm Genome, 2002. **13**(1): p. 20-3.
50. Muhlenhoff, U. and R. Lill, *Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 370-82.
51. Lill, R. and U. Muhlenhoff, *Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 457-86.
52. Lange, H., G. Kispal, and R. Lill, *Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18989-96.
53. Levi, S., Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J. *A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24437-40.

54. Corsi, B., Cozzi A, Arosio P, Drysdale J, Santambrogio P, Campanella A, Biasiotto G, Albertini A, Levi S. *Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism.* J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22430-7.
55. Kispal, G. , Csere P, Guiard B, Lill R. *The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis.* FEBS Lett, 1997. **418**(3): p. 346-50.
56. Kispal, G., Csere P, Prohl C, Lill R. *The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins.* EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3981-9.
57. Shayeghi, M., Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. *Identification of an intestinal heme transporter.* Cell, 2005. **122**(5): p. 789-801.
58. Napier, I., P. Ponka, and D.R. Richardson, *Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease.* Blood, 2005. **105**(5): p. 1867-74.
59. Missirlis, F., Holmberg S, Georgieva T, Dunkov BC, Rouault TA, Law JH., *Characterization of mitochondrial ferritin in Drosophila.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5893-8.
60. Zancani, M., Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macrì F., *Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria.* Eur J Biochem, 2004. **271**(18): p. 3657-64.
61. Levi, S. and P. Arosio, *Mitochondrial ferritin.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1887-9.
62. Cazzola, M., Invernizzi R, Bergamaschi G, Levi S, Corsi B, Travaglino E, Rolandi V, Biasiotto G, Drysdale J, Arosio P. *Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia.* Blood, 2003. **101**(5): p. 1996-2000.
63. Nie, G., Sheftel AD, Kim SF, Ponka P. *Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis.* Blood, 2005. **105**(5): p. 2161-7.
64. Tangeras, A., Flatmark T, Bäckström D, Ehrenberg A. *Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers. Estimation, compartmentation and redox state.* Biochim Biophys Acta, 1980. **589**(2): p. 162-75.
65. Chen, O.S., S. Hemenway, and J. Kaplan, *Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfb1p affects Fe-S cluster synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12321-6.
66. Ross, R.A., B.A. Spengler, and J.L. Biedler, *Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.* J Natl Cancer Inst, 1983. **71**(4): p. 741-7.
67. Biedler, J.L., Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones.* Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3751-7.

68. Hirsh, M., A.M. Konijn, and T.C. Iancu, *Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 30-8.
69. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.
70. Cisternas, F.A., Tapia G, Arredondo M, Cartier-Ugarte D, Romanque P, Sierralta WD, Vial MT, Videla LA, Araya M. *Early histological and functional effects of chronic copper exposure in rat liver*. Biometals, 2005. **18**(5): p. 541-51.
71. Kontoghiorghes, G.J., Aldouri MA, Hoffbrand AV, Barr J, Wonke B, Kourouclaris T, Sheppard L. *Effective chelation of iron in beta thalassaemia with the oral chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one*. Br Med J (Clin Res Ed), 1987. **295**(6612): p. 1509-12.
72. Campanella, A., Rovelli E, Santambrogio P, Cozzi A, Taroni F, Levi S. *Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability: hypothesis for a protective role in Friedreich ataxia*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(1): p. 1-11.
73. Pantopoulos, K., Mueller S, Atzberger A, Ansorge W, Stremmel W, Hentze MW. *Differences in the regulation of iron regulatory protein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9802-8.
74. Kaur, D., Lee D, Ragapolan S, Andersen JK., *Glutathione depletion in immortalized midbrain-derived dopaminergic neurons results in increases in the labile iron pool: implications for Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(5): p. 593-8.
75. Moreira, P.I., Harris PL, Zhu X, Santos MS, Oliveira CR, Smith MA, Perry G. *Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts*. J Alzheimers Dis, 2007. **12**(2): p. 195-206.
76. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Rodés J, Yi JR, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. *Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. Expression studies in Xenopus laevis oocytes*. J Biol Chem. 1995 Jul 7; **270**(27):15946-9.
77. Symons MCR, and Gutteridge JMC (Eds). *Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology and Medicine*. New York, NY: Oxford University Press, 1998. p 40-60.

