



UCH-FC
MAG-BMCN
A729
C.L

**“Rol de ferritina mitocondrial en la desregulación de la
homeostasis del hierro celular en un modelo
experimental de la enfermedad de Parkinson”**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

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

Facultad De Ciencias

Por

Enrique Antonio Armijo Fuentes

Junio 2010

Director de Tesis Dr:
MARCO T. NÚÑEZ GONZÁLEZ





A mis padres, Enrique y Rebeca, quienes con amor y sacrificio me han ayudado a seguir adelante, han estado siempre a mi lado y me han puesto de pie cada vez que he caído.

A mis amigos por su confianza y lealtad, han sido un apoyo en mi camino.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Tulio Núñez, por darme la libertad para investigar, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo. Por permitirme participar en un proyecto de colaboración entre su grupo y el grupo del Dr. Etienne Hirsch.

Al Dr. Etienne Hirsch por permitirme realizar algunos de los experimentos de esta tesis en su laboratorio UPMC/INSERM UMR_S 975, Paris, Francia. Por financiar parte de mi estadía y por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como persona e investigador.

A mis padres, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos.

A mi tía Jovita y primos Pedro, Sergio, Pablo, Nicole y Anaís por su alegría y preocupación.

A mis abuelitas Jova y Azucena por su cuidado y cariño.

A mis amigos del Instituto Nacional en especial a Gabriel y Sebastian "Chino", por su amistad y su compañía por largos años.

A mis compañeros y amigos de carrera con quienes construimos conocimiento, compartimos mañanas, tardes y noches de estudio, por su amistad y compañía.

A Jorge Vera, por su gran amistad, los buenos momentos y la lucha por aprender a superar la frustración de los experimentos fallidos.

A mi familia y amigos que han comprendido mis "ausencias" por estudio y trabajo.

A mis maestros por su disposición y ayuda brindadas.

A cada uno con los que me he cruzado en este camino.

A mi comisión de evaluación, Dr. Wolff y Dr. González, por su colaboración, aportes y críticas que me han influido positivamente a nivel científico y personal.



INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. Enfermedad de Parkinson (EP)	1
1.1. Disfunción Mitocondrial en EP	3
1.2 Aumento del hierro celular en la EP	4
2. Estrés oxidativo y el hierro como productor de ROS	5
3. Homeostasis neuronal del hierro	8
3.1. Componentes de la homeostasis celular del hierro	8
3.2. Reservorio rehierro lábil (LIP)	9
3.3. Proteínas reguladoras de hierro (IRPs)	11
3.4. Proteínas de Almacenaje de hierro	13
3.4.1. Ferritina Citosólica (cFt)	13
3.4.2. Metabolismo del hierro mitocondrial	16
2.4.2.1. Ferritina Mitocondrial (MtFt)	18
HIPOTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
MATERIALES Y METODOS	22
1. MATERIALES	22
1.1. Reactivos Generales	22
1.2. Cultivo Celular	23
1.3. Material Biológico	23
1.4. Anticuerpos	24
1.5. Fluoróforos	24
1.6. Equipos	24



2. METODOS	25
2.1. Cultivo Celular	25
2.2. Tratamiento de células SH-SY5Y con variadas concentraciones de rotenona como inhibidor del complejo I mitocondrial y viabilidad celular	25
2.3. Determinación de ATP	26
2.4. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y.	26
2.4.1. Reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP)	26
2.4.2. Reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP)	27
2.5. PCR en tiempo real (RT-qPCR)	28
2.5.1. Obtención de ARN total desde células SH-SY5Y	29
2.5.2. Transcripción reversa (RT)	29
2.5.3. PCR en tiempo real	30
2.6. Aislamiento de mitocondrias	31
2.7. Western Blots del extracto celular y la fracción mitocondrial	32
2.8. Transfección estable de células SH-SY5Y mediante lipofectamina	33
RESULTADOS	36
1. Viabilidad Celular en células SH-SY5Y	36
1.1. Antecedentes	36
1.2. Rotenona disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente	36
2. Niveles de ATP celular en células SH-SY5Y	37



2.1. Antecedentes	37
2.2. Rotenona provoca una disminución del ATP celular	37
3. Expresión de ferritina citosólica (Ft)	38
3.1. Antecedentes	38
3.2. Rotenona produce el aumento en la síntesis de cFt	39
3.2.1. ARNm de cFt	39
3.2.2. Proteína de cFt	40
4. Expresión de Ferritina Mitocondrial (MtFt)	42
4.1. Antecedentes	42
4.1.2. Hierro produce un aumento en la síntesis de MtFt	43
4.1.3. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH- SY5Y expuestas a condiciones de deficiencia de hierro	44
4.2. Rotenona produce un aumento en la síntesis de ferritina mitocondrial	47
4.2.1. ARNm de MtFt	47
4.2.2. Proteína de MtFt	48
5. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células expuestas a rotenona	49
6. Expresión de DMT1	51
6.1. Antecedentes	51
6.2. Rotenona produce un aumento en la síntesis de DMT1	53
6.2.1. ARNm de DMT1	53



6.2.2. Proteína de DMT1+IRE	54
7. Expresión de ferroportina 1	55
7.1. Antecedentes	55
7.2. Rotenona induce un aumento transitorio en los niveles de ferroportina 1	56
7.2.1. ARNm de ferroportina 1	56
7.2.2. Proteína de ferroportina 1	57
8. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo	58
8.1. Antecedentes	58
8.1.2. Rotenona induce la expresión de Nrf2	59
8.1.2.1. ARNm de Nrf2	59
8.1.2.2. Proteína de Nrf2	60
8.1.3. Rotenona induce la expresión de mtHsp70/mortalina	61
8.1.3.1. ARNm de mtHsp70	61
8.1.3.2. Proteína de mtHSP70	62
9. Knock-down de MfFt en células SH-SY5Y	63
9.1. Antecedentes	63
9.2. El knock-down de MfFt protege a células SH-SY5Y de la muerte celular mediada por rotenona	65
9.3. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo en células SH-SY5Y knock-down para MfFt	66
DISCUSION	68
1. Rotenona disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente	68

2. Rotenona disminuye los niveles de ATP celular	68
3. Rotenona produce el aumento en la síntesis de ferritina citosólica	68
4. Rotenona produce el aumento en la síntesis de ferritina mitocondrial	70
5. Rotenona produce un aumento en la síntesis de DMT1	72
6. Rotenona produce un aumento transitorio en la síntesis de ferroportina 1	72
7. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo	73
7.1. Nrf2	73
7.2. mtHsp70	74
8. Consecuencias del knock-down de MfFt en células SH-SY5Y	75
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	80





LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metabolismo del hierro celular neuronal	11
Figura 2 Regulación post-transcripcional de cFt y TfR	14
Figura 3 Representación de Ferritina citosólica (cFt)	15
Figura 4 Plasmido pDNA 6.2-GW/EmGFP-miR	34
Figura 5 Viabilidad celular en células expuestas por 24 horas a rotenona	36
Figura 6 Determinación de los niveles de ATP en células expuestas a rotenona	38
Figura 7 RT-qPCR de la subunidad pesada de ferritina citosólica (cFtH)	39
Figura 8 RT-qPCR de la subunidad liviana de ferritina citosólica (cFtL)	40
Figura 9 Expresión de las subunidades de ferritina citosólica en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	42
Figura 10 El hierro induce la expresión de la proteína MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga con este metal	44
Figura 11 Distribución de las sondas RPA y calceína en células SH-SY5Y	45
Figura 12 Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP) y mitocondrial (mLIP) en SH-SY5Y expuestas a hierro 2 μ M y 7 μ M por 24 horas	46
Figura 13 RT-qPCR de ferritina mitocondrial (MtFt)	47
Figura 14 Expresión de ferritina mitocondrial (MtFt) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	49



Figura 15	51
Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona por 12 horas y 24 horas	
Figura 16	52
Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona por 12 horas y 24 horas	
Figura 17	54
RT-qPCR de DMT1+IRE	
Figura 18	55
Expresión de DMT1+IRE en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	
Figura 19	56
RT-qPCR de Ferroportina 1	
Figura 20	57
Expresión de ferroportina 1 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	
Figura 21	59
RT-qPCR de Nrf2	
Figura 22	60
Expresión de Nrf2 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	
Figura 23	62
RT-qPCR de mtHsp70	
Figura 24	63
Expresión de mtHsp70 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona	
Figura 25	64
Células SH-SY5Y knock down para MfFt	
Figura 26	66
Viabilidad celular en células knock down para MfFt expuestas por 24 horas a 1 μ M rotenona	
Figura 27	67
Expresión de Hsp90, Hsp70 y Nf- κ B en células SH-SY5Y knock down para MfFt	
Figura 28	78
Efecto de rotenona en neuronas dopaminérgicas humanas SH-SY5Y	

ABREVIATURAS

ADN	:	Acido desoxiribonucleico
ADNc	:	Acido desoxiribonucleico complementario
ARNm	:	Acido ribonucleico mensajero
DMT1	:	Transportador de metales divalentes
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
NTA	:	Acido nitrilotriacético
cFt	:	Ferritina citosólica
cFtH	:	Sub-unidad pesada de cFt
cFtL	:	Sub-unidad liviana de cFt
MtFt	:	Ferritina mitocondrial
Tf	:	Transferrina
TfR	:	Receptor de transferrina
IRE	:	Elemento de respuesta a hierro
IRPs	:	Proteínas reguladoras de hierro 1 y 2, IRP1 y IRP2
LIP	:	Pool de hierro lábil o reactivo
mLIP	:	Pool de hierro lábil mitocondrial
cLIP	:	Pool de hierro lábil citosólico
O ₂ ⁻	:	Radical superoxido
·OH	:	Radical hidroxilo
PBS	:	Solución tampón de fosfato salino
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno
SH-SY5Y	:	Línea celular de neuroblastoma humano



RESUMEN

El gran número de enfermedades neurodegenerativas, producto de un aumento en las expectativas de vida de la población mundial, constituye uno de los mayores problemas de salud pública. En el campo de la enfermedad de Parkinson (EP), se estima una duplicación en la prevalencia de la enfermedad entre los periodos 2005-2030. La hipótesis de que el estrés oxidativo favorecería la neurodegeneración basado en la existencia de acumulación de hierro en la enfermedad, ha sido determinada y comprobada a través de diversas evidencias. Sin embargo los mecanismos que llevarían a la acumulación de hierro aún no han sido determinados. El descubrimiento de proteínas mitocondriales implicadas en la homeostasis celular del hierro, como ferritina mitocondrial (MtFt), una ferritina similar a la sub-unidad H de ferritina citosólica (cFt); sugiere un mayor nivel de complejidad del metabolismo celular y mitocondrial de este metal. La expresión de MtFt esta restringida a células con elevada actividad respiratoria, como espermatozoides y neuronas. Se postula que la principal función asociada a esta proteína es el secuestro del exceso de hierro y la protección del daño oxidativo. Esta función al interior de la mitocondria es de principal interés, ya que en estos organelos se realiza la síntesis de grupos hem y complejos Fe-S y por lo tanto están expuestos a un tráfico importante de hierro.

En esta tesis se estudió el papel de MtFt y cFt en células neuronales expuestas a rotenona, un modelo de EP. En particular, se observó el aumento del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP) debido a un aumento de los niveles de DMT1+IRE, una disminución de los niveles de cFt y de ferroportina. El aumento de MtFt observado, podría destinar el hierro incorporado hacia la mitocondria, lo que favorecería el aumento en los niveles del reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP). Esto favorecería el aumento del estrés oxidativo, del daño celular y la muerte celular.

SUMMARY

The number of neurodegenerative diseases as a consequence of the increase in lifespan of world population, constitutes one of the major problems of public health. In the field of Parkinson's disease (PD), studies have projected a doubling of its prevalence in the period 2005-2030. The hypothesis that oxidative stress contributes to neurodegeneration in PD is based on the pro-oxidant catabolism of dopamine and the existence of iron accumulation, which has been determined and verified through a variety of evidences. Yet, the mechanism of iron accumulation has not been determined. The recent discovery of mitochondrial proteins implicated in iron homeostasis, such as mitochondrial ferritin (MtFt), a novel ferritin H chain-like protein; suggest a level of complexity in cellular and mitochondrial iron metabolism not previously imagined. In contrast to cytosolic ferritin (cFt), MtFt expression correlates with the number of mitochondria rather than the iron storage capacity of the cell. It has been suggested that the role of MtFt is protection against oxidative damage to the mitochondria. Its function in the mitochondria is extremely important since this organelle is the site of heme and Fe-S cluster synthesis. Thus, iron in mitochondria must be available for synthesis while remaining controlled for its potential oxidative damage.

In this thesis, we studied the role of MtFt y cFt in neuron cells exposed to rotenone, a cellular model of PD. In particular, there was an increase in the cytosolic labile iron pool (cLIP) due to an increased level of DMT1+IRE, a decreased level of cFt and ferroportin. The increase observed for MtFt, resulted in increased iron incorporated into the mitochondria, thereby increasing the levels of mitochondrial labile iron pool (mLIP). These events should promote the increase of oxidative stress, cell damage and cell death.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Parkinson (EP)

En 1817, el médico británico James Parkinson describió los aspectos clínicos centrales de la que actualmente es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer (EA). En su célebre monografía sobre la parálisis agitante, "Essay on the Shaking palsy", Parkinson, describió un síndrome caracterizado por la presencia de temblores en reposo, parálisis y cambios posturales. La enfermedad de Parkinson (EP), como fue posteriormente nombrada en lugar de parálisis agitante, es el desorden relacionado al movimiento más frecuente en el mundo. La prevalencia en países industrializados aumenta marcadamente con la edad y es estimada cercana al 1% en personas sobre los 60 años y en un 4% en personas de 80 años de edad (Nussbaum y Ellis, 2003). La edad de inicio de los síntomas es cercana a los 55 años (Dauer y Przedborski, 2003).

Clínicamente, EP es definida como la combinación de problemas motores centrales progresivos como son: temblores involuntarios, rigidez muscular, bradicinesia o lentitud en los movimientos, pérdida de los reflejos posturales, inestabilidad postural e incapacidad para comenzar movimientos voluntarios (fenómeno conocido como congelamiento o freezing). Problemas emocionales, cognitivos y psiquiátricos ocurren frecuentemente en estos pacientes (Dauer y Przedborski, 2003).

Fisiológicamente, EP se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que conforman el circuito nigroestriado y la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas, denominados cuerpos de Lewy (LBs), en las neuronas remanentes. Los cuerpos celulares de las neuronas del circuito nigroestriado se encuentran localizados en la *Substancia Nigra pars compacta* (SNpc) y se proyectan al ganglio basal, donde forman sinapsis con los núcleos putamen y caudado en el estriado. La pérdida de estas neuronas, las cuales normalmente contienen el pigmento

neuromelamina (Marsden, 1983), produce la despigmentación de la SNpc, un marcador patológico de la enfermedad. En el inicio de los síntomas, cerca del 80% de la dopamina liberada en el putamen ha disminuido y cerca del 60% de las neuronas dopaminérgicas se han perdido. En vida, el diagnóstico de la EP se hace sobre bases clínicas pero el diagnóstico definitivo requiere la identificación de LBs y la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el tejido *postmortem*. LBs no son específicos de EP, también son encontrados en una condición denominada "demencia con cuerpos de Lewy" y en EA (Gibb y Lees, 1988). LBs son estructuras esféricas de agregados proteicos citoplasmáticos eosinófilos compuestas de numerosas proteínas entre las que se incluyen α -sinucleína, parkina, ubiquitina y neurofilamentos (Forno, 1996; Spillantini y col, 1998). El rol de LBs en la muerte neuronal es contradictorio, algunos estudios establecen una relación entre una mayor ocurrencia de EA y EP y la presencia de LBs.

La etiología de EP no es completamente comprendida. En unos pocos casos la enfermedad puede ser atribuida directamente a mutaciones genéticas heredadas (los cuales representan sólo el 5% de los casos), sin embargo la gran mayoría de los casos son considerados como esporádicos e idiopáticos. Varios estudios han tratado de definir la contribución ambiental en la etiología. Una vida rural asociada al uso de pesticidas y herbicidas, la agricultura y el beber agua de pozo podría ser un factor de riesgo en el desarrollo de una EP de inicio temprano (Priyadarshi y col., 2001). Sin embargo, el descubrimiento de genes asociados a EP ha renovado el interés en factores de susceptibilidad hereditaria. Factores genéticos y ambientales han sido asociados a la incidencia a la enfermedad y han entregado indicios de los mecanismos involucrados en la disfunción y muerte celular. Los eventos que han sido relacionados con la neurodegeneración en la EP son: (i) la disfunción mitocondrial, causada por una inhibición específica del complejo I, (ii) un aumento en el estrés oxidativo producto de un aumento en los niveles de hierro celular y una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH)

(iii) excitotoxicidad, (iv) la alteración del sistema ubiquitina-proteasoma e (v) la inflamación.

1.1. Disfunción Mitocondrial en EP

La primera evidencia de que un defecto en la fosforilación oxidativa juega un rol importante en la patogénesis de la EP provino del descubrimiento del compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Nicklas y col., 1987). En 1982, jóvenes drogadictos desarrollaron un rápido y progresivo síndrome parkinsoniano debido al uso intravenoso de 1-metil-4-fenil-4-propion-oxipiperidina (MPPP), un análogo de meperidina (Demerol) (Langston y col., 1983). El compuesto MPTP fue el contaminante neurotóxico producido durante la síntesis de esta droga. En humanos y monos, MPTP produce un irreversible y severo síndrome parkinsoniano. MPTP es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y posteriormente es oxidado en el ion 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+) por la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) localizada principalmente en la mitocondria de células gliales. El metabolito activo del MPTP, el MPP+ es un inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y sustrato para el transportador de dopamina (DAT). El MPP+ ingresa a las neuronas dopaminérgicas vía DAT produciendo toxicidad y muerte celular.

Estudios posteriores identificaron una disminución en la actividad del complejo I en la SNpc de pacientes con EP (Langston y Ballard, 1983; Schapira y col., 1990; Greenamyre y col., 2001). Intoxicaciones en ratones, monos y cultivos celulares con inhibidores de la actividad del complejo I como son MPP+, rotenona y paraquat (Sherer, 2003) son utilizados como modelos experimentales de la EP (Olanow, 2007) produciendo en estos la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas remanentes, similares a las observadas en pacientes con EP. Los principales efectos producidos por la inhibición del complejo I son un aumento en la producción de radicales libres y estrés oxidativo y una disminución de la síntesis de ATP, lo cual causa un

incremento en la concentración de calcio intracelular, excitotoxicidad y daño celular relacionado con óxido nítrico (Scotcher y col., 1990).

1.2. Aumento del hierro celular en la EP

Un aumento en el contenido de hierro total en la SN de pacientes con EP, ha sido reportado en estudios postmortem a través de diferentes métodos (Sofic y col., 1988, Dexter y col., 1989, Hirsch y col., 1991). Estos resultados han sido confirmados por estudios de ultrasonido, resonancia magnética nuclear (Gorell y col., 1995) y en modelos animales de la enfermedad (Harley y col., 1993). Además de este aumento en el contenido de hierro, se ha determinado un cambio en la relación (Fe^{2+}/Fe^{3+}) desde 2 en cerebros control a 0.5-1 en la SN de cerebros parkinsonianos (Sofic y col., 1988; Riederer y col., 1989). El hierro acumulado está presente en neuronas dopaminérgicas y microglías activadas de la sustancia nigra (Hirsch y col., 1991; Morris y col., 1995).

Los mecanismos por los cuales podría estar ocurriendo este aumento de hierro en la EP aún no han sido determinados, pero algunos estudios sugieren que la desregulación del hierro celular es mediada por un aumento en la actividad de la proteína reguladora de hierro 1 (IRP1).

Cultivos primarios de gránulos cerebrales (CGN) tratados con MPP⁺ muestran una disminución tiempo dependiente de la actividad aconitasa total (citoplásmica y mitocondrial), esta inactivación de la actividad aconitasa podría ser mediada por el desensamblaje oxidativo del complejo hierro-azufre debido al aumento en los niveles de ROS y RNS, lo que genera un incremento en la actividad de unión de IRP1 a IRE. Esto genera la estabilización del ARNm del TfR, el aumento en la síntesis del TfR y el consecuente aumento en la incorporación de hierro celular desde Tf (Shang y col., 2004). Estudios en nuestro laboratorio, indican un aumento en la actividad de IRP1 y en los niveles del transportador de hierro DMT1+IRE en neuronas de la SNpc de ratas tratadas con 6-OHDA (neurotoxina que aumenta la generación de radicales libres y utilizada en modelos

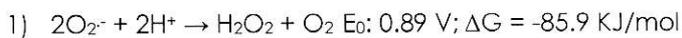
de EP) (Salazar y col., 2006). Estos resultados son consistentes con la hipótesis que la incorporación de hierro en EP es mediada por un aumento en la actividad IRP1 a través de un transporte dependiente del TfR y DMT1, generándose una respuesta similar a la observada en células expuestas a concentraciones deficientes de hierro.

Liang y Patel en el año 2004 determinaron un aumento temprano del reservorio de hierro lábil o redox-activo mitocondrial (mLIP) en las fracciones mitocondriales neuronales de la SN de ratones intoxicados con MPTP seguido por un aumento del contenido del hierro citosólico. Paralelamente a la acumulación del hierro mitocondrial inducido por MPTP se observa la inactivación de la enzima aconitasa mitocondrial. Estos resultados sugieren que MPTP moviliza dos reservorios de hierro distintos, un reservorio mitocondrial temprano que precede a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y un reservorio citosólico tardío que coincide con la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Liang y Patel 2004).

2. Estrés oxidativo y el hierro como productor de ROS

En vertebrados, numerosos procesos fisiológicos incluyendo el transporte de oxígeno, la síntesis de ATP y fosforilación oxidativa, la síntesis de ADN, la síntesis y metabolismo de algunos neurotransmisores y hormonas, y ciertos aspectos de la defensa inmune requieren de proteínas que utilizan hierro como cofactor (Youdim y col., 1990; Hill, 1985; Gutteridge y Halliwell, 2000, Wu y col., 2004). El hierro participa en los procesos metabólicos experimentando reacciones de oxido-reducción, la cual permite a este metal sufrir interconversión entre los estados de catión divalente o ferroso (Fe^{2+}) y el catión trivalente o férrico (Fe^{3+}) (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005). La habilidad de donar y aceptar un electrón en estas reacciones no sólo contribuye al rol crítico del hierro en procesos fisiológicos, sino que también puede guiar a un importante estrés oxidativo celular mediante la producción de radicales libres cuando un exceso de este metal está presente (Wardman y Candeias, 1996).

El estrés oxidativo es generalmente definido como un desbalance entre estímulos pro y anti-oxidantes que favorece la producción de especies reactivas (RS) por sobre las defensas antioxidantes, guiando a un daño oxidativo. Entre las RS se incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), halógenos reactivos y especies sulfuro-reativas. Las ROS incluyen a radicales de oxígeno y derivados no radicales del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ozono (O_3). El precursor de gran parte de las ROS es el radical libre anión superóxido (O_2^-), el cual posee un electrón no apareado y es el producto de la reducción incompleta del oxígeno molecular (O_2) producido durante la respiración mitocondrial normal (Chance y col., 1979). La posterior dismutación del O_2^- de manera espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), produce la reducción de O_2^- en H_2O_2 (1).

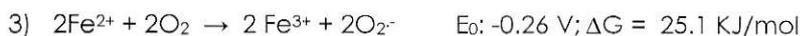


El H_2O_2 es débilmente reactivo y es capaz de atravesar membranas celulares participando en procesos de transducción de señales. A pesar de su poca reactividad, el H_2O_2 puede ser citotóxico y aunque una pequeña parte del daño celular mediado por H_2O_2 es directo, por ejemplo la inactivación de la enzima glicolítica G3PDH (Brodie y Reed, 1987), el H_2O_2 es capaz de producir la oxidación de lípidos, ADN y proteínas debido a la reacción con hierro.

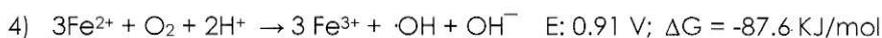
El hierro es productor de radicales libres mediante una reacción no-enzimática conocida como reacción de Fenton, en donde el hierro en su estado reducido (Fe^{2+}) media la conversión de H_2O_2 al radical hidroxilo ($\cdot OH$), el que es altamente reactivo (2).



Similarmente, el ambiente reductor intracelular favorece la reacción entre Fe^{2+} y oxígeno molecular, generando el anión superóxido en una reacción conocida como reacción de Haber-Weiss (3).



Estas tres reacciones conforman la base de la relación Fe/ROS en ambientes intracelulares. Su acoplamiento resulta en la reacción 4 (la cual es altamente favorable), la que establece la relación entre hierro y la producción del radical hidroxilo.



La forma oxidada de hierro (Fe^{3+}) producido en las reacciones 2) y 3) es nuevamente reducido por reductores celulares, como O_2^- , ascorbato y glutatión reducido (GSH), comportándose como catalizadores de la producción de los radicales libres hidroxilo y anión superóxido.

Existe importante evidencia que indica una relación entre la acumulación de hierro en el cerebro con la edad y el estrés oxidativo que podría causar un amplio rango de desordenes neurodegenerativos del sistema nervioso central, entre los que se cuentan las enfermedades de Huntington (Moos y Morgan, 2004), Ataxia de Friedreich, anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, EP y EA. Una acumulación celular de hierro y la posterior formación del $\cdot\text{OH}$ guía a varias formas de modificaciones oxidativas reversibles e irreversibles de lípidos (derivados lipídicos de hidroperóxido), ADN (aductos y quiebres) y proteínas (carbonilación y modificaciones nitro) cuyo mal plegamiento y agregación guían a la formación de cuerpos de inclusión intracelulares, los cuales son marcadores postmortem de muchas enfermedades neurodegenerativas (Alam y col., 1997a; Alam y col., 1997b; Dexter y col., 1994; Spencer y col., 1994).

Dado el número de enfermedades neurológicas asociadas con una acumulación de hierro en el cerebro y la necesidad de aumentar el conocimiento de los mecanismos

de la homeostasis de hierro en neuronas y glías se ha estimulado el estudio de los mecanismos involucrados en el transporte y almacenamiento del hierro en el cerebro. Sin embargo, en el caso de la EP aún se desconoce los cambios de expresión de proteínas citosólicas y mitocondriales involucradas en el metabolismo del hierro y la relación con el desarrollo de esta enfermedad.

Debido a que el hierro es un metal potencialmente tóxico, las células despliegan mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales de regulación que son analizadas a continuación.

3. Homeostasis neuronal del hierro

3.1. Componentes de la homeostasis celular del hierro

En el plasma sanguíneo el hierro es transportado principalmente como Fe^{3+} asociado a la proteína de unión a hierro, Transferrina (Tf), una proteína que puede transportar 1 ó 2 átomos de hierro por molécula (HoloTf). Después de la unión de la HoloTf a su receptor (TfR) presente en la membrana plasmática, se produce la internalización del complejo HoloTf-TfR hacia el citosol a través de vesículas endocíticas (Richardson y Ponka, 1997). El hierro presente en la HoloTf es liberado en un compartimiento endosomal acidificado, para luego ser reducido a Fe^{2+} y transportado a través de la membrana endosomal hacia el citosol por el transportador de metales divalentes (DMT1 o DCT1, Nramp2) (Andrews, 1999). La Tf libre de hierro (ApoTf) es transportada unida a TfR, hacia la membrana plasmática, donde es liberada a la circulación para un nuevo ciclo de movilización y entrega de hierro (Figura 1).

El nuevo hierro incorporado en el citosol puede: (i) formar parte del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP, Labil Iron Pool) o hierro reactivo citosólico, (ii) ser almacenado por la proteína ferritina citosólica (cFt) (Harrison y Arosio, 1996) o (iii) el exceso ser eliminado mediante el transportador de salida de hierro Ferroportina 1 (Ireg1 o MTP1). En el

medio extracelular, la enzima ferroxidasa ceruloplasmina es la responsable de la oxidación del Fe^{2+} para ser unido a ApoTf.

Aunque el exceso de hierro es almacenado en el citosol, mucho del hierro metabólicamente activo es procesado en la mitocondria. El hierro que es destinado a este organelo puede: (i) formar parte del reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP) o hierro reactivo mitocondrial, (ii) abastecer a este organelo de hierro para la síntesis de grupos hem y complejos hierro-azufre o (iii) ser almacenado en la mitocondria, por la proteína ferritina mitocondrial (MfFt) (Levi y col., 2001).

En el plasma sanguíneo, además existe hierro no unido a Tf, este hierro puede ser incorporado a la célula por la presencia de DMT1 en la membrana plasmática. Antes de que el hierro no unido a Tf sea incorporado por DMT1, el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por la enzima duodenal citocromo b (Dcytb) (McKie y col., 2001). Dcytb es expresada también en el bazo y probablemente en el hígado (Latunde-Dada y col., 2004), pero no existen reportes de expresión de Dcytb en células cerebrales.

3.2. Reservorio de hierro lábil (LIP)

Aunque la mayor parte del hierro presente en la célula se encuentra asociado a una amplia variedad de proteínas, una fracción menor de hierro se encuentra débilmente unida a una población heterogénea de compuestos de bajo peso molecular como fosfatos, nucleótidos, grupos hidroxilos, aminos y sulfidrilos (Kakhlon y Cabantchik, 2002; Petrat y col., 2002). Estas formas, colectivamente definidas como reservorio de hierro lábil o LIP, están asociadas a importantes funciones: (i) fisiológicamente, LIP es la fuente de hierro disponible para ser incorporado en proteínas que requieren de complejos hierro-azufre o grupos Hem para su función, (ii) farmacológicamente, es el blanco de quelantes y de neutralizadores de radicales libres (free-radical scavengers) y (iii) toxicológicamente, actúan promoviendo la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton.

Debido al ambiente reductor celular, el hierro en el LIP se encuentra predominantemente en el estado de Fe^{+2} . Normalmente, LIP representa 3-5% del hierro celular total. Sin embargo, esta proporción es modulada por factores intrínsecos y extrínsecos tales como la sobrecarga de hierro (Breuer y col., 1996), el tratamiento con quelantes (Zanninelli y col., 1997; Zanninelli y col., 2002) y la manipulación de la expresión de ferritina (Epsztejn y col., 1999; Kakhlon y col., 2001). A modo de ejemplo, células de neuroblastoma cultivadas en condiciones de alto hierro contienen 3-4 veces más LIP que células cultivadas en condiciones de bajo hierro (Núñez y col., 2004). Además, células con LIP alto invariablemente presentan mayores niveles de ROS.

La determinación y el estudio de los niveles de LIP en células vivas se han realizado mediante el uso de sondas fluorescentes. Estas moléculas unen con baja afinidad el hierro disponible. Luego de la unión del hierro, la sonda sufre un cambio conformacional, lo que produce el apagamiento de su fluorescencia (quenching). La disminución de la fluorescencia es proporcional al hierro lábil presente. La adición de un quelante permeable y de alta afinidad por hierro, desplaza el hierro unido a la sonda y le devuelve a ésta su fluorescencia máxima (Espósito y col., 2002). La diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada tras agregar el quelante permeable y la fluorescencia basal es proporcional a la magnitud del LIP. El desarrollo de sondas fluorescentes con destinación subcelular ha permitido la determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico (cLIP) (Breuer y col., 1995) y mitocondrial (mLIP) (Petrat y col., 2001; Petrat y col., 2002). Después de cargar las células con la sonda, la fluorescencia intracelular puede ser visualizada con microscopía de fluorescencia o confocal (Petrat y col., 1999), y cuantificada con lector de fluorescencia de microplacas (Espósito y col., 2002).

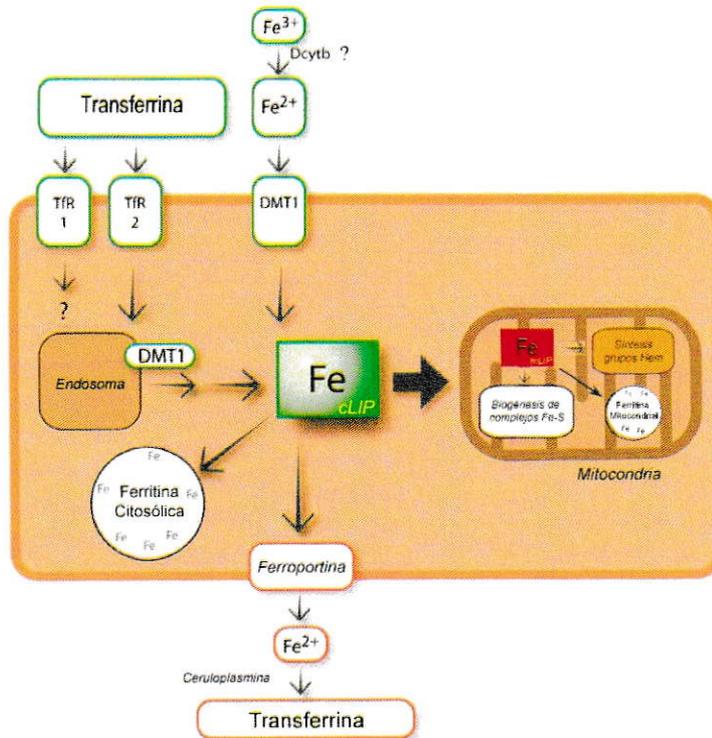


Figura 1. Metabolismo del hierro celular neuronal. La HoloTf se une a su receptor, TfR, en la superficie celular. Este complejo (HoloTf-TfR) se localiza en una cavidad cubierta de clatrina, la membrana se invagina iniciando la internalización mediante endocitosis. La acidificación del endosoma, mediado por una bomba de protones, es necesaria para la liberación del hierro desde Tf, el cual es transportado fuera del endosoma por el transportador DMT1. La ApoTf es devuelta a la membrana celular unida a TfR, donde, a pH neutro, se disocia para participar nuevamente de ciclos de entrega de hierro. El hierro entregado puede ser transportado a la mitocondria o ser almacenado en la forma de cFt y hemosiderina en el citosol. cLIP (Reservorio de hierro reactivo citosólico), mLIP (Reservorio de hierro reactivo mitocondrial). TfR1 es ubiquitariamente expresado, mientras que la expresión de TfR2 se encuentra restringida a hepatocitos, células crípticas duodenales y células eritroides. Sin embargo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y los niveles de TfR1 fueron menores a los observados para TfR2. (Modificado de Hentze y col., 2004).

3.3. Proteínas reguladoras de hierro (IRPs)

El mecanismo de control homeostático del hierro es realizado principalmente por proteínas que registran la disponibilidad del metal a través de interacciones directas con el hierro lábil presente en el citosol, el cLIP. Estas proteínas de unión a ARN, conocidas con el nombre de proteínas reguladoras de hierro 1 y 2 (IRP1 e IRP2, de **I**ron **R**egulatory **P**rotein) y que en conjunto son denominadas IRPs, son responsables del control post-transcripcional de los ARN mensajeros de proteínas involucradas en el metabolismo celular del hierro. Este control se ejerce a través de la asociación de las IRPs con sitios altamente conservados,

conocidos como elementos de respuesta a hierro (IREs de **I**ron **R**esponsive **E**lement) presentes en la región 5' y 3' no traducida (UTR de **U**ntranslated **R**egion) de un ARNm. Estas proteínas permiten optimizar la función de numerosos componentes celulares dependientes de hierro ajustando rápidamente las concentraciones de cLIP (Hentze y Kühn, 1996). La unión de estas proteínas a un IRE presente en el 5' UTR, como en el ARNm de las sub-unidades de cFt, controla la unión de los ribosomas al ARNm, pero cuando un IRE está presente en el 3' UTR, como en el ARNm de TfR, la síntesis de proteína es controlada a través de la degradación del ARNm. Un aumento en los niveles del hierro citosólico guía a la formación de un complejo hierro-azufre [4Fe-4S], presente en el sitio activo de IRP1. La formación de este complejo previene la unión de esta proteína a IREs, así, el ARNm de las sub-unidades de cFt es traducido libremente y el ARNm de TfR es degradado por endonucleasas no caracterizadas. El aumento en los niveles de hierro citosólico guía a la degradación de IRP2 de manera hierro-dependiente, y su actividad no es regulada por un cambio en los complejos hierro-azufre (Rouault, 2006). Inversamente, una disminución del hierro citosólico guía al desensamblaje del complejo hierro-azufre lo que promueve un aumento en la actividad de unión de las IRPs a IRE con la consecuente disminución en cFt y un aumento de TfR (Figura 2).

La actividad de IRP1 además de ser modulada por los niveles de cLIP y la formación del complejo hierro-azufre presente en su estructura también puede ser modificada por ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). El complejo hierro-azufre de IRP1 puede ser oxidado y desestabilizado por oxígeno, óxido nítrico y peroxinitrito (Cairo y col., 2002) y puede ser indirectamente desensamblado por H₂O₂ mediante la activación de una vía de señalización (Mueller y col., 2001). Un aumento en la actividad de IRP1 ha sido observada en condiciones de estrés oxidativo, este aumento en la actividad produce un aumento en la entrada de hierro y una disminución de la capacidad de almacenamiento de este, lo que inevitablemente guía a un aumento en los niveles de LIP

y un aumento en la generación de ROS en un círculo vicioso el cual finaliza con la muerte celular (Núñez-Millacura y col., 2002; Núñez y col., 2003).

3.4. Proteínas de Almacenaje de hierro

3.4.1. Ferritina Citosólica (cFt)

La baja solubilidad de Fe^{3+} en condiciones fisiológicas ($K_d=10^{-18}$ M) ha permitido a los organismos vivos a adoptar durante la evolución mecanismos eficientes de transporte y almacenamiento del metal. La proteína cFt permite el secuestro y la mantención del hierro en una forma no tóxica y biodisponible. Las cFts se desarrollaron filogenéticamente temprano y están presentes en arqueobacterias, eubacterias, plantas, invertebrados y mamíferos. Las secuencias de ADN y proteína para ferritinas varían, especialmente en bacterias, pero sus estructuras terciarias y cuaternarias están altamente conservadas. En bacterias y plantas, las cFts están compuestas de 24 sub-unidades del mismo tipo, sin embargo, en mamíferos existen dos tipos de sub-unidades una pesada H (cFtH) y una liviana L (cFtL). Dependiendo del tipo celular, cFtH y cFtL se co-ensamblan en diferentes razones para formar una molécula multimérica de 24 sub-unidades (Andrews y col., 1992). La molécula de cFt es una esfera ahuecada con un diámetro externo de 12 a 13 nm. La cavidad central de cFt, de 7 a 8 nm de diámetro, es el sitio de almacenaje del hierro y es capaz de adquirir hasta aproximadamente 4.500 átomos de hierro, aunque su saturación normal es de 800 a 1000 átomos de hierro por molécula (Figura 3). Para ser almacenado, el hierro en el estado de oxidación Fe^{2+} entra a la cavidad central de cFt a través de canales hidrofóbicos. La posterior oxidación a Fe^{3+} , llevada a cabo por la sub-unidad cFtH, permite su mineralización. Bajo condiciones de bajo hierro citosólico, el hierro almacenado al interior de cFt es reducido a Fe^{2+} y transportado al exterior de cFt (Harrison y Arosio, 1996) aunque a una menor velocidad que la de entrada (Liu y col., 2007).

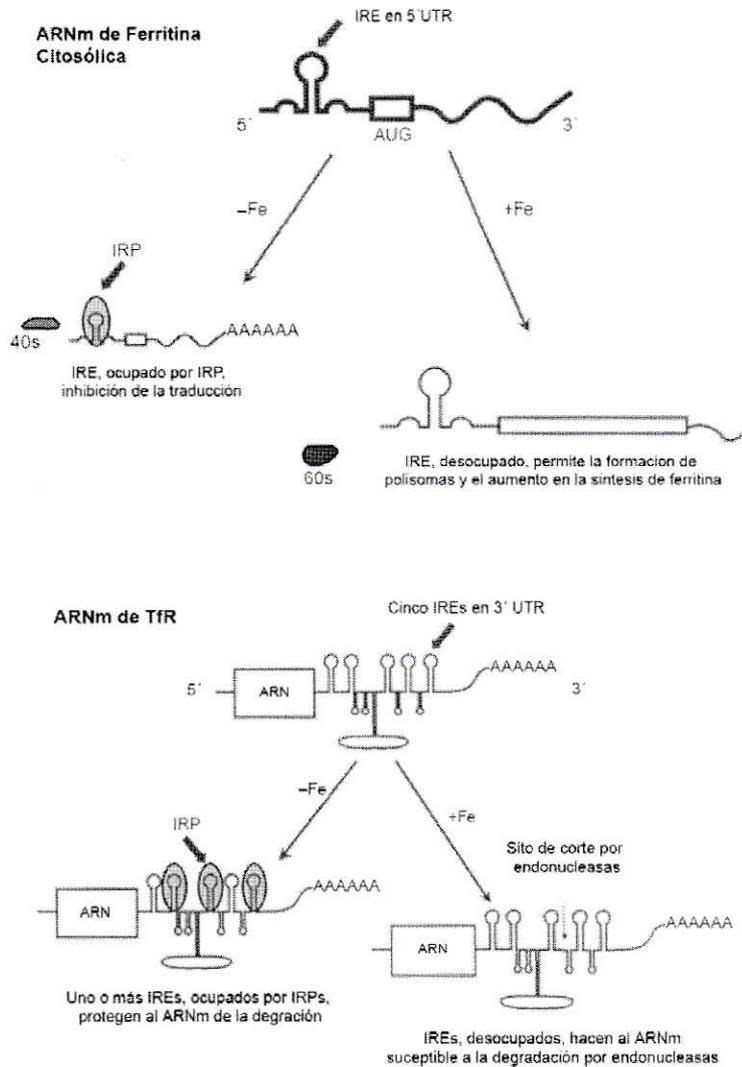


Figura 2. Regulación post-transcripcional de cFt y TfR. Los niveles de las proteínas de cFt y TfR son regulados post-transcripcionalmente por las proteínas reguladoras de hierro, IRPs. Estas proteínas son capaces de unirse a los elementos de respuesta a hierro, IREs, localizados en la región 3' y 5' no traducida de los ARNm de TfR y cFt, respectivamente. En condiciones de deficiencia de hierro, IRPs se unen a IREs, protegiendo el ARNm de TfR de la degradación por endonucleasas y previniendo la síntesis de ferritina. Cuando un exceso de hierro está presente, el IRP modificado no es capaz de unirse a los IREs – en el caso de IRP1 el sitio de unión es bloqueado por la formación de un complejo hierro-azufre [4Fe-4S], mientras que la proteína IRP2 es degradada en el proteosoma - permitiendo la expresión de ferritina y la degradación del ARNm de TfR (Modificado de Rouault, 2006).

cFtH (21 kDa) contiene la actividad ferroxidasa responsable de la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Los siete residuos de aminoácidos que contribuyen a la formación del centro ferroxidasa están conservados en todas las cFts, con excepción de la sub-unidad

cFtL (19 kDa) que posee la particularidad de ofrecer residuos de aminoácidos ácidos en la superficie de la cavidad que facilitan la nucleación y mineralización del hierro. cFts enriquecidas en cFtL son asociadas al almacenamiento de hierro, mientras que cFts enriquecidas en cFtH son asociadas a respuesta a estrés (Zecca y col., 2004). En el cerebro, cFts enriquecidas en cFtH se encuentran predominantemente en neuronas, cFts enriquecidas en cFtL se encuentran predominantemente en microglías, mientras que oligodendrocitos expresan cantidades similares de ambas sub-unidades (Connor y col., 1994). Una baja expresión de cFt es observada en astrocitos, indicando que estas células tienen poca capacidad de almacenamiento de hierro (Zecca y col., 2004).

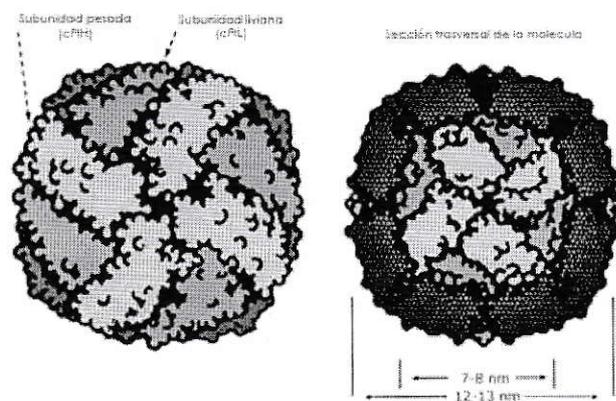


Figura 3. Representación de ferritina citosólica (cFt). cFt es una proteína esférica que consiste de 24 sub-unidades (o cadenas peptídicas) plegadas en elipsoides, conectadas a través de uniones no covalentes. Los dos tipos de sub-unidades, una pesada cFtH y una liviana cFtL, forman una esfera ahuecada de aproximadamente 7 a 8 nm de diámetro interno y un diámetro externo de aproximadamente de 12 a 13 nm que es capaz de secuestrar y mantener hierro en una forma no tóxica y biodisponible (Modificado de Kalantar-Zadeh K y col., 2006).

Un aumento en la transcripción del gen de cFtH ha sido observado en células expuestas a citoquinas (Torti y Torti, 2002), oxidantes como el H_2O_2 (Tsuji y col., 2000) y a inductores de la respuesta antioxidante de fase II como t-butilhidroquinona (t-BHQ), oltipraz y 1,2-ditioil-3-tion (D3T) (Pietsch y col., 2003). La inducción de la transcripción mediada por hierro del gen de cFtL, y no de cFtH, ocurre solamente luego de la exposición crónica a dosis de hierro extremadamente elevadas, lo que ha sido determinado en células HeLa y

ratas mediante el ensayo de transcripción run-on (nuclear run-on assay) (White y Munro, 1988; Cairo y col., 1985), mediante Northern blots en ratas y ranas (Dickey y col., 1987; Leggett y col., 1993) y mediante análisis de microarrays (Muckenthaler y col., 2003). El tratamiento con el quelante de hierro desferroxamina produce una disminución específica de los niveles de ARNm de cFtL. El mecanismo de regulación diferencial de cFtH y cFtL mediado por hierro es aún desconocido. En la actualidad, los efectos de la exposición a elevados niveles de hierro estarían relacionados con el daño oxidativo iniciado por hierro, en vez de una respuesta directa al hierro. cFt en conjunto con otros genes de respuesta antioxidante y detoxificación posiblemente permiten una defensa concertada en contra de insultos oxidativos (Balla y col. 1992; Torti y Torti, 2002; Hintze y Theil 2006).

Sobre el 90% del hierro citosólico es almacenado en cFt. Debido a que el hierro presente en ferritina no es redox-activo, este es considerado como hierro "seguro". Sin embargo, cada vez que ferritina es degradada (la vida media de ferritina presente en microglías es de 3-3,5 horas, Mehlhase y col, 2005) el hierro almacenado es liberado contribuyendo transcientemente al LIP y a un aumento de ROS.

3.4.2. Metabolismo del hierro mitocondrial

Desde su descubrimiento, la mitocondria es reconocida como un componente esencial y dinámico de la bioquímica celular. La mitocondria es un organelo central en varias funciones celulares incluyendo la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, la homeostasis intracelular de Ca^{2+} (Giorgi y col., 2008), hierro (a través de la biosíntesis de grupos hem y complejos hierro-azufre) pirimidinas y esteroides. Son las responsables de la formación de la mayor parte de ROS (Brookes y col., 2004) y actúan como los ejecutores en la apoptosis mediante la liberación de varias proteínas que inician la muerte celular programada (Garrido y Kroemer, 2004). La complejidad de la mitocondria ha sido gradualmente revelada por el estudio y la caracterización de

defectos moleculares involucrados en una variedad de enfermedades genéticas humanas, las cuales han revelado las posibles vías del tráfico de hierro desde y hacia la mitocondria. Entre las enfermedades relacionadas con disfuncionalidad mitocondrial, el estudio de las enfermedades Ataxia de Friedreich (FA) y anemia sideroblástica ligada al cromosoma X (XLSA/A) han entregado resultados relevantes para comprender el metabolismo del hierro mitocondrial y celular. En ambas, se produce la acumulación mitocondrial de hierro especialmente en tejidos con elevado número de mitocondrias, como el tejido nervioso y cardíaco (Puccio y col., 2001; Pandolfo, 2002; Bekri y col., 2000). Un exceso de hierro libre en el ambiente mitocondrial en pacientes con FA y XLSA/A ha sugerido un rol esencial del hierro en la patogénesis de estas enfermedades. El uso de quelantes de hierro y de neutralizadores de radicales libres ha mostrado efectos protectores frente a cardiomiopatías y neuropatías (Wong y col., 1999; Rustin y col., 1999). Esto explicaría la participación del hierro en el daño de moléculas biológicas mitocondriales el que sería originado por una sobrecarga de este metal y/o la alteración de la homeostasis mitocondrial del hierro en células cardíacas y neuronales (Chaston y Richardson, 2003). Es por esto que el hierro jugaría un rol crucial en muchos aspectos del metabolismo de la mitocondria y los efectos de una interrupción de estas vías podrían ser catastróficos. En consecuencia, la mitocondria debería poseer suficientes medidas para el control del tráfico y el metabolismo del hierro. El conocimiento del metabolismo del hierro mitocondrial ha sido confinado mayoritariamente al estudio de los intermediarios en la síntesis de grupos hem en células eritroides y poco se conoce acerca de las vías de tráfico y almacenamiento del hierro en este organelo en otros tipos celulares (Napier y col., 2005). El reciente descubrimiento de proteínas mitocondriales involucradas en el metabolismo del hierro como frataxina (proteína chaperona), mitoferrina1/2 (transportador de entrada de hierro), el transportador ABCB6/7 (transportador de salida de complejos Fe-S) y ferritina mitocondrial (MfFt) ha generado un incipiente interés en las investigaciones en este campo (Napier y col., 2005).

3.4.2.1. Ferritina Mitocondrial (MtFt)

MtFt es una proteína de almacenamiento de hierro perteneciente a la familia de las Fts (Levi y col. 2001). Fue nombrada como ferritina mitocondrial luego de la demostración de que se localiza específicamente en la mitocondria (Levi y col., 2001). Homólogos mitocondriales de la proteína han sido encontrados en primates, ratón, rata, plantas (Zancani y col., 2004) y muy recientemente en *Drosophila* (Missirlis y col., 2006). MtFt humana es codificada por un gen sin intrones localizado en el cromosoma 5q23.1 que codifica un ARNm de ~1kb. Los ARNm de MtFt de humano no poseen la secuencia IRE consenso para el control post-transcripcional dependiente de hierro (Levi y col. 2001). Así, la expresión de MtFt no es regulada por la maquinaria IRE-IRP, la cual controla la homeostasis del hierro celular. La traducción de MtFt genera un precursor de 242 amino ácidos (30 kDa) (Drysdale y col. 2002) que es procesado proteolíticamente en la mitocondria para producir una sub-unidad de 22 kDa que es capaz de formar una molécula multimérica de 24 sub-unidades que une hierro tan eficientemente como cFt (Langlois d'Estaintot y col. 2004).

La expresión de MtFt esta restringida a tejidos con actividad respiratoria elevada, y no a tejidos relacionados con el almacenaje de hierro, como ocurre con cFt. En humanos, los ARNm y proteína de MtFt son detectados principalmente en testículos y cerebro (Levi y col. 2001). Se postula que la principal función asociada a esta proteína es el secuestro de un exceso de hierro, como lo realiza cFt. Esta función al interior de la mitocondria es de principal interés, ya que en estos organelos se realiza la síntesis de grupos hem y complejos hierro-azufre y por lo tanto, están expuestos a un tráfico importante de hierro (Arosio y Levi, 2002; Lill y Kispal, 2000). Es posible que el hierro secuestrado en MtFt no esté disponible para participar en la reacción de Fenton, protegiendo a la mitocondria del daño oxidativo.

Recientes estudios en células HeLa y H1299 transfectadas con cDNA de MtFt muestran que la sobreexpresión de MtFt causa una deficiencia de hierro citosólico,

produciendo un incremento en la actividad de unión de las IRPs a IRE, un aumento en los niveles de TfR y una disminución de cFt. Consecuentemente, la inducción de MtFt resulta en un dramático aumento en la incorporación del hierro celular desde transferrina, el cual es incorporado a MtFt. Además, la inducción de MtFt produce un desplazamiento del hierro presente en cFT a MtFt y una disminución de la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial, la que requiere un complejo hierro-azufre [4Fe-4S] intacto para su función, sugiriendo que la sobre-expresión de MtFt disminuye la disponibilidad de hierro para la síntesis de los clusters hierro-azufre (Corsi y col. 2002, Nie y col. 2006). Estos antecedentes indican que MtFt incorporaría hierro más eficientemente que ferritina citosólica y su sobre-expresión causa un fenotipo similar al observado en células expuestas a condiciones de deficiencia de hierro. A pesar de los antecedentes que postulan a MtFt como una proteína que secuestra hierro de una forma no tóxica y que protegería de la muerte celular, una reciente investigación de Lu y col., 2009 demuestra que la sobre-expresión de MtFt en células HeLa además de causar los efectos anteriormente descritos, produce una disminución dosis dependiente en la viabilidad celular la que se asocia con una disminución en la actividad metabólica mitocondrial, del potencial de membrana mitocondrial y una disminución en GSH. Además, la sobre-expresión de MtFt produce aumento significativo en la producción de ROS y de la apoptosis con un incremento de los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax y una disminución de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. En conclusión, MtFt es capaz de adquirir muy efectivamente hierro desde Tf como también el hierro presente en ferritina citosólica. Pero, la sobre-expresión de MtFt compromete la función de al menos dos proteínas, IRP1 y aconitasa mitocondrial, que requieren hierro para una adecuada función. Aunque el hierro acumulado en MtFt podría no estar disponible para el uso metabólico y la reacción de Fenton, el nuevo hierro adquirido desde el medio extracelular y el hierro liberado luego de la degradación de MtFt podrían ser los responsables del aumento de la sensibilidad a estrés oxidativo y muerte celular en las células que sobre-expresan MtFt.

Una de las limitaciones propias del estudio de tejido post-mortem de pacientes con la enfermedad de Parkinson es que ellos reflejan los estadios tardíos de la enfermedad, en donde ha ocurrido ya una masiva muerte de neuronas dopaminérgicas. Para evaluar el curso temporal y las consecuencias en los cambios de expresión de diferentes proteínas involucradas en el metabolismo de hierro, es que decidimos utilizar el compuesto rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial, en células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y como modelo celular de la enfermedad de Parkinson. Esta tesis estuvo centrada en el posible rol de MfFt y cFT en la homeostasis del hierro en este modelo de la enfermedad.

HIPOTESIS

En células dopaminérgicas humanas, la inhibición del complejo I mitocondrial resulta en una desregulación de la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro que favorece la acumulación de hierro en la mitocondria y la muerte celular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar en células neuronales dopaminérgicas humanas SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de rotenona, como un modelo celular de la enfermedad de Parkinson, los cambios en la expresión de proteínas citosólicas y mitocondriales implicadas en la homeostasis del hierro y de factores que responden al estrés oxidativo

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto de rotenona sobre los niveles de ARNm que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo celular del hierro y estrés oxidativo

Estudiar el efecto de rotenona sobre la expresión de ARNm de cFt, MtFt, DMT1, ferroportina, Nrf2 y mtHsp70 en células SH-SY5Y.

2. Determinar el efecto de rotenona sobre la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo celular del hierro y estrés oxidativo

Estudiar el efecto de rotenona sobre la expresión de las proteínas cFt, MtFt, DMT1, ferroportina, Nrf2 y mtHsp70 en células SH-SY5Y.

3. Determinar el efecto de rotenona sobre la viabilidad de células SH-SY5Y knock-down para MtFt

Estudiar la expresión de factores que responden a estrés oxidativo y el efecto de rotenona sobre la viabilidad celular en células SH-SY5Y knock-down para MtFt.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos Generales

De Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) se obtuvo: N-N'-Methylenediacrylamine (110897); NaOH (106498); CaCl₂ x 2H₂O (160482); MgCl₂ (105833); KCl (104636); KH₂PO₄ (104873); NaCl (106404); Na₂HPO₄ x 2H₂O (106580); HCl (100317); EDTA (1118011); glicerol. De Invitrogen Life Sciences (California, USA), BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (10748-010). De Winkler LTDA (Santiago, Chile), acrilamida (BM-0070); Tris (BM-2000); glicina (BM-0820). De Sigma-Aldrich (USA), Ponceau S (P-3504); Tween 20 (P5627); Triton X-100 (T-6878); inhibidor de proteasas (P8340); DEPC (Dietil pirocarbonato) (D5758). De Calbiochem (EMD Chemicals Inc una empresa de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), medio de montaje FluorSave Reagent (345789). De AppliChem GMBH (USA), Caseína (A3275). De Polysciences Inc (Pennsylvania, USA), paraformaldehido (0380).

De Sigma-Aldrich (USA) se obtuvo Rotenona (R8875, pureza ≥ 95%). Rotenona es el más potente miembro de la familia de rotenoides, compuestos citotóxicos naturales extraídos desde plantas tropicales, los que han sido ampliamente usados como insecticidas y veneno para peces. Rotenona es un compuesto altamente lipofílico y rápidamente tiene acceso a todos los órganos (Talpade y col., 2000). Rotenona es capaz de unirse (en el mismo sitio que MPP+) e inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Greenamyre y col., 2000 reportaron que la administración intravenosa de bajas dosis de rotenona en ratas produce la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas del circuito nigro-estriado acompañada de inclusiones citosólicas similares a LB positivas para α-sinucleína. Este modelo fue el primero en relacionar una toxina presente en el ambiente y la agregación de α-sinucleína, un marcador patológico de la EP, esta relación también ha sido observada en cultivos celulares (Uversky y col., 2001; Sherer y col., 2002; Lee y col., 2002).

1.2. Cultivo Celular

De Gibco-BRL, Life Technologies (Gaithersburg, USA), se obtuvieron: Minimal Essential Medium (MEM), medio de cultivo F-12 Nutrient Mixture, MEM aminoácidos no esenciales suero fetal bovino (FBS), mezcla de antibióticos/antimicóticos, Tripsina-5mM EDTA. De Laboratorios Sanderson (Santiago, Chile) se obtuvo agua de calidad inyectable.

1.3. Material Biológico

La línea celular SH-SY5Y (American Type Culture Collection número CRL-2266, Rockville, MD) es un tercer sub-clon sucesivo de la línea SK-N-SH, la que fue originalmente establecida de un cáncer de médula ósea humano (Encinas y col., 2000). La línea parental SK-N-SH compromete al menos dos fenotipos distintos morfológica y bioquímicamente: uno neuroblástico (tipo N) y otro substrato adherente (tipo S), los cuales pueden experimentar trans-diferenciación. Al ser derivada de un sub-clon neuroblástico, esta línea celular retiene una pequeña proporción de células de tipo S (Encinas y col., 2000). Las células SH-SY5Y pueden ser morfológicamente diferenciadas a células de fenotipo neuronal mediante tratamiento con ácido retinoico. El tratamiento con ácido retinoico inhibe la proliferación celular durante los primeros 8 a 10 días. Las células no tratadas continúan en mitosis y contienen cortos procesos de elongación. Las células diferenciadas exhiben un aumento en la expresión de la proteína asociada a microtúbulos MAP2, un marcador neuronal (Mastroeni y col., 2009). Las células tipo N se diferencian a un fenotipo neuronal creciendo en centros celulares con múltiples y finas proyecciones celulares (neuritas), mientras que las células tipo S no experimentan cambios morfológicos aparentes. Las células diferenciadas exhiben varias características de neuronas colinérgicas y dopaminérgicas, incluyendo la expresión de la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) (Pahlman y col., 1995) y tirosina hidrosilasa (TH), de los transportadores VMAT, D₂R y D₃R y incorporación y liberación de dopamina (DA) (Presgraves y col., 2004; Mastroeni y col., 2008).

1.4. Anticuerpos

Anticuerpo cFt: anticuerpo policlonal de conejo contra cFt humana (reconoce ambas subunidades), Rockland Immunochemicals, Inc (Gilbertsville, USA). Suero policlonal de conejo contra MfFt donado por el Dr. Paolo Arosio (Levi y col., 2001). Anticuerpo policlonal de conejo contra Tom20 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Anticuerpo policlonal de conejo en contra Actina (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo contra DMT1+IRE (Biosonda, Chile). Líquido ascítico contra Ferroportina 1 (Biosonda, Chile). Anticuerpo policlonal contra Nrf2 (Santa Cruz). Anticuerpo policlonal contra Hsp90 y mtHsp70 (donado por la Dra. Anne-Laure Bulteau). Anticuerpo contra IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo contra IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, USA).

1.5. Fluoróforos

De Molecular Probes (Invitrogen Life Sciences, California, USA): Anti IgG de ratón producido en burro conjugado a Alexa-Fluor 488, Anti IgG de cabra producido en burro conjugado a Alexa-Fluor 594. ToPro3 (Molecular Probes)

1.6. Equipos

Microscopio Confocal, Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Göttingen, Alemania); Lector de placas ELISA SUNRISE (Tecan Trading AG, Suiza); Cámaras electroforéticas (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA); Fuente de poder PS 4010-2 (Sigma-Aldrich); Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Alemania); lector de microplacas (Sinergy 2, Biotek); Termociclador 7500 para Real-Time PCR (Applied Biosystems, France).

2. METODOS

2.1. Cultivo Celular

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y son incubadas bajo humedad a 37 °C y 5% CO₂ en medio MEM/F12 suplementado con 10% suero fetal de bovino (FBS), aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, Invitrogen Cell Culture, USA), 10mM, 10 unidades/mL de Penicilina, 10 mg/mL de Estreptomicina, 250 ug/mL de Fungizona y buffer HEPES, 20 mM. La concentración total de hierro en el medio de cultivo es de 7,02 µM determinada por espectrometría de absorción atómica (Aguirre P y col., 2007). El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días.

2.2. Tratamiento de células SH-SY5Y con variadas concentraciones de rotenona como inhibidor del complejo I mitocondrial y evaluación de la viabilidad celular

Luego de 8 días de sembradas, las células SH-SY5Y alcanzan un estado de equilibrio en el número celular y una confluencia cercana al 80%. En este momento, las células fueron tratadas por 4 días con 5 µM de ácido retinoico para luego ser expuestas a diferentes concentraciones de rotenona por 12 y 24 horas. La viabilidad celular fue medida utilizando el compuesto 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT). El ensayo implica la conversión del MTT, soluble en agua, al compuesto insoluble formazan. El formazan luego es solubilizado, y la concentración fue determinada espectofotométricamente a 570 nm.

Células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 por pocillo y tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de rotenona. Luego de los tratamientos, 100 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) fueron agregados a cada pocillo para incubar por 2 horas a 37 °C. Después el formazan fue solubilizado (1 hora) con DMSO y se realizó la medición de la absorbancia. La viabilidad de las células no tratadas (control) fue fijada en 100%, la viabilidad para cada tratamiento fue calculado como

porcentaje del control. Los resultados fueron normalizados por el contenido de proteína total.

2.3. Determinación de ATP

Para la determinación de ATP se utilizó un ensayo comercial de luciferina-luciferaza (Kit de determinación de ATP, A22066, Molecular Probes). Las células SH-SY5Y fueron expuestas a 12 y 24 horas a 3 concentraciones de rotenona. Después de este tiempo, las células fueron lisadas con una solución tampón de liberación de ATP celular (25 mM tris-fosfato (pH 7,8), 2 mM ditioneitol (DTT), 2mM ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tétracético (CDTA), 10% glicerol y triton x-100). El sustrato luciferina y la enzima luciferaza de luciérnaga fueron agregadas a la solución tampón de reacción en presencia de la muestra a determinar. La bioluminiscencia fue determinada en un luminómetro con una emisión máxima de luz de 560 nm. Los niveles de ATP celular fueron convertidos como porcentaje de las células control no tratadas.

2.4. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y.

2.4.1. Reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP)

Células SH-SY5Y crecidas en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning-Costar #3524, USA) fueron expuestas por 12 y 24 horas a condiciones control, de bajo hierro (2 μ M) y 3 μ M de rotenona en el medio de cultivo. Luego de ser lavadas con PBS, las células fueron incubadas por 15 min a 37°C con el ester no fluorescente de Calceína, CalGreen-AM (calceína-acetoximetil ester) (Molecular Probes, C1430, USA), a una concentración final 0,25 μ M 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). Luego de la incubación, las células fueron lavadas con buffer HBSS-Glucosa pH 7,4 e incubadas por 10 min adicionales para permitir la hidrólisis completa de la sonda por las esterasas citosólicas. La cuantificación de la fluorescencia se realizó en un 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 determinó la fluorescencia basal por 3 min a intervalos de 30 segundos entre cada lectura. Luego se agregó 200 μ M de DTPA, quelante hidrofílico e impermeable a la célula, para determinar la fluorescencia extracelular, se estableció la lectura por 3 min. Luego fue agregado 3 mM del quelante permeable BIP (2,2'-bipiridilo). El aumento de fluorescencia se siguió por 5 min, la diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada luego de agregar BIP y la basal obtenida luego de agregar DTPA es proporcional a la magnitud del cLIP (Breuer, 1996).

2.4.2. Reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP)

Células SH-SY5Y crecidas en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning-Costar #3524, USA) fueron expuestas por 12 y 24 horas a condiciones de bajo hierro (2 μ M) y 3 μ M de rotenona en el medio de cultivo. Luego de ser lavadas con PBS, las células fueron incubadas por 20 min a 37°C con rodamina B-[(1,10-fenantrolina-5-il) aminocarbonil] benzil ester (RPA) a una concentración final 0,25 μ M en buffer HBSS -Glucosa pH 7,4. El uso RPA permite determinar la magnitud del reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP) (Petrat y col., 2002; Glickstein y col., 2005). RPA contiene rodamina en su estructura la que le da las características fluorescentes y de destinación mitocondrial. Además, contiene 1,10-fenantrolina la que permite la formación del complejo RPA (3)/ Fe²⁺ (1). El compuesto fue sintetizado en el Laboratorio del Dr. Bruce Cassels, del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, de acuerdo al método de Petrat y cols., 2002.

Luego de la incubación, las células fueron lavadas con buffer HBSS-Glucosa pH 7,4. Además, se realizaron lavados con HBSS-Glucosa 5 mM + BSA 1 mg/mL para remover RPA adsorbido inespecíficamente a la placa. La cuantificación de la fluorescencia se realizó en un lector de microplacas (Sinergy 2, Biotek) con control de temperatura (37°C) con filtros de excitación 530/20 nm y emisión en 590/30 nm. Se determinó la fluorescencia basal por 3 minutos a intervalos de 30 segundos entre cada lectura. Luego se agregó 200 μ M de

DTPA para determinar la fluorescencia extracelular, se estableció la lectura por 3 min. Luego fue agregado 3 mM del quelante permeable BIP. El aumento de fluorescencia se siguió por 5 min, la diferencia entre la fluorescencia máxima alcanzada luego de agregar BIP y la basal obtenida luego de agregar DTPA es proporcional a la magnitud del mLIP (Breuer, 1996).

2.5. PCR en tiempo real (RT-qPCR)

PCR en tiempo real (RT-qPCR), una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma exacta el producto de la amplificación. RT-qPCR es una combinación de tres pasos: i) la conversión de ARN en ADN complementario (ADNc) catalizada por la enzima transcriptasa reversa (RT), ii) la amplificación del cADN mediante PCR y iii) la detección y amplificación de los productos de amplificación en tiempo real.

El ensayo se basa en la medición del aumento de la señal de fluorescencia inicial por sobre una fluorescencia basal, un parámetro conocido como Ct (threshold cycle) o Cp (crossing point). Este aumento de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN producidos durante cada ciclo de PCR. Mientras mayor es la cantidad inicial de la secuencia blanco, menor es el valor Ct. La correlación entre la fluorescencia y la cantidad del producto amplificado permite la cuantificación de las secuencias blancos. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en RT-qPCR pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. El sistema de detección utilizado en este estudio fue el de tipo de agente intercalante. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en RT-qPCR es SYBR Green I. El principal inconveniente es la baja especificidad de este sistema, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de partidores.

Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de reacción son fáciles y además, más barato que el diseño de sondas específicas.

2.5.1. Obtención de ARN total desde células SH-SY5Y

Luego de los tratamientos con rotenona por 12 y 24 horas se realizó la extracción de ARN desde las células SH-SY5Y utilizando TRIzol (Gibco, Invitrogen Cell Culture, USA) según instrucciones del fabricante. Las células fueron lisadas directamente agregando 1 ml de TRIzol a una placa de cultivo de 3.5 cm de diámetro, el lisado celular es homogenizado mediante el uso de una pipeta. El homogenizado fue incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 12.000 x g a 4 °C. Luego, la fase acuosa (superior) fue traspasada a un tubo limpio y el ARN presente en esta fase fue precipitado mediante la adición de 0,5 ml de isopropanol. Las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el sedimentado de ARN fue lavado una vez con etanol al 75 % en H₂O tratada con DEPC y centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. El ARN fue disuelto en H₂O tratada con DEPC y cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm, donde 1 unidad de absorbancia equivale a 40 µg/ml de ARN.

2.5.2. Transcripción reversa (RT)

La síntesis del ADNc se realizó mediante el uso de la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen, 11752), usando como templado 1 µg de ARN total. En un tubo de micro centrifuga libre de nucleasa se agregaron 1 µg de ARN total, 10 µl de 2X RT Reaction Mix, 1.8 µl de RT Enzyme Mix y x µl de agua libre de nucleasa hasta completar un volumen final de 20 µl. El protocolo utilizado para la reacción de transcripción reversa fue el siguiente: i) 25 °C por 10 minutos, ii) 50 °C por 30 minutos, iii) 85 °C por 5 minutos. La mezcla

es enfiada rápidamente a 4 °C para luego agregar 1 µl de RNAsa H de *E. coli*, la mezcla es calentada a 37 °C por 30 minutos.

Se prepararon 2 diluciones de la muestra de cADN (se considera que la concentración de cADN es de 50 ng/µl debido a que la amplificación de RT es lineal). Se obtuvo una concentración de cADN de 5 ng/µl luego de haber agregado 180 µl de buffer TE 0,1X (0,1 mM Tris base, 0,01 mM EDTA) a los 20 µl de la muestra de cADN. Para obtener una concentración de cADN de 0,5 ng/µl se tomaron 20 µl de la muestra de cDNA 5 ng/µl a la cual se le agregó 180 µl de buffer TE 0,1X.

2.5.3. PCR en tiempo real

Para la preparación de SYBR GreenER se mezclaron 150 µl del reactivo ROX (fluoróforo de referencia utilizado para normalizar la señal de fluorescencia) con 12,5 ml de SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen 11762). La reacción se realizó utilizando 1 ng de cADN (2 µl de la solución de 0,5 ng/µl), 10 µl de SYBR GreenER/ROX, 1 µl de la mezcla de partidores Forward y Reverse 10 µM, 7 µl de agua libre de nucleasa. Cada reacción es realizada en triplicado. El protocolo utilizado para la reacción de PCR en tiempo real fue la siguiente 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos. El termociclador utilizado 7500 Real-Time PCR de Applied Biosystems.

Los partidores utilizados en esta tesis fueron los siguientes:

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Ferritina Mitocondrial (MtFt) Fw	CTCTATGCGTCCTACGTGTA
MtFt Rev	TCCTGTTCCGGCTTCTTGATG
Ferritina Citosólica Sub H (FtH) Fw	CCCCCATTTGTGTGACTTCAT
FtH Rev	GCCCGAGGCTTAGCTTTCATT
Ferritina Citosólica Sub L (FtL) Fw	ATTTCGACCGCGATGATGTGG
FtL Rev	GAACCCAGGGCATGAAGATCC
Receptor de Transferrina 1 (TfR1) Fw	TGCTGTGATCGTCTTTTCTTGA
TfR1 Rev	TCATCCCAATATAAGCGACGTG

Receptor de Transferrina 2 (TfR2) Fw	TGGAGACCCCTACACACCTG
TfR2 Rev	GGCCTGATGATGCAACTGGA
Ferroportina 1 Fw	CACAATACGAAGGATTGACCAGT
Ferroportina 1 Rev	ATCCCGAAATAAAGCCACAGC
DMT1-IRE Fw	CCTATTCTGGCCAGTTGTCATCTG
DMT1-IRE Rev	ACGGGTGGCTTCTCTGTCAGCAG
Proteína de Shock térmico 70 (Hsp70) Fw	AGCTGGAATGGCCTTAGTCAT
Hsp70 Rev	CAGGAGTTGGTAGTACCCAAATC
Factor de transcripción NF-E2 (Nrf2) Fw	CTTTGGCGCAGACATTCCC
Nrf2 Rev	GACTGGGCTCTCGATGTGAC
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Fw	GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG
GAPDH Rev	GAGCCCCAGCCTTCTCCATG

2.6. Aislamiento de mitocondrias

Para la determinación de la proteína de MfFt a través de Western Blot, fue necesario realizar el aislamiento de mitocondrias debido a que el anticuerpo donado por el Dr. Arosio fue capaz de reconocer con menor especificidad cFth. Las mitocondrias pueden ser fácilmente aisladas desde células de mamíferos por un simple método de homogenización, que incluye una centrifugación a baja velocidad (600 x g) para la eliminación de núcleo, membranas y células no dañadas, seguido por una centrifugación a mayor velocidad (11.000 x g) para la separación de la fracción citosólica y mitocondrial. El sedimentado final representa una fracción cruda de mitocondrias.

Las células SH-SY5Y fueron crecidas hasta un 80-90% de confluencia (15 x 10⁶ células), diferenciadas por 4 días con ácido retinoico y expuestas por 12 y 24 horas a concentraciones de rotenona en el medio de cultivo de 250 nM, 1 µM y 3 µM. 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, el sobrenadante fue descartado. El sedimentado de células fue resuspendido en 10 volúmenes (1,5 ml) de Buffer de Extracción 1X (HEPES 10 mM / pH 7,5; manitol 200 mM, Sacarosa 70 mM y EGTA 1 mM más un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, pepstatina

A 0,7 µg/ml) (100:1[v/v])) e incubado por 15 minutos en hielo. Las células fueron homogenizadas con 30 golpes utilizando un homogenizador Dounce (Sigma, P7734). El homogenizado fue centrifugado a 600 x g por 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, el líquido sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y centrifugado a 11.000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimentado es considerado como la fracción mitocondrial y el sobrenadante acuoso, como la fracción citosólica. El sedimentado mitocondrial es resuspendido en un buffer de almacenamiento 1X (HEPES 10mM / pH 7,5, Sacarosa 250 mM, ATP 1 mM, ADP 80 mM, Succinato de Sodio 5 mM, K₂HPO₄ 2 mM y DTT 1mM) y almacenado junto a la fracción citosólica a -20°C, para posteriores ensayos.

2.7. Western Blots del extracto celular y la fracción mitocondrial

Para preparar los extractos celulares, las células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con rotenona se disgregaron 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. El sobrenadante fue removido y las células o la fracción mitocondrial son resuspendidos en buffer de lisis (50 µl/1x10⁶ células) conformado por una solución tampón de lisis (NP-40 0,5%, HEPES10 mM / pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, PMSF 1 mM, Glicerol 5%, DTT 1 mM) más un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, pepstatina A 0,7 µg/ml) (100:1[v/v]), e incubadas por 15 minutos en hielo. El homogenizado fue centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, para quedarse con el sobrenadante. Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (Protein Methods).

Para la separación electroforética, se cargaron 20 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12,5 % y 16% (para la determinación de las subunidades cFtH y cFtL de cFt) en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1,5 hora a 300 mA y 4 °C. Luego de la electrotransferencia, la membrana fue teñida con Ponceau-S para ver si el

proceso de transferencia fue exitoso, luego la membrana fue lavada 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 durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave con leche descremada 5% en solución TBS-T20. La incubación con el anticuerpo primario contra las proteínas se realizó durante toda la noche a 4 °C y agitación suave. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-Teen20 para eliminar el anticuerpo primario unido inespecíficamente a la membrana. A continuación se incubó durante 1 hora con agitación suave a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón o anti IgG de conejo conjugado con peroxidada de rábano en leche descremada 0,5% en solución TBS-T20. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T20, para luego revelar usando el kit quimioluminiscente y autoradiografía (Pierce, 34080). La señal quimioluminiscente se detectó mediante placas fotográficas (Fuji).

2.8. Transfección estable de células SH-SY5Y mediante lipofectamina

En base a los antecedentes que plantean que la principal función de Mtf1 es regular los niveles de hierro mitocondriales y de ROS es que decidimos estudiar el efecto que tendría el knock-down de esta proteína en la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas a rotenona.

Para la transfección de células SH-SY5Y se utilizó el plasmido pDNA 6.2-GW/EmGFP-miR (BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits Invitrogen) (Figura 3) en el cual fue incorporado un microRNA dirigido contra Mtf1. Este plasmidio contiene las siguientes características:

1. Promotor de citomegalovirus (CMV) humano, este promotor es reconocido por la enzima ARN polimerasa tipo II (polimerasa responsable de la expresión de ARNm), lo cual permite una elevada expresión de microARNs y genes reporteros co-cistrónicos. Este promotor es activo en muchos tipos celulares de mamíferos.
2. Regiones 5' y 3' que permiten la introducción de microARNs en el plasmidio.

3. Gen de resistencia a espectinomicina que permite la selección en *E. coli*.
4. Origen de replicación pUC para la expresión en alto numero de copias en *E. coli*.
5. Gen de resistencia a blastidicina que permite la selección en células de mamíferos y la generación de líneas estables expresando el microARN.
6. Expresión co-cistronica del microARN y de la proteína bioluminiscente EmGFP (Emerald GFP) lo que permite la selección visual de las células que expresan el microRNA.

Los microARNs o miARN son secuencias de simple hebra de ARN de aproximadamente de 22 pares de bases que se expresan endógenamente y que naturalmente producen el silenciamiento de genes a través de la enzima denominada Dicer (miembro de la familia de ARNasas tipo III, endonucleasas específicas para ARN doble hebra) (Bartel, 2004). Los microARNs se encuentran presentes, algunas veces en clusters, en un largo transcrito primario (pre-microARN) de varias kilobases que contiene una estructura tipo horquilla y que es transcrito por la ARN polimerasa tipo II (Lee y col., 2004). Los pre-microARNs son exportados desde el núcleo hasta el citoplasma. Luego de la exportacion, el pre-microARN es procesado por Dicer en una secuencia madura de aproximadamente 22 pares de bases (microARN maduro) para luego ser incorporado en el complejo miRISC necesario para el silenciamiento génico (Zeng y col., 2005; Bohnsack y col., 2004; Yi y col., 2003; Cullen, 2004).

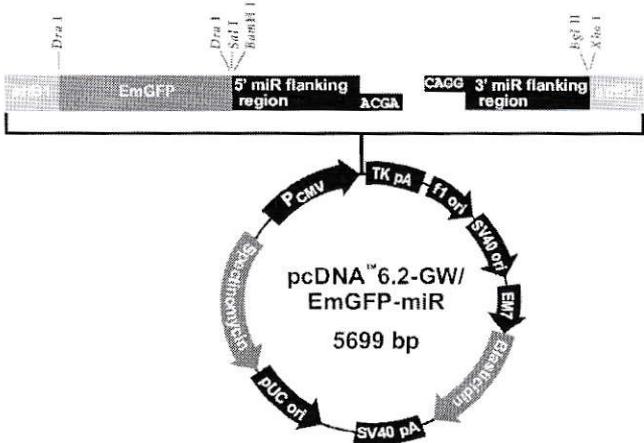


Figura 4. Plasmido pDNA 6.2-GW/EmGFP-miR. La figura muestra el plasmidio pDNA 6.2-GW/EmGFP-miR. El vector es proporcionado linealizado entre los nucleótidos con 4 pares de bases no apareados en el 5' de cada hebra. P_{CMV}, promotor de citomegalovirus humano. Spectinomycin, gen de resistencia al antibiótico espectinomicina. pUC ori, origen de replicación pUC. Blastidin, gen de resistencia a blastidicina. EmGFP, proteína Emerald (Em) fluorescente verde (GFP).

Se diseñaron y probaron 3 secuencias diferentes de microARN contra MtfFt: (i) un microARN no específico para MtfFt, denominado 1a, (ii) un microARN específico para MtfFt que produjo una reducción de los niveles de ARNm de MtfFt cercana al 20%, denominado como 2a y (iii) un microARN específico para MtfFt que produjo una reducción de los niveles de ARNm de MtfFt cercana al 62%, denominado como 3c. La secuencia 3c se muestra a continuación:

5'- TGCTGTCAGGTAGTAGGTTTCCAGGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCCTGGAACTACTACCTGA -3'

La secuencia color violeta y roja representan la secuencia de unión con el plasmido pDNA 6.2-GW/EmGFP-miR, la secuencia color verde contiene la secuencia de 21 nucleótidos que forman el miRNA contra MtfFt y la secuencia color negro es una secuencia de 19 nucleótidos que forman un loop terminal.

El plasmidio pDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA MtfFt fue transformado en células competentes *E. coli* One Shot TOP10. Las bacterias fueron crecidas en presencia de espectinomicina para posteriormente realizar el aislamiento del ADN plasmidial a través de maxiprep (Qiagen, USA). El plasmidio fue analizado mediante secuenciación. El día anterior a la transfección, las células fueron sembradas a un 90% de confluencia en medio MEM/F12 sin antibióticos. Para la transfección, se mezclaron 10 µL de lipofectamina 2000 (Gibco) con 200 µL de medio Optimem I reducido en suero (Invitrogen N° 31985-062) (Solución A). En otro tubo se mezclaron 2,5 µg de DNA (plasmido pDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA MtfFt) con 200 µL de medio Optimem I (Solución B). Ambas mezclas se incubaron durante 10 min. Transcurrido este tiempo se mezclaron ambas soluciones (A + B), la nueva solución (Solución C) se incubó durante 30 min, para luego agregar 1 mL de medio Optimem I. Las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 6 horas con la solución C a 37°C, 5% CO₂. El medio fue reemplazado por MEM/F12 10% FBS sin antibióticos. Luego de dos días, las células fueron expuestas a 5 µg/ml del antibiótico blastidina para generar líneas SH-SY5Y que expresen establemente el microARN para MtfFt.

RESULTADOS

1. Viabilidad Celular en células SH-SY5Y

1.1. Antecedentes

Ratas expuestas a rotenona reproducen muchos de los aspectos centrales de la EP (Betarbet y col., 2000; Sherer y col., 2003). Para analizar los mecanismos de toxicidad a rotenona y evaluar la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTT utilizamos un método *in vitro*, expusimos células SH-SY5Y a concentraciones crecientes de rotenona por 24 horas.

1.2. Rotenona disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente

Se observó una disminución significativa de la viabilidad de manera dosis dependiente luego de 24 horas de exposición a concentraciones superiores de rotenona 250 nM; dosis menores de rotenona (60 nM y 125nM) no causaron una reducción significativa de la viabilidad en este periodo de tiempo. Los tratamientos utilizados en los siguientes experimentos fueron de rotenona 250 nM, 1 μ M y 3 μ M, los cuales produjeron una disminución aproximada de la viabilidad del 20% (** $p < 0,01$), 33% (** $p < 0,01$) y 45% (** $p < 0,01$), respectivamente (Figura 5).

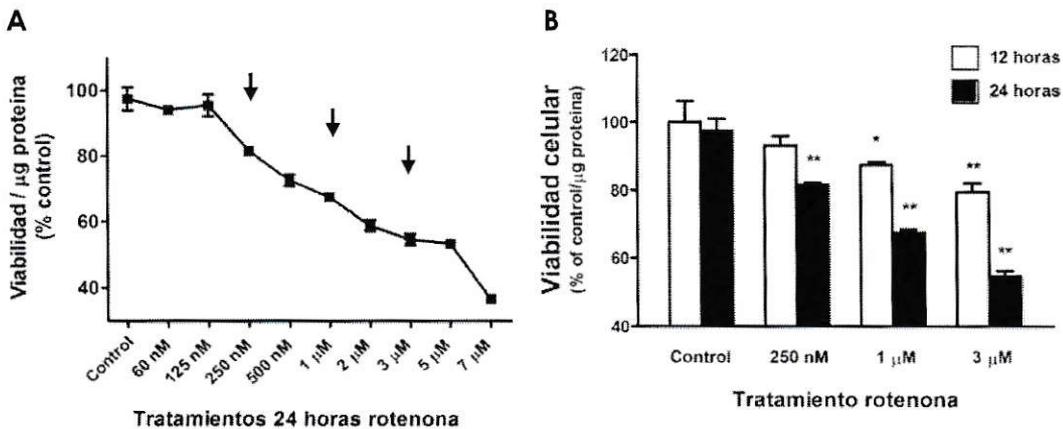


Figura 5. Viabilidad celular en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona. A) Células SH-SY5Y fueron expuestas por 24 horas a concentraciones crecientes de rotenona. Luego, la viabilidad celular fue determinada utilizando el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con rotenona con respecto a las células control (100% de la viabilidad celular) y normalizados por la concentración de proteína. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones. Los tratamientos utilizados en los siguientes experimentos fueron de rotenona 250 nM, 1 μ M y 3 μ M. B) Viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 12 y 24 horas a concentraciones de rotenona 250 nM, 1 μ M y 3 μ M.

2. Niveles de ATP celular en células SH-SY5Y

2.1. Antecedentes

Una inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial luego de la exposición a rotenona, puede tener varias consecuencias celulares, incluyendo la disminución en la síntesis de ATP. Es por esto que determinamos el contenido de ATP en células SH-SY5Y luego de exponerlas por 12 y 24 horas a rotenona.

2.2. Rotenona provoca una disminución del ATP celular

Células expuestas por 12 horas a rotenona 1 μ M disminuyen su contenido de ATP celular cercano al 9% ($90,9 \pm 4,1$ respecto a control). Una disminución cercana al 24% ($75,9 \pm 4,3$ respecto a control) se observó en células tratadas con rotenona 3 μ M. No se observó una reducción significativa del ATP celular en células expuestas a rotenona 250 nM en este periodo de tiempo. Luego de 24 horas de exposición a rotenona se observó una disminución de 13% en los niveles de ATP celular ($87,1 \pm 3,2$ respecto a control) en células expuestas a rotenona 250 nM, de un 28% ($72 \pm 8,1$ respecto a control) para rotenona 1 μ M y de un 44% ($56,2 \pm 5,6$ respecto a control) para rotenona 3 μ M (Figura 6).

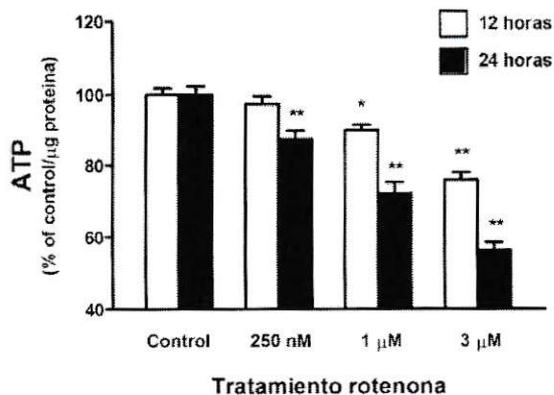


Figura 6. Determinación de los niveles de ATP en células expuestas a rotenona. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM. Luego de obtener los homogenizados celulares, los niveles de ATP fueron determinados utilizando el ensayo de bioluminiscencia de luciferaza (luciferaza de luciérnaga). Los valores de ATP son expresados como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con rotenona con respecto a las células control (100% de la viabilidad celular) y normalizados por la concentración de proteína. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones. * p < 0,05, ** p < 0,01.

3. Expresión de ferritina citosólica (Ft)

3.1. Antecedentes

Ferritina es considerada la principal proteína de almacenaje de hierro en mamíferos y la primera línea de defensa en contra el aumento de estrés oxidativo y la sobrecarga de hierro. Se ha reportado que ferritina citosólica enriquecidas en la subunidad cFtH están asociadas a condiciones de respuestas a estrés. Debido a su actividad ferroxidasa, cFtH es considerada como la principal subunidad reguladora de la función de ferritina, mientras que la subunidad cFtL esta relacionada con la nucleación y mineralización del hierro. Ferritinas enriquecidas en cFtL son asociadas al almacenamiento de hierro. Varios estudios muestran que ferritinas enriquecidas en cFtH están presentes en neuronas, mientras que la expresión de cFtL es menor. Es por esto que decidimos estudiar los niveles de ARNm y proteína de ambas subunidades, cFtH y cFtL en células expuestas a rotenona.

3.2. Rotenona produce el aumento en la síntesis de cFt

3.2.1. ARNm de cFt

En células expuestas por 12 horas y 24 horas a rotenona, no se observó un aumento dosis dependiente en los niveles de ARNm de la subunidad cFtH (Figura 7). Se produjo un aumento cercano a 1,6 veces en el ARNm de cFtH en células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM ($1,17 \pm 0,11$), $1 \mu\text{M}$ ($1,13 \pm 0,07$) y $3 \mu\text{M}$ ($1,19 \pm 0,01$) en comparación con los niveles de células control ($0,74 \pm 0,11$). Además, se produjo un aumento en los niveles de ARNm de cFtH cercano a 1,9 veces en células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM ($1,18 \pm 0,08$), $1 \mu\text{M}$ ($1,20 \pm 0,07$) y $3 \mu\text{M}$ ($1,24 \pm 0,06$) en comparación con los niveles de células control ($0,63 \pm 0,05$).

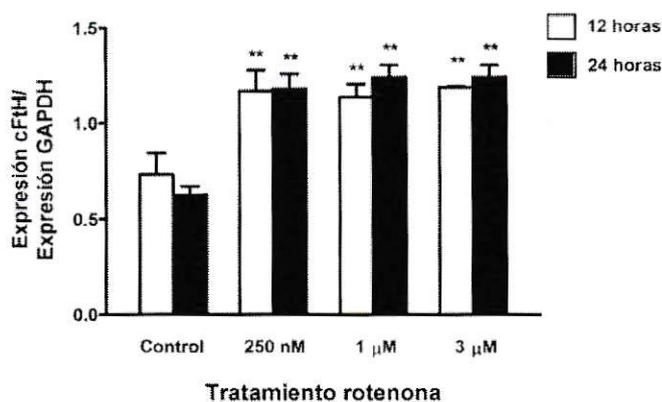


Figura 7. RT-qPCR de la subunidad pesada de ferritina citosólica (cFtH). Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, $1 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$. Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNc, se realizó RT-qPCR contra cFtH. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, ** p < 0,01.

En células expuestas por 12 horas y 24 horas a rotenona, no se observó un aumento dosis dependiente en los niveles de ARNm de la subunidad cFtL (Figura 8). El aumento en los niveles de ARNm de cFtL fue mayor que el observado para cFtH. En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en el ARNm de cFtL cercano al doble ($1,14 \pm 0,05$) en comparación con los niveles de células control de ($0,57 \pm 0,02$). Un

aumento cercano a 2,4 y 2,2 veces se observó en células expuestas a rotenona 1 μM ($1,37 \pm 0,03$) y 3 μM ($1,24 \pm 0,05$), respectivamente. En células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en el ARNm de cFtL cercano a 2,9 veces ($1,50 \pm 0,03$) en comparación con los niveles de células control ($0,51 \pm 0,01$). Un aumento de 3,2 veces fue observado en células expuestas a rotenona 1 μM ($1,63 \pm 0,04$) y 3 μM ($1,64 \pm 0,08$).

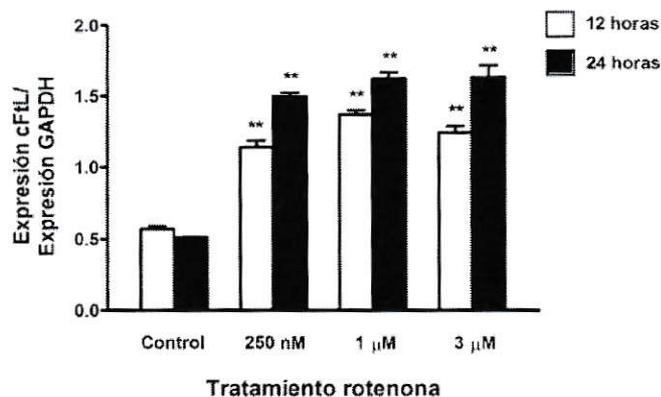


Figura 8. RT-qPCR de la subunidad liviana de ferritina citosólica (cFtL). Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM . Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNC, se realizó RT-qPCR contra cFtL. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, ** p < 0,01.

3.2.2. Proteína de cFt

Debido a que observamos aumentos significativos en los niveles de ARNm para ambos subunidades es que decidimos estudiar los niveles de proteína de cFt en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona.

El aumento en los niveles de proteína de cFtH a las 12 horas de tratamiento fue dependiente de la concentración de rotenona (Figura 9A). En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en los niveles de proteína cercano 3,5 veces en comparación con los niveles de células control. Un aumento cercano a 4,8 y 5,8 veces es observado en células expuestas a rotenona 1 μM y 3 μM , respectivamente. En

células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM μM se produjo un aumento de 3 veces en los niveles de proteína de cFtH. No se observó un aumento significativo a rotenona 1 μM (Figura 9B).

El aumento en los niveles de proteína de cFtL fueron menores que los observados para cFtH. En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en los niveles de proteína de cFtL cercano 1,9 veces. Un aumento cercano a 2,6 y 2,2 veces fue observado en células expuestas a rotenona 1 μM y 3 μM , respectivamente. En células expuestas por 24 horas a rotenona 1 μM y 3 μM no se observaron cambios significativos. Sólo a rotenona 250 nM se produjo un aumento cercano 1,6 veces en los niveles de proteína (Figura 9C).

Estos resultados indican que rotenona provoca el aumento de la expresión de ambas subunidades de cFt es posible que este aumento sea mediado por estrés oxidativo. Sin embargo, luego de 24 horas de exposición a rotenona los niveles de proteína de ferritina citosólica fueron menores a los observados a las 12 horas, los menores niveles de proteína observados a las 24 horas de exposición a rotenona pueden ser explicados por un aumento en la unión de IRPs a IREs de cFt. Este aumento en la unión se debería al desensamblaje del complejo hierro-azufre producto de un aumento de los niveles de ROS.

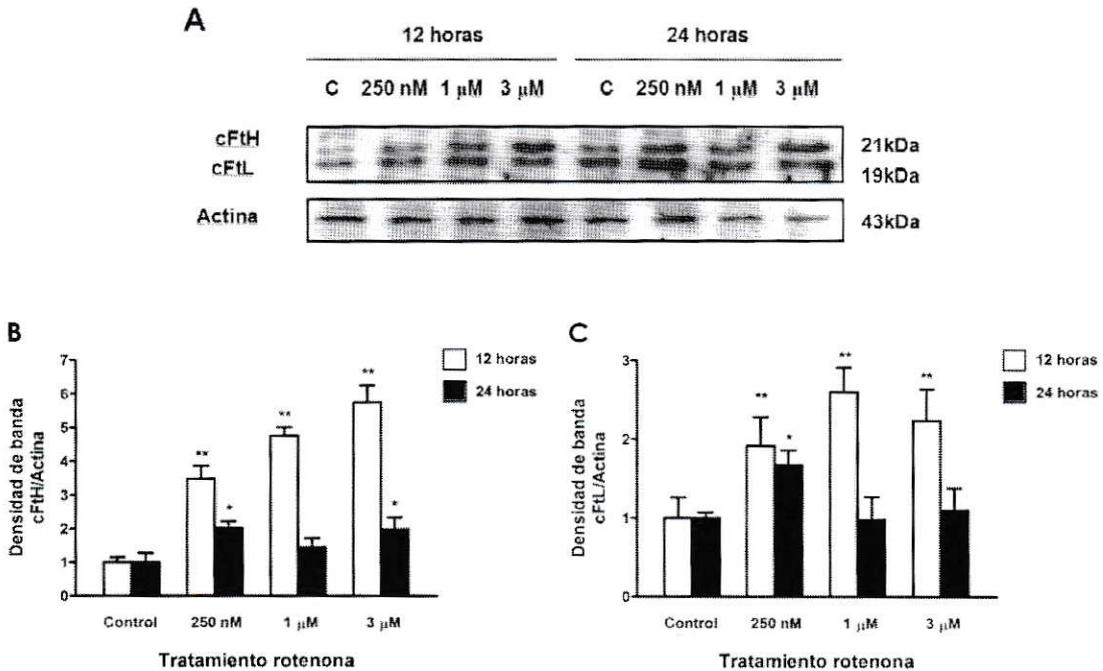


Figura 9. Expresión de las subunidades de ferritina citosólica en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot contra cFt y actina de homogenizados de SH-SY5Y control y expuestas a rotenona. El anticuerpo reconoció ambas subunidades, para poder determinarlas se realizaron geles al 20% de acrilamida. 20 μ g de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión de cFtH, banda de 21 kDa. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** $p < 0,01$. (C) Cuantificación de los cambios de expresión de cFtL, banda de 19 kDa. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína actina. (D) Imagen representativa de la distribución de cFt en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a rotenona 1 μ M. La distribución observada es citosólica.

4. Expresión de Ferritina Mitocondrial (MfFt)

4.1. Antecedentes

En la matriz mitocondrial se lleva a cabo la síntesis de complejos hierro-azufre y grupos Hem que posteriormente son incorporados en la estructura de proteínas citosólicas, mitocondriales y nucleares que requieren de hierro para su funcionalidad. Dada la importancia de este metal, una deficiencia o un exceso del aporte del metal en la mitocondria podrían causar una disfunción mitocondrial y/o celular. Es por esto que existirían mecanismos en la regulación del flujo y el manejo del hierro desde y hacia la mitocondria (Napier y col., 2005). MfFt es una proteína mitocondrial de la cual se

desconocen los mecanismos de regulación transcripcional y/o post-transcripcional y debido a su capacidad de almacenar hierro en la mitocondria, su regulación y función son esenciales para comprender el metabolismo celular y mitocondrial de este metal.

4.1.2. Hierro produce un aumento en la síntesis de MfFt

En la memoria titulada "Análisis de la expresión de ferritina mitocondrial y ferritina citosólica en un modelo progresivo de acumulación de hierro en células neuronales" (Armijo, 2009) reportamos que en células neuronales SH-SY5Y MfFt responde a cambios en el contenido extracelular de hierro. Se observó un aumento en los niveles de MfFt en condiciones de deficiencia de hierro lo que podría indicar que el hierro entrante a la célula es destinado a la mitocondria, permitiendo una adecuada síntesis de complejos hierro-azufre y grupos Hem. El aumento en los niveles de MfFt observado en condiciones de sobrecarga de hierro podría proteger a la mitocondria del daño oxidativo contrarrestando el exceso de este metal (Figura 10). La regulación de la expresión de MfFt posiblemente se realice a nivel transcripcional, mediada por dos tipos de señales. Una señal mediada por bajos niveles de hierro, que induciría la expresión de MfFt, asegurando un suministro adecuado del hierro hacia este organelo. En esta señal podrían participar detectores de los niveles de hierro reactivo mitocondrial, de la síntesis de los complejos hierro-azufre y/o de la síntesis de grupos hem. Otra señal podría estar dada en condiciones de sobrecarga de hierro en la que podrían participar detectores de estrés oxidativo. Esta señal induciría el aumento de los niveles de MfFt, protegiendo a la mitocondria del daño oxidativo causado por un exceso de hierro.

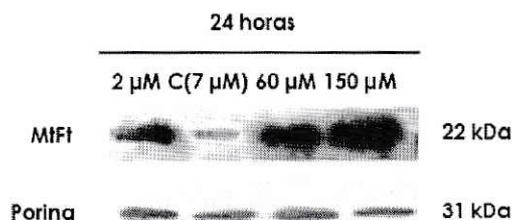


Figura 10. El hierro induce la expresión de la proteína MfFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga con este metal. Western Blot representativo de los cambios en la inmunoreactividad para MfFt presente en las fracciones mitocondriales de células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a concentraciones de hierro extracelular de 2 μM (deficiencia), 7 μM (C, control) y condiciones de sobrecarga de 60 μM y 150 μM . Como control de carga de la fracción mitocondrial se utilizó la proteína porina presente en la membrana externa mitocondrial.

Debido a que ferritina tiene un rol central en la mantención y en el tamaño del LIP, y debido a que MfFt aumenta en condiciones de deficiencia de hierro, un resultado no descrito anteriormente en otros trabajos y diferente al observado para cFt (donde los niveles de cFt disminuyen), es que decidimos determinar los niveles de cLIP y mLIP en condiciones de deficiencia de hierro mediante el uso de las sondas fluorescentes. Esto nos permitiría establecer una posible relación entre los niveles de MfFt y los niveles de mLIP, necesarios para una adecuada síntesis de complejos hierro-azufre y grupos Hem.

4.1.3. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células SH-SY5Y expuestas a condiciones de deficiencia de hierro

Los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial fueron determinados mediante el uso de las sondas fluorescentes calceína y RPA, respectivamente. El uso de bajas concentraciones de calceína ha mostrado una distribución citosólica (Breuer y col., 1996), mientras que la localización de RPA es exclusivamente mitocondrial (Petrat y col., 2002). Se observaron células cargadas con calceína y RPA en el microscopio confocal (Figura 11). Calceína se distribuyó citosólicamente, mientras que la marca de RPA se distribuyó perinuclear similar a lo observado en una distribución mitocondrial. Luego, mediante el uso de estas sondas se procedió a estimar la magnitud del LIP en estos dos compartimentos celulares a través de un lector de microplacas.

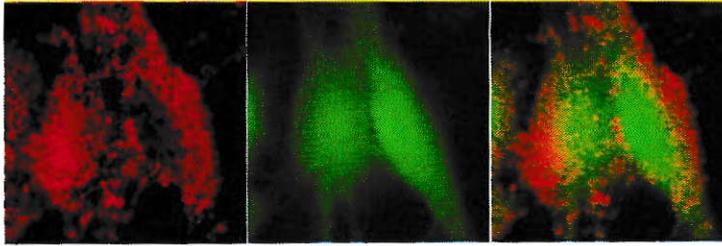


Figura 11. Distribución de las sondas RPA y calceína en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron doblemente marcadas con RPA 0,25 μM y CalGreen-AM 0,25 μM en HBSS-Glucosa 5 mM pH 7,4. Después de lavar las células, estas fueron observadas en microscopio confocal. Se aprecia una distribución mitocondrial de RPA (rojo) (excitación/emisión 530/590 nm) y citosólica de calceína (verde) (excitación/emisión 480/530 nm).

Se determinó la magnitud del cLIP en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a concentraciones de hierro 7 μM (situación control) y 2 μM (situación de deficiencia del metal) en el medio de cultivo. Las células fueron cargadas con la sonda calceína para luego determinar la fluorescencia en un lector de microplacas. La fluorescencia basal se determinó después de agregar el quelante extracelular DTPA. Posteriormente, al agregar el quelante intracelular BIP se produjo la recuperación de la fluorescencia. La magnitud de la fluorescencia recuperada (Δ fluorescencia) es proporcional al cLIP (Figura 12A). Observamos diferencias de las magnitudes de cLIP en función de la concentración del hierro presente en el medio extracelular. El cLIP de células expuestas a condiciones de deficiencia de hierro fue menor que el determinado para la situación control. Esto se relaciona con resultados previamente obtenidos que muestran que frente a ofertas crecientes de hierro ocurre un aumento en la magnitud del cLIP (Aguirre y col., 2005)

Bajo las mismas concentraciones de hierro en el medio de cultivo, se determinó la magnitud del mLIP en células SH-SY5Y. Las células fueron cargadas con la sonda RPA, la fluorescencia inicial fue determinada luego de agregar el quelante extracelular DTPA. Luego de agregar el quelante intracelular BIP, se produjo la recuperación de la fluorescencia, siendo la magnitud de la fluorescencia recuperada es proporcional al mLIP (Δ fluorescencia) (Figura 12B). En condiciones de deficiencia de hierro (2 μM) determinamos que la magnitud del mLIP es mayor que el de la situación control (7 μM).

Este resultado es relevante, ya que ningún otro trabajo ha demostrado que en condiciones de deficiencia de hierro los niveles de mLIP se ven modificados. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo encargado de destinar y mantener niveles adecuados de hierro en este organelo. Esto podría tener como propósito asegurar que bajo condiciones de deficiencia de hierro el suministro de hierro entrante sea destinado hacia la mitocondria, permitiendo la adecuada síntesis de complejos hierro-azufre y grupos Hem.

Debido a que MtFt tendría un rol importante en la mantención de los niveles de mLIP es que decidimos observar los niveles de MtFt y de mLIP en células SH-SY5Y expuestas a rotenona (Sección 4 y 5).

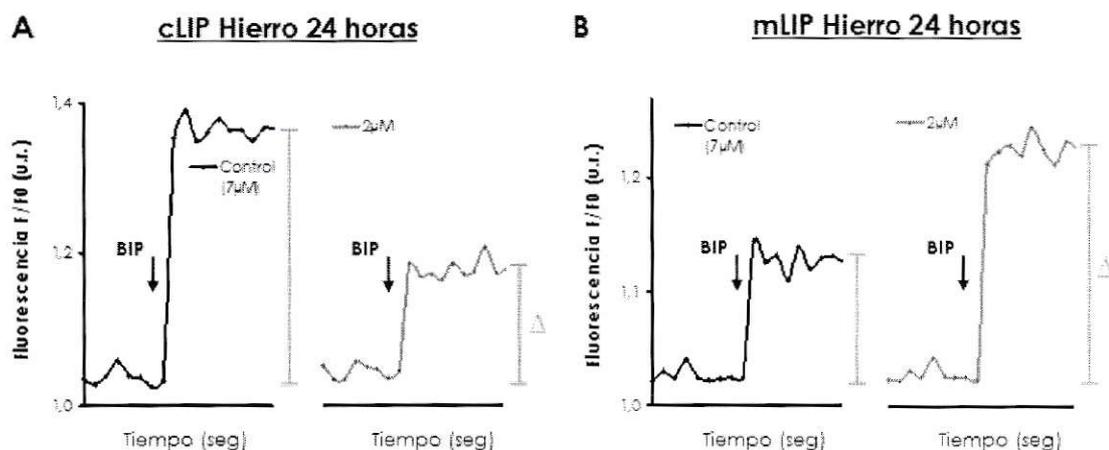


Figura 12. Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP) y mitocondrial (mLIP) en SH-SY5Y expuestas a hierro 2 μ M y 7 μ M por 24 horas. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 24 horas a hierro 2 μ M y 7 μ M para posteriormente determinar los niveles de cLIP (A) mediante el uso de calceína y los niveles de mLIP (B) mediante el uso de RPA. La magnitud de los LIPs fue determinado por el incremento de la fluorescencia luego de agregar el quelante BIP, fluorescencia (barras color verde). La fluorescencia obtenida de cada lectura luego de agregar BIP (F) fue normalizada por la fluorescencia basal (F0) obtenida luego de agregar DTPA y por los niveles de proteína. (u.r.) unidades relativas. Curvas representativas de doce experimentos independientes.

4.2. Rotenona produce un aumento en la síntesis de ferritina mitocondrial

4.2.1. ARNm de MfFt

En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en el ARNm de MfFt cercano a 1,8 veces ($0,86 \pm 0,06$) comparado con los niveles de células control ($0,49 \pm 0,06$). Células expuestas a rotenona 1 μM aumentaron 4,4 veces los niveles a ARNm ($2,15 \pm 0,04$) y un aumento de 3,2 fue observado en células expuestas a rotenona 3 μM ($1,56 \pm 0,02$). En células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en los niveles de ARNm de 1,5 veces ($0,82 \pm 0,02$) en comparación con los niveles de células control ($0,53 \pm 0,01$). En células expuestas a rotenona 1 μM se produjo un aumento de 3 veces ($1,65 \pm 0,04$) y a rotenona 3 μM se produjo un aumento de 1,8 veces ($0,96 \pm 0,16$) (Figura 13).

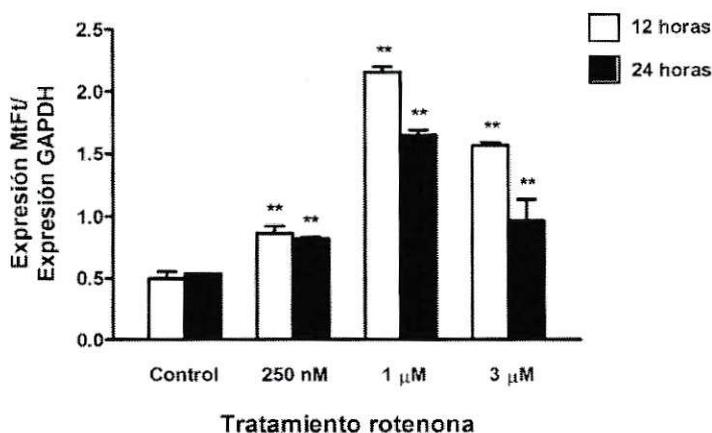


Figura 13. RT-qPCR de ferritina mitocondrial (MfFt). Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM . Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNc, se realizó RT-qPCR contra MfFt. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.2. Proteína de MfFt

Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 y 24 horas a rotenona. Después de este tiempo fue necesario realizar la extracción de mitocondrias para determinar el contenido de MfFt debido a que el anticuerpo donado por el Dr. Paolo Arosio también reconoció, con menor intensidad, cFtH. La pureza de la fracción mitocondrial cercana a 95% fue determinada por Western Blot mediante el uso de los anticuerpos porina y actina (no mostrado). Al utilizar el suero de conejo en contra de MfFt fue posible observar 2 bandas: una cercana a 22kDa y otra de 30kDa. La banda de 22 kDa corresponde al péptido de MfFt y la banda cercana a 30kDa correspondería al pre-péptido de MfFt (Levi y col., 2001). La proteína mitocondrial Tom20 fue utilizada como control de carga. Tom20 es una translocasa presente en la membrana externa mitocondrial.

En células expuestas por 12 horas a rotenona no se observaron cambios significativos en los niveles del péptido para MfFt (Figura 13A y 13B). Sin embargo, en este periodo de tiempo se produjo un aumento significativo en los niveles de pre-péptido de MfFt para los tratamientos con rotenona 1 μM y 3 μM de 1,7 veces. En células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en los niveles de proteína del péptido de MfFt cercano a 2,3 veces. En células expuestas a rotenona 1 μM se produjo un aumento de 4,4 veces y a rotenona 3 μM un aumento cercano a 8 veces. Se observó un aumento en los niveles de proteína del pre-péptido de MfFt de 2,3 veces y de 3 veces para rotenona 1 μM y 3 μM (Figura 13B).

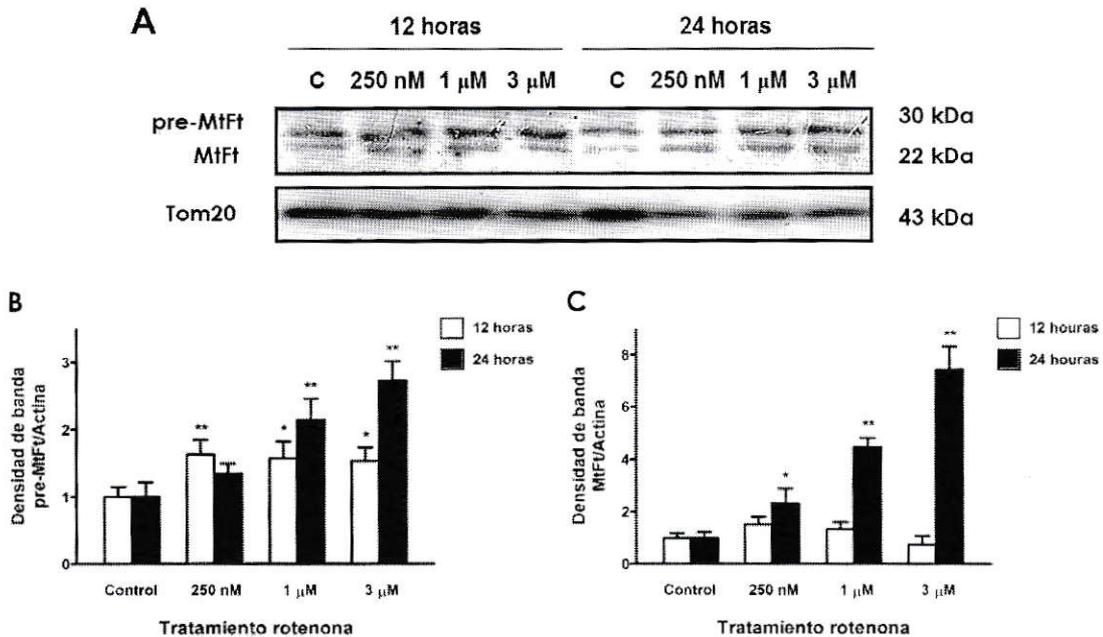


Figura 14. Expresión de ferritina mitocondrial (MtFt) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot contra ferritina mitocondrial y Tom20 de homogenizados de mitocondrias de SH-SY5Y control y expuestas por 12 horas y 24 horas a rotenona. El anticuerpo reconoció 2 bandas, una cercana a 30kDa que correspondería al pre-péptido de MtFt y otra banda cercana a 22 kDa que correspondería al péptido de MtFt. 20 μ g de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión del péptido de MtFt (barras grises) y del pre-péptido de MtFt (barras blancas). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de Tom20. (C) Imagen representativa de la distribución de MtFt en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a rotenona 1 μ M, la distribución observada es mitocondrial.

5. Determinación de los reservorios de hierro lábil citosólico y mitocondrial en células expuestas a rotenona

Se determinó la magnitud del cLIP en células SH-SY5Y expuestas por 12 horas y 24 horas a rotenona 3 μ M en comparación con la situación control. Las células fueron cargadas con la sonda calceína. La fluorescencia basal se determinó luego de agregar el quelante extracelular DTPA. Posteriormente, luego de agregar el quelante intracelular BIP, se produjo la recuperación de la fluorescencia, la magnitud de la fluorescencia recuperada es proporcional al cLIP (fluorescencia). Observamos un aumento en las magnitudes de cLIP en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona 3 μ M en comparación con células control (Figura 15). La magnitud del cLIP fue mayor a las 24

horas de exposición a rotenona $3\mu\text{M}$. Sobre la base de este resultado y los menores niveles de cFt observados a las 24 horas de exposición a rotenona, se puede postular que se produciría un aumento en la sensibilidad celular al estrés oxidativo debido al aumento en el cLIP.

Bajo las mismas condiciones, se determinó la magnitud del mLIP. Las células fueron cargadas con la sonda RPA. La fluorescencia basal es determinada luego de agregar el quelante extracelular DTPA. Luego de agregar el quelante intracelular BIP, se produjo la recuperación de la fluorescencia, la magnitud de la fluorescencia recuperada es proporcional al mLIP (Δ fluorescencia). Observamos un aumento en las magnitudes de mLIP en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona $3\mu\text{M}$ en comparación con la situación control (Figura 16). La magnitud del mLIP fue mayor a las 24 horas de exposición a rotenona $3\mu\text{M}$.

En células expuestas a rotenona $3\mu\text{M}$ observamos un aumento de los niveles de cLIP y mLIP, estos aumentos probablemente sean debido a la desregulación de los mecanismos encargados de mantener los niveles de LIP constantes. El aumento de LIP en ambos compartimentos estaría implicado en un aumento de los niveles de ROS y posiblemente en la muerte celular.

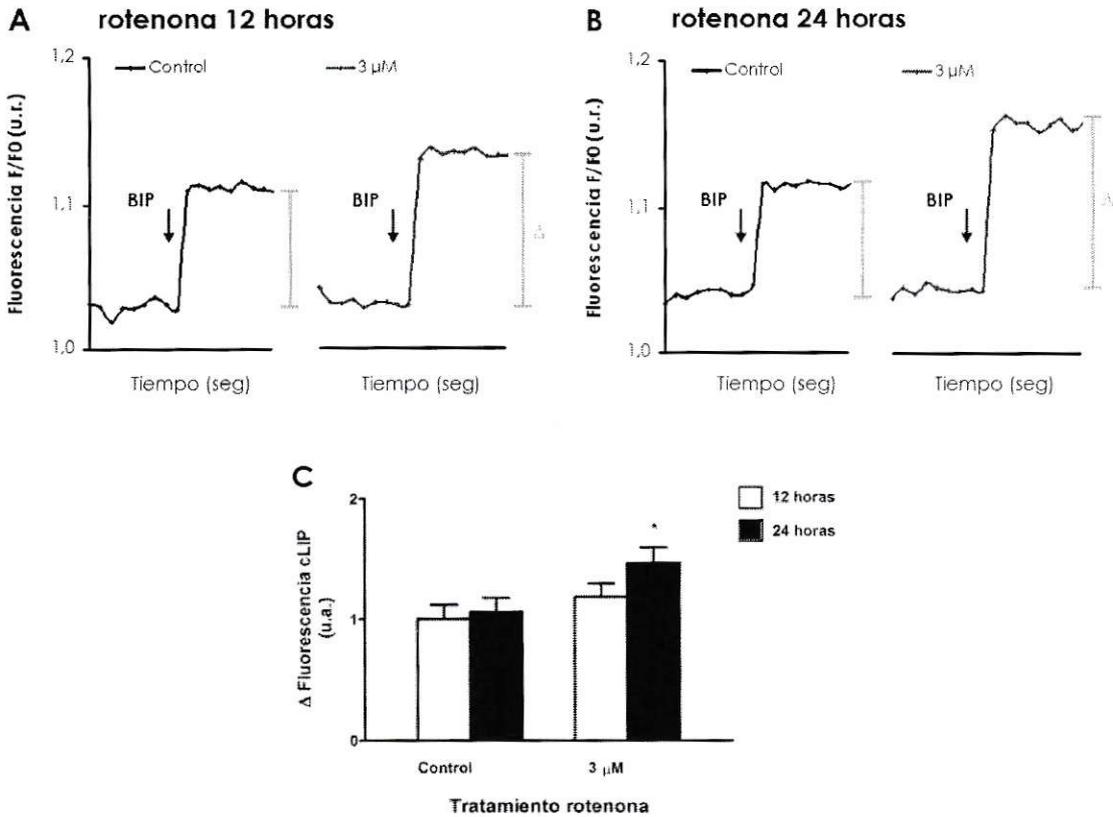


Figura 15. Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil citosólico (cLIP) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona por 12 horas y 24 horas. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas (A) y 24 horas (B) a las condiciones control y rotenona 3 μM para posteriormente determinar los niveles de cLIP mediante el uso de calceína. La magnitud del cLIP fue determinada por el incremento de la fluorescencia luego de agregar el quelante BIP. La fluorescencia obtenida de cada lectura luego de agregar BIP (F) fue normalizada por la fluorescencia basal (F0) obtenida luego de agregar DTPA y por los niveles de proteína. (u.r.) unidades relativas. Curvas representativas de seis experimentos independientes.

6. Expresión de DMT1

6.1. Antecedentes

El transportador de metales divalentes (DMT1) es una proteína de membrana consistente de 12 segmentos de transmembrana que forman 6 loops extracelulares. Su peso molecular aproximado es de 65 kDa (Tabuchi y col., 2000) pero también puede sufrir una glicosilación lo cual cambia su peso molecular a 90 kDa. Garrick y col. en el año 2003 demostraron, a través de ensayos de competencia y pérdida de función, que DMT1 está involucrado en el transporte de Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} .

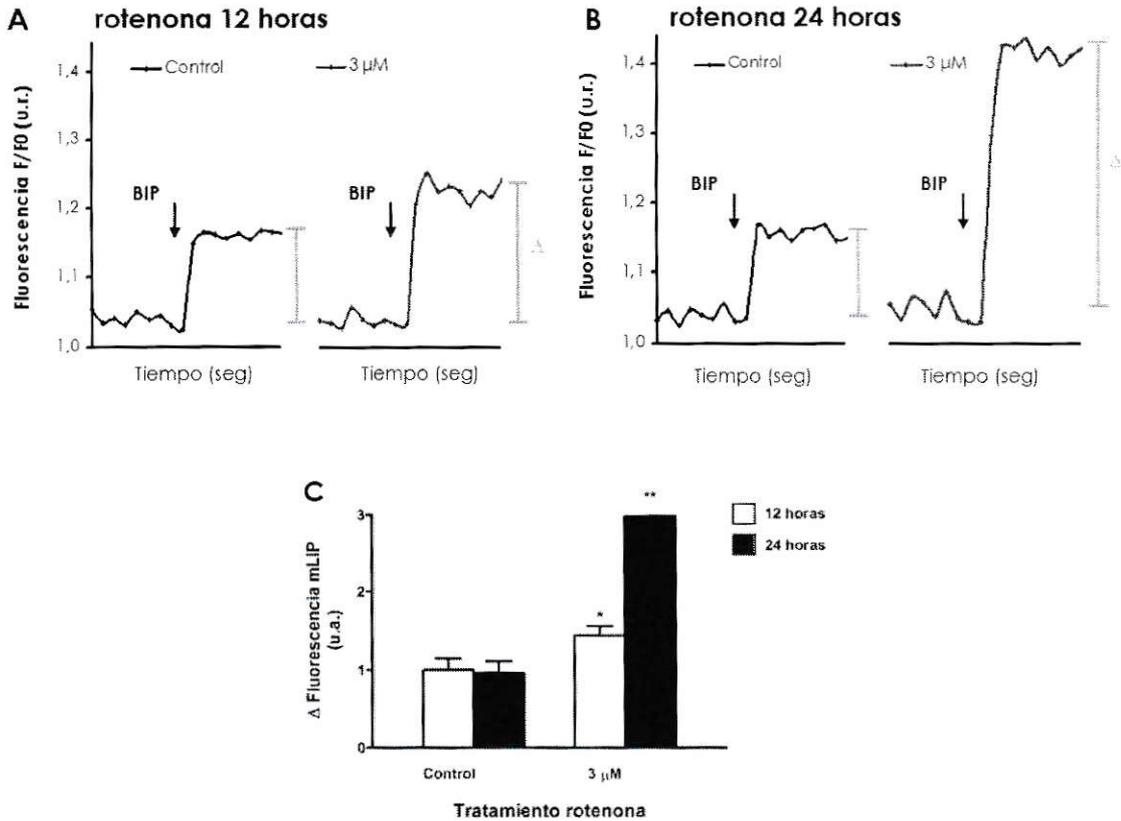


Figura 16. Determinación de los niveles del reservorio de hierro lábil mitocondrial (mLIP) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona por 12 horas y 24 horas. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas (A) y 24 horas (B) a las condiciones control y rotenona 3 μ M para posteriormente determinar los niveles de mLIP mediante el uso de RPA. La magnitud del mLIP fue determinada por el incremento de la fluorescencia luego de agregar el quelante BIP. La fluorescencia obtenida de cada lectura luego de agregar BIP (F) fue normalizada por la fluorescencia basal (F0) obtenida luego de agregar DTPA y por los niveles de proteína. (u.r.) unidades relativas. Curvas representativas de seis experimentos independientes.

El gen de DMT1 humano se encuentra localizado en el cromosoma 12 (12p3) e incluye 18 exones. Existen 4 isoformas de transcritos para DMT1. El empalme alternativo de la región 3' genera 2 tipos de isoformas. Un ARNm contiene un elemento de respuesta a hierro (+IRE); mientras que el otro no contiene este elemento (-IRE). La presencia de un IRE sugiere que los niveles de DMT1 pueden ser modulados por los niveles de hierro a través de una vía IRE-IRP. Sin embargo, existiría una vía independiente a la IRE-IRP que regularía los niveles de DMT1-IRE la que sería modulada por hierro. La isoforma +IRE es expresada en

la membrana plasmática de ciertos tipos de células epiteliales, mientras que la isoforma –IRE es expresada en muchos tipos celulares y es esencial para la adquisición del hierro desde transferrina (Wang y col., 2002).

Los mecanismos que contribuyen a la acumulación de hierro en neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson no se encuentran caracterizados completamente. Estudios en animales y en tejido post-mortem sugieren que DMT1 participaría en la acumulación de hierro y muerte celular (Salazar y col., 2008). Es por esto, que decidimos determinar la participación de DMT+IRE en la acumulación de hierro en células SH-SY5Y.

6.2. Rotenona produce un aumento en la síntesis de DMT1

6.2.1 ARNm de DMT1

El control transcripcional de la expresión de DMT1 puede ser afectado por citoquinas (TNF- α , IFN- γ) y LPS a través de múltiples vías. La región 5' regulatoria del gen para el DMT1 humano contiene un sitio potencial para el elemento regulador interferón y (IFN- γ), tres potenciales sitios para proteína específica 1 (Sp1), dos sitios potenciales para el factor 1 inducido por hipoxia (HIF-1) y cinco sitios potenciales para elementos a respuesta a metales (MRE) (Li y col., 2008). Debido a que citoquinas proinflamatorias y LPS elevan la expresión de los niveles de ARNm de DMT1 es que decidimos determinar si los niveles de DMT1 son modificados por rotenona.

No se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de DMT1+IRE en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona (Figura 17). Estos resultados indicarían que rotenona no modifica los niveles de ARNm de DMT+IRE.

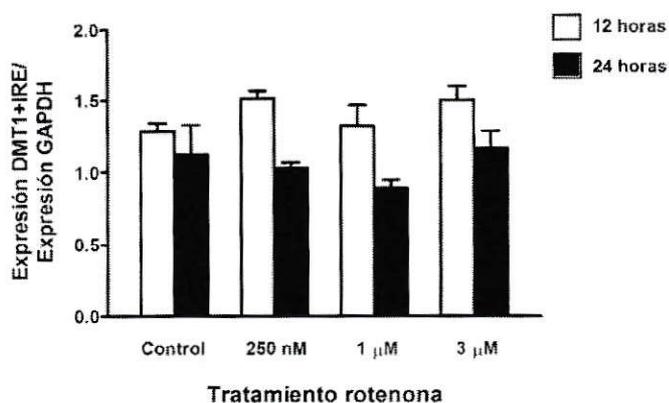


Figura 17. RT-qPCR de DMT1+IRE. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μ M y 3 μ M. Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNC, se realizó RT-qPCR contra DMT1+IRE. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones.

6.2.2. Proteína de DMT1+IRE

El análisis de DMT1 a través de Western blot reveló la presencia de una banda de 65kDa, reconociendo sólo la forma no modificada de la proteína. La cuantificación de las bandas demostró un aumento en los niveles de proteína luego de la exposición por 12 y 24 horas a rotenona (Figura 18). A las 12 horas se observa un aumento cercano a 3 veces en los niveles de proteína para rotenona μ M y 3 μ M y de un aumento cercano a 2,5 veces se observó con rotenona 250 nM. A las 24 horas se observó un aumento de 5 veces para rotenona 1 μ M y 3 μ M, y un aumento cercano a 4 veces para rotenona 250 nM. Este aumento de DMT1 participaría en el aumento en la incorporación de hierro y en la vulnerabilidad de estas células a rotenona.

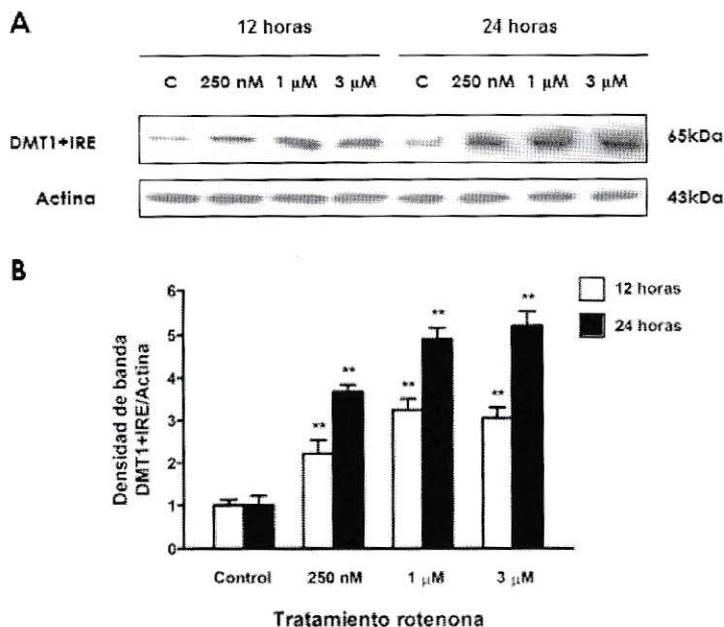


Figura 18. Expresión de DMT1+IRE en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot para DMT1+IRE y actina de homogenizados de células SH-SY5Y control y expuestas a rotenona. 20 μg de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión del péptido de DMT1+IRE. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** p < 0,01. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de actina.

7. Expresión de ferroportina 1

7.1. Antecedentes

Enterocitos duodenales, macrófagos, hepatocitos, células musculares y células del sistema nervioso requieren de un mecanismo de liberación de hierro que asegura una correcta homeostasis de este metal. El único exportador identificado hasta hoy día es Ferroportina 1/Ireg1/MTP1 (Abboud y Haile, 2000).

Animales knockout (-/-) para ferroportina 1 demostraron que es esencial para el desarrollo embrionario. La inactivación selectiva de ferroportina sugiere que esta proteína es esencial para la absorción intestinal de hierro (Donovan y col., 2005). Sin embargo, la función de ferroportina 1 en el cerebro aún no es completamente comprendida. La localización de ferroportina en neuronas y glías sugiere que es necesario para la salida de hierro. En modelos animales de EP se observa una disminución de los niveles de proteína

en la SN (Wang y col., 2007). Esta disminución se correlaciona con un aumento en los niveles de hierro en esta área. De acuerdo con estos resultados es que decidimos estudiar los cambios de Ferroporfina 1 en células dopaminérgicas expuestas a rotenona.

7.2. Rotenona induce un aumento transitorio en los niveles de ferroporfina 1

7.2.1. ARNm de ferroporfina 1

En células expuestas por 12 horas a las diferentes concentraciones de rotenona se observó un aumento en los niveles de ARNm de ferroporfina (Figura 19). Para los tres tratamientos de rotenona se produjo un aumento cercano a 2 veces comparado con los niveles de célula control. Control ($0,50 \pm 0,02$), rotenona 250 nM ($0,88 \pm 0,17$), 1 μM ($0,96 \pm 0,14$) y 3 μM ($0,79 \pm 0,07$). A las 24 horas no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm, sin embargo a rotenona 1 μM existe una leve disminución la cual fue significativa.

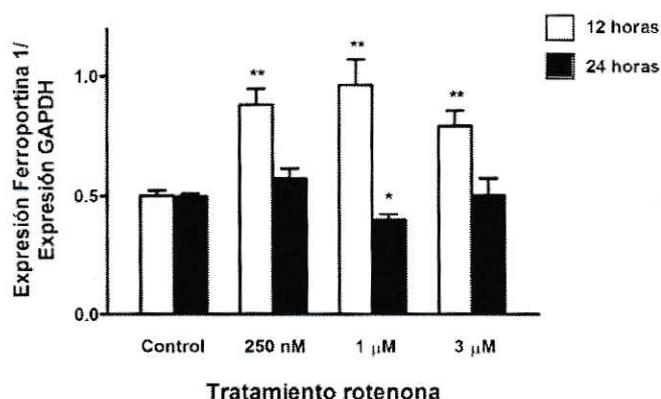


Figura 19. RT-qPCR de Ferroporfina 1. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM . Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNc, se realizó RT-qPCR contra Ferroporfina 1. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, * $p < 0,05$.

7.2.2. Proteína de ferroportina 1

Western blots para ferroportina revelaron una única banda del tamaño esperado (65kDa). La cuantificación de las bandas demostró aumentos significativos en células expuestas por 12 horas a rotenona (Figura 20). Se observó un aumento cercano a 3,7 veces en los niveles de proteína para rotenona 250 nM, 5,8 veces para rotenona 1 μ M y de 3,4 veces para rotenona 3 μ M. Sin embargo, a las 24 horas no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína.

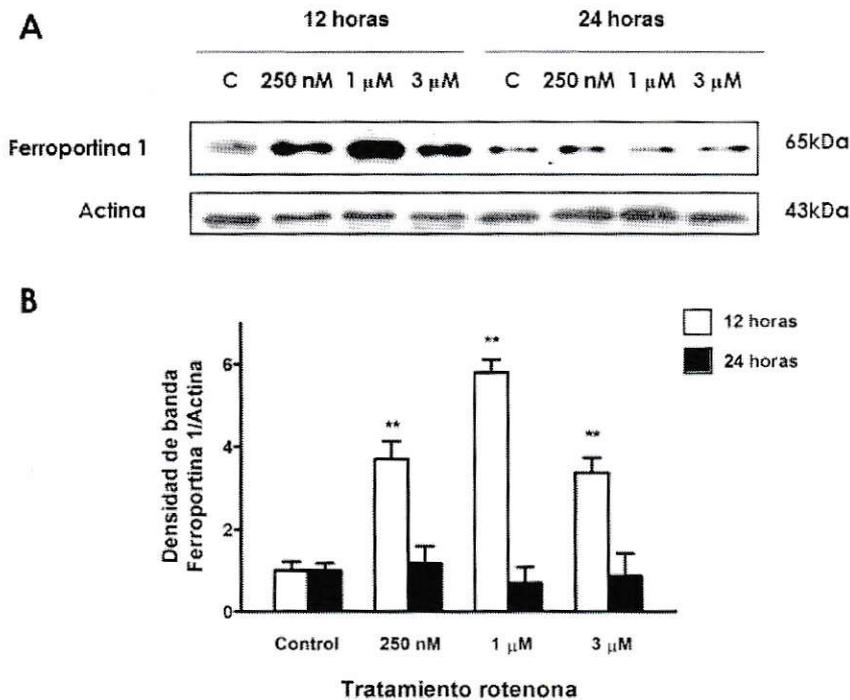


Figura 20. Expresión de ferroportina 1 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot contra ferroportina 1 y actina de homogenizados de SH-SY5Y control y expuestas a rotenona. 20 μ g de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión del péptido de ferroportina 1. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** p < 0,01. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de actina.

8. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo

8.1. Antecedentes

Gran parte de lo que conocemos acerca de los mecanismos de protección celular contra el estrés oxidativo ha provenido del estudio de células procarióticas (Zheng y Storz, 2000). Las células procariotas utilizan los factores de transcripción OxyR y SoxRS que detectan el estado redox de la célula. Durante el estrés oxidativo estos factores inducen la expresión de cerca de 80 genes defensivos (Zheng y Storz, 2000). Las células eucarióticas tienen mecanismos similares de protección contra el estrés oxidativo. Los efectos iniciales de la oxidación llevan a la activación de la expresión de una batería de genes de defensa, lo que guía a la detoxificación de sustancias químicas y de ROS y a mantener la viabilidad celular. De estos genes, algunos son enzimas como la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), NRH: quinona oxidoreductasa 2, la subunidad Ya de glutatión S-transferasa (GST Ya), heme oxigenasa 1 (HO-1), y la γ -glutamylcysteine sintetasa (γ -GCS), también conocida como la glutamato cisteína ligasa. Otros genes tienen productos finales que regulan una amplia variedad de actividades celulares, incluida la transducción de señales, la homeostasis del hierro celular como son las subunidades de ferritina citosólica, la proliferación y reacciones inmunológicas de defensa. Hay una gran variedad de factores asociados con la respuesta celular al estrés oxidativo. Por ejemplo, NF-E2-relacionado con el factor 2 (Nrf2), la proteína mitocondrial de choque térmico 70 (mtHsp70/mortalina), proteína de choque térmico activadora de respuesta 1, y NF- κ B promueven la supervivencia celular, mientras que la activación de c-jun, quinasas N-terminal, la quinasa p38, y TP53 puede conducir al arresto del ciclo celular y apoptosis. La vía Nrf2 es considerado como la más importante en la célula para proteger contra el estrés oxidativo (Jaiswal, 2004; Dhakshinamoorthy y col., 2000; Zhang, 2006; Kobayashi y Yamamoto, 2006; Copple y col., 2008).

8.1.2. Rotenona induce la expresión de Nrf2

El gen de Nrf2 humano se encuentra localizado en el cromosoma 2 (2q31.2). El peso molecular de la proteína de Nrf2 es de 57kDa y de 100kDa para la forma ubiquitinada.

8.1.2.1. ARNm de Nrf2

En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en el ARNm de Nrf2 cercano a 1,3 veces ($1,02 \pm 0,02$) comparado con los niveles de células control ($0,81 \pm 0,03$) (Figura 21). Células expuestas a rotenona 1 μM aumentaron 1,4 veces los niveles de ARNm ($1,18 \pm 0,03$) y un aumento de 1,6 fue observado en células expuestas a rotenona 3 μM ($1,28 \pm 0,07$). En células expuestas por 24 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en los niveles de ARNm de 1,5 veces ($0,97 \pm 0,02$) en comparación con los niveles de célula control ($0,65 \pm 0,03$). En células expuestas a rotenona 1 μM se produjo un aumento de 1,7 ($1,08 \pm 0,06$) y a rotenona 3 μM se produjo un aumento de 1,8 veces ($1,16 \pm 0,09$).

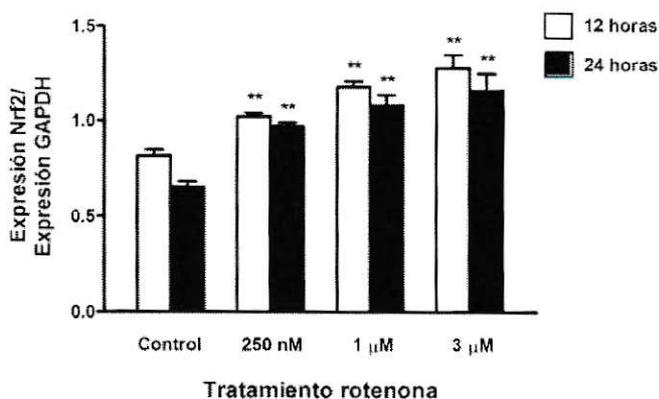


Figura 21. RT-qPCR de Nrf2. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM . Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNc, se realizó RT-qPCR contra Ferroporfina 1. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, ** $p < 0,01$.

8.1.2.2. Proteína de Nrf2

El análisis de Nrf2 a través de Western blot reveló que el anticuerpo contra Nrf2 reconoció dos bandas, una cercana a 60 kDa y una de menor tamaño (Figura 22). En base a la información del anticuerpo (Santa Cruz) consideramos la banda de mayor tamaño como Nrf2. La cuantificación de esta banda demostró un aumento en los niveles de proteína luego de la exposición por 12 horas a rotenona. A las 12 horas se observó un aumento cercano a 4 veces para rotenona 250 nM y 1 μ M. A rotenona 3 μ M se observó un aumento cercano a 3 veces en los niveles de proteína. No se observaron diferencias significativas a las 24 horas. Estos resultados indican que rotenona es capaz de inducir un aumento transitorio en los niveles de proteína de Nrf2.

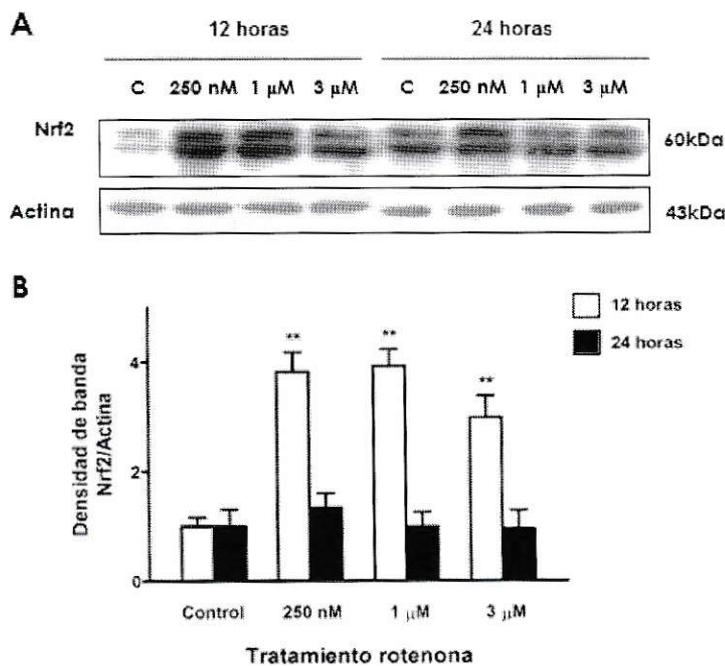


Figura 22. Expresión de Nrf2 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot contra Nrf2 y actina de homogenizados de SH-SY5Y control y expuestas a rotenona. El anticuerpo reconoció 2 bandas, la banda superior de un peso cercana a 60kDa correspondería a Nrf2 la banda inferior, observada en otras investigaciones, no ha sido caracterizada. 20 μ g de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión del péptido de Nrf2. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** $p < 0,01$. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de actina.

8.1.3. Rotenona induce la expresión de mtHsp70/mortalina

La proteína mitocondrial de shock térmico 70 (mtHsp70)/mortalina/GRP75 es un miembro altamente conservado de la familia de proteínas Hsp70, la cual está presente en todos los organismos desde bacterias a humanos. Las funciones de esta proteína son múltiples incluyendo la participación en el importe mitocondrial, en el tráfico intracelular y de chaperona. La sobre-expresión de esta proteína en *Caenorhabditis Elegans* induce un aumento en la expectativa de vida. Por otra parte, el knock-out de esta proteína resulta en un acortamiento del largo de vida y un acelerado fenotipo envejecido (Kimura y col., 2007).

8.1.3.1. ARNm de mtHsp70

En células expuestas por 12 horas a rotenona 250 nM se produjo un aumento en el ARNm de Hsp70 cercano a 1,3 veces ($0,95 \pm 0,04$) comparado con los niveles de célula control ($0,69 \pm 0,07$). Células expuestas a rotenona 1 μM aumentaron 1,7 veces los niveles a ARNm ($1,18 \pm 0,06$) y un aumento de 1,8 fue observado en células expuestas a rotenona 3 μM ($1,25 \pm 0,08$). En células expuestas por 24 horas a rotenona 250nM se produjo un aumento en los niveles de ARNm en 1,5 veces ($0,97 \pm 0,02$) comparado con los niveles de célula control ($0,66 \pm 0,06$). En células expuestas a rotenona μM se produjo un aumento de 2 veces ($1,36 \pm 0,04$) y a rotenona 3 μM se produjo un aumento de 1,8 veces ($1,18 \pm 0,08$) (Figura 23).

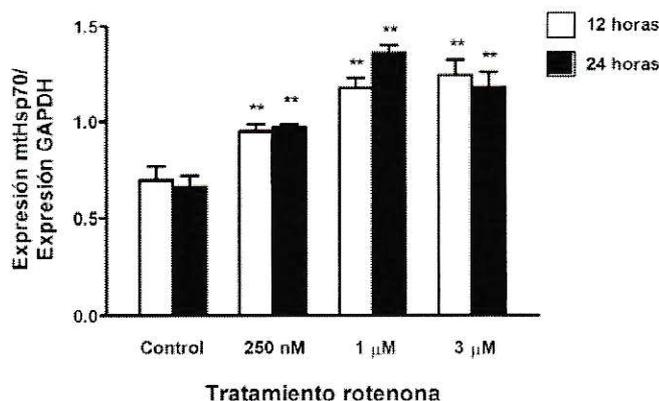


Figura 23. RT-qPCR de mtHsp70. Células SH-SY5Y fueron expuestas por 12 horas y 24 horas a concentraciones de rotenona de 250 nM, 1 μM y 3 μM. Luego de obtener el ARN total y el posterior ADNc, se realizó RT-qPCR contra Hsp70. Los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de la enzima GAPDH. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de seis determinaciones, ** p < 0,01.

8.1.3.2. Proteína de mtHSP70

El análisis de mtHsp70 a través de Western blot reveló que el anticuerpo reconoció una banda cernada a 70 kDa. Además, el anticuerpo reconoció a una de peso molecular de 90kDa, posiblemente la proteína de shock térmico 90 (Hsp90) (donado por la Dra. Anne-Laure Bulteau, INSERM U975, Paris, Francia). La cuantificación de mtHsp70 demostró un aumento en los niveles de proteína luego de la exposición por 12 horas a rotenona. A las 12 horas se observó un aumento cercano a 3,4 veces en los niveles de proteína para rotenona 250 nM, de 3,6 veces para rotenona 1 μM y de 6,5 veces para rotenona 3 μM. No se observaron diferencias significativas a las 24 horas. Estos resultados indican que rotenona indujo un aumento transitorio en los niveles de proteína de mtHsp70 (Figura 24).

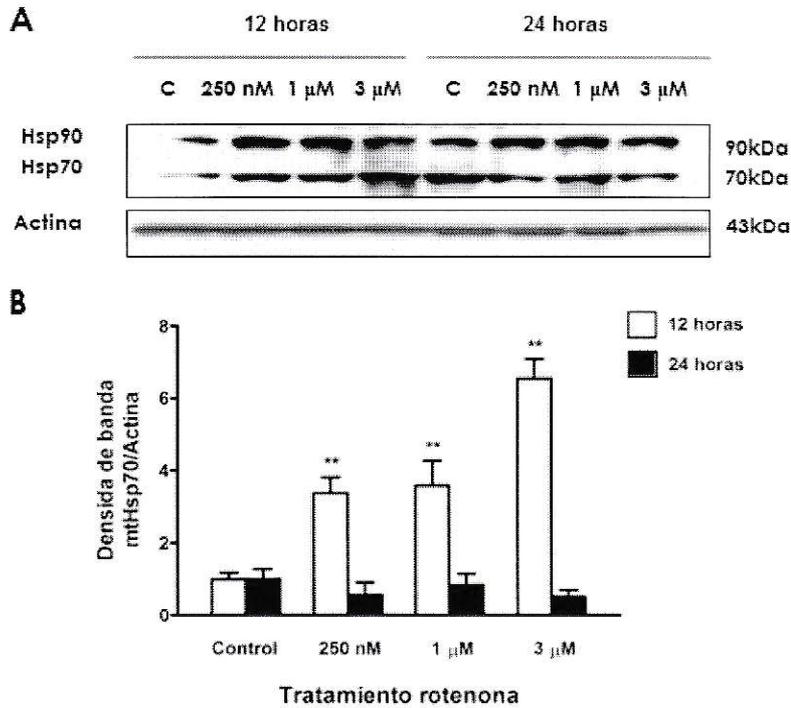


Figura 24. Expresión de mtHsp70 en células SH-SY5Y expuestas a rotenona. (A) Western blot contra mtHsp70 y actina de homogenizados de SH-SY5Y control y expuestas a rotenona por 12 horas y 24 horas. El anticuerpo fue capaz de reconocer mtHsp70 (70kDa) y la proteína citosólica Hsp90 (90kDa). 20 μ g de proteína fueron cargados. (B) Cuantificación de los cambios de expresión del péptido de mtHsp70. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** $p < 0,01$. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de actina.

9. Knock-down de MfTf en células SH-SY5Y

9.1. Antecedentes

Las mayoría de las investigaciones relacionadas con MfTf han indicado que la principal función de esta proteína es la regulación de la disponibilidad del hierro mitocondrial y el control de ROS. La expresión de MfTf en células de mamíferos genera el desplazamiento del hierro presente en el citosol hacia la mitocondria. Así, MfTf reduciría los niveles de ROS citosólico, produciría un aumento en los niveles de ATP y un aumento de la viabilidad.

En base a los antecedentes anteriormente descritos es que decidimos estudiar el efecto que tendría el knock-down de esta proteína en la viabilidad de células SH-SY5Y

expuestas a rotenona. Para esto, generamos células SH-SY5Y establemente transfectadas con un microARN (miARN) para MifFt. El vector utilizado expresa co-cistronicamente el microARN y la proteína bioluminiscente EmGFP (Emerald GFP) lo que permite la selección visual de las células que expresan el microRNA. Luego de transfectadas, las células fueron seleccionadas por 1 mes con el antibiótico blastomicina. Se diseñaron y probaron 3 secuencias diferentes de microARN contra MifFt: (i) un microARN no específico para MifFt, denominado 1a, (ii) un microARN específico para MifFt que produjo una reducción de los niveles de ARNm de MifFt cercana al 20%, denominado como 2a y (iii) un microARN específico para MifFt que produjo una reducción de los niveles de ARNm de MifFt cercana al 62%, denominado como 3c ($0,20 \pm 0,07$) en comparación con los niveles de ARNm de MifFt para células control ($0,53 \pm 0,05$). En la Figura 25 se observan células SH-SY5Y transfectadas con el microARN 3c. En estas células no se observaron diferencias morfológicas en comparación con células control. Un resultado interesante fue que en estas células 3c el tiempo de duplicación fue menor (de aproximadamente de 1-1,5 días) al de las células control (de aproximadamente 2 días).

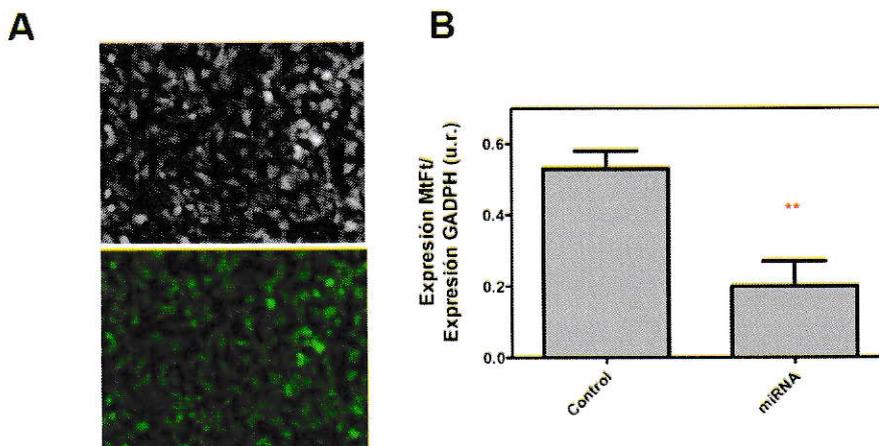


Figura 25. Células SH-SY5Y knock down para MifFt. (A) Imagen representativa de células SH-SY5Y que expresan un microARN para MifFt, células denominadas 3c. En la imagen superior se observa la fase celular, la imagen inferior muestra células SH-SY5Y expresando co-cistronicamente EmGFP, la longitud de onda para la máxima excitación es de 487nm. (B) PCR en tiempo real de células SH-SY5Y que expresan un microARN 3c para MifFt Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones, ** $p < 0,01$.

9.2. El knock-down de MfFt protege a células SH-SY5Y de la muerte celular mediada por rotenona

Debido a que la función de MfFt ha sido relacionada con la regulación de la disponibilidad del hierro mitocondrial, el control de ROS, prevención del daño inducido por estrés oxidativo es que decidimos estudiar el efecto que tendría rotenona en células SH-SY5Y knock-down para MfFt en la viabilidad celular. Nos planteamos como hipótesis que el knock-down de MfFt podría incrementar los efectos tóxicos de rotenona. Se comparó la viabilidad de células SH-SY5Y control versus células SH-SY5Y transfectadas con los microARNs 1a y 3c. Células control, células 1a y células 3c fueron expuestas por 24 horas a 1 μM de rotenona. La viabilidad fue determinada utilizando el ensayo de MTT y los resultados fueron normalizados por la viabilidad de las células control no expuestas a rotenona (100% de la viabilidad celular) y por la concentración de proteína. Células control expuestas a rotenona 1 μM disminuyeron su viabilidad en un 35%. Las células 1a expuestas a rotenona disminuyeron su viabilidad un 35%. El resultado esperado para las células 3c sería el relacionado con que una disminución en MfFt debería aumentar la sensibilidad de estas células a la exposición a rotenona, por lo que la viabilidad de estas células sería menor a la determinada para las células control. Sin embargo, en células 3c expuestas a rotenona no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular (Figura 26).

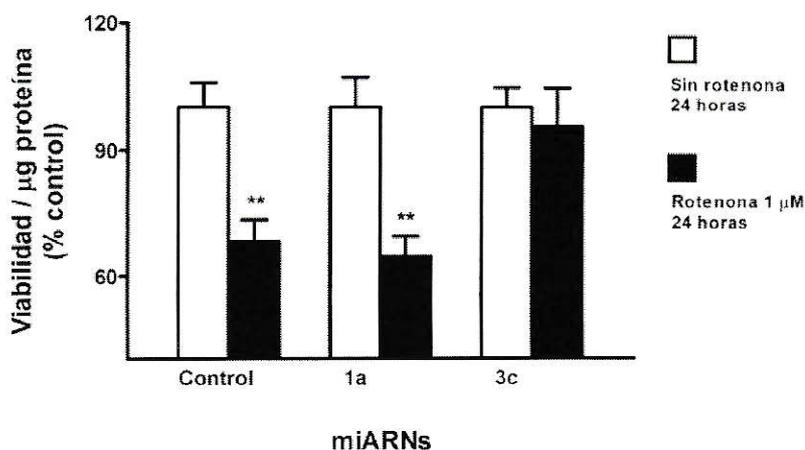


Figura 26. Viabilidad celular en células knock down para Mtf1 expuestas por 24 horas a 1 µM de rotenona. Luego de 24 horas de exposición a rotenona 1 µM, la viabilidad de células SH-SY5Y fue determinada utilizando el ensayo de MTT y normalizada por la viabilidad de las células control no expuestas a rotenona (100% de la viabilidad celular) y por la concentración de proteína. Las células denominadas 1a fueron transfectadas con un microARN no específico para Mtf1. Las células denominadas 3c fueron transfectadas con un microARN específico para Mtf1 que produjo una reducción de los niveles de ARNm de Mtf1 cercana al 62%. La viabilidad de células que no fueron expuestas a 1 µM de rotenona por 24 horas es representada por las barras blancas, mientras la viabilidad de las células expuestas a 1 µM de rotenona por 24 horas es representada por las barras negras. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones. ** P<0,01.

Estos resultados indican que el rol que tendría Mtf1 en evitar el daño oxidativo y la muerte celular en células expuestas a rotenona es contradictorio. Debido a esto, es que decidimos estudiar los niveles de proteína de factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo y protección en células knock-down para Mtf1.

9.3. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo en células SH-SY5Y knock-down para Mtf1

Debido a que una disminución en los niveles de Mtf1 podría producir un aumento en los niveles de ROS es que decidimos estudiar los niveles de proteína de factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo, como son mtHsp70, Hsp90 y Nf-κβ en células knock-down para Mtf1 (Figura 26). Se compararon los niveles de proteína de células SH-SY5Y control versus células SH-SY5Y denominadas como 1a, 2c, 3c. En las células

denominadas 3c se observó un aumento significativo en los niveles de proteína de Hsp90 y NF- κ B. No se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de mtHsp70 entre los distintos tipos de células. El aumento en los factores Hsp90 y Nf- κ B posiblemente es debido a un aumento del estrés oxidativo citosólico. Por otra parte, la falta de cambios significativos en los niveles de proteína mtHsp70 indica que los niveles de ROS mitocondrial no se vieron modificados. Esto sugiere que el aumento de los factores de transcripción Hsp90 y NF- κ B en células SH-SY5Y el knock-down para MfT proporciona protección en contra del daño oxidativo inducido por rotenona y promueve la sobrevivencia celular frente a condiciones de estrés.

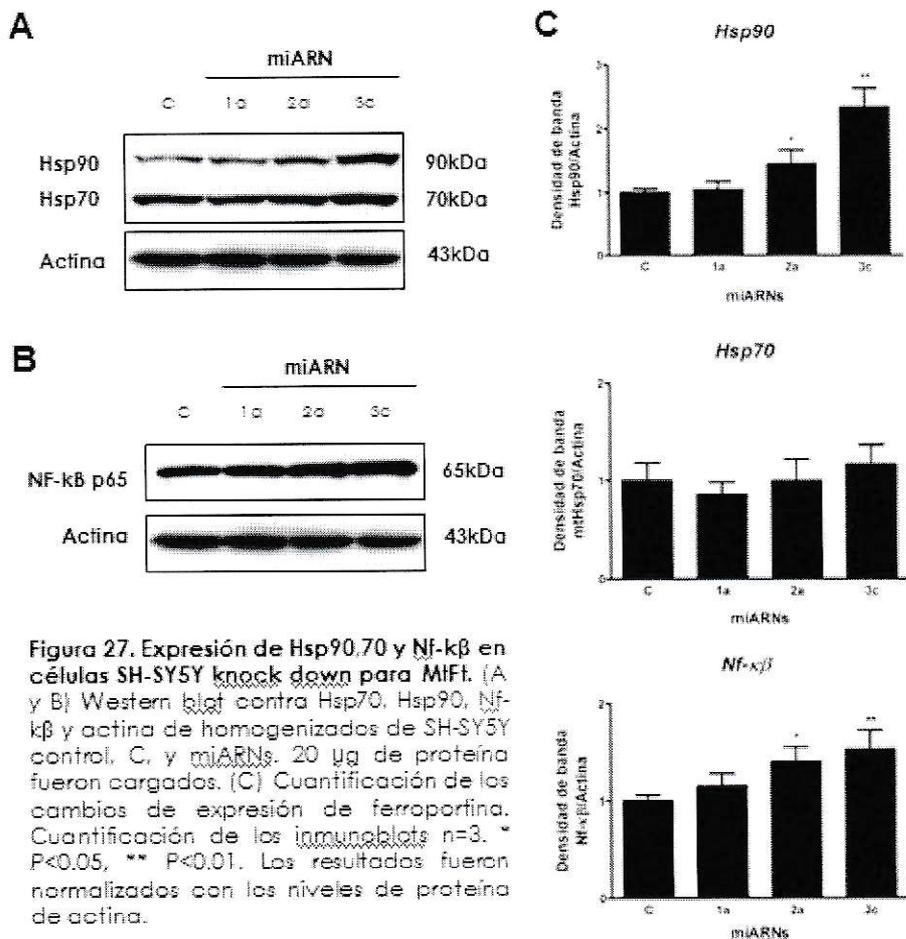


Figura 27. Expresión de Hsp90,70 y Nf- κ B en células SH-SY5Y knock down para MfT. (A y B) Western blot contra Hsp70, Hsp90, Nf- κ B y actina de homogenizados de SH-SY5Y control, C, y miARNs. 20 μ g de proteína fueron cargados. (C) Cuantificación de los cambios de expresión de ferroporfina. Cuantificación de los immunoblots n=3. * P<0.05, ** P<0.01. Los resultados fueron normalizados con los niveles de proteína de actina.

DISCUSION

1. Rotenona disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente

Estudios previos demostraron que rotenona induce apoptosis a través de un aumento en la producción de ROS mitocondrial (Li y col., 2003). En nuestro sistema experimental, rotenona produjo una disminución de la viabilidad en células SH-SY5Y de manera dosis y tiempo dependiente. Estos estudios nos permitieron establecer las condiciones de cultivo a ser utilizadas en experimentos posteriores.

2. Rotenona disminuye los niveles de ATP celular

Células SH-SY5Y expuestas a rotenona disminuyeron sus niveles de ATP celular de manera dosis dependiente. Una disminución de ATP produciría un incremento en la concentración de calcio intracelular, excitotoxicidad, daño celular relacionado con oxido nítrico y una disminución en la actividad de proteínas que requieren de ATP para su función, por ejemplo las enzimas que reparan el ADN del daño oxidativo. Por otra parte, rotenona 250 nM no disminuyó los niveles de ATP a las 12 h de incubación y sólo modestamente (13%) a las 24 h de incubación. Sin embargo, rotenona 250 nM indujo cambios significativos en la mayoría de los parámetros estudiados, por lo que es poco probable que estos cambios sean producto de la baja en los niveles de ATP y podría ser explicado por un aumento en el estrés oxidativo.

3. Rotenona produce el aumento en la síntesis de ferritina citosólica

Observamos que rotenona aumentó significativamente los niveles del ARNm de las subunidades cFtH y cFtL. El aumento en los niveles de ARNm de ambas subunidades observados a las 12 y 24 horas de tratamiento se explicaría por la activación de un mecanismo adaptativo que disminuye el reservorio de hierro libre y la producción de ROS,

debido a que el aumento de hierro libre conlleva un aumento del estrés oxidativo (Núñez y col., 2004). La respuesta a ROS es mediada por un potenciador (enhancer) específico presente en el promotor de ambas subunidades de cFt conocido como elemento de respuesta antioxidante (ARE). El factor de transcripción Nrf2 ha sido considerado como la principal proteína que interactúa con este elemento y que activa la transcripción génica en respuesta a una señal de estrés oxidativo.

Además, observamos un aumento en los niveles de proteína de cFt en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona. Sin embargo, los niveles de proteína para 24 horas fueron menores a los obtenidos para 12 horas y en algunos casos no se observaron diferencias significativas entre células control y células tratadas con rotenona, a pesar de los niveles sostenidos de ARNm. Esto podría deberse a que la respuesta de ferritina frente a rotenona a las 12 h permitiría regular rápidamente los niveles de cLIP. De esta forma, sería esperable que a las 24 horas de exposición a rotenona los niveles de proteína de ferritina sean menor, producto de un menor contenido de cLIP.

Sin embargo, la determinación de cLIP mediante el uso de la sonda fluorescente calceína en células expuestas a rotenona arrojó un aumento a las 24 horas de exposición. Así, el resultado obtenido para cFt tras 24 horas de exposición a rotenona (una menor expresión de la proteína) y un mayor cLIP, podrían ser un factor que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a rotenona. En este caso, la diferencia entre el aumento de ARNm y proteína se debería posiblemente a dos mecanismos: 1) un mecanismo de regulación post-transcripcional posiblemente mediado por el sistema IRE-IRP el cual se vería modificado por un aumento en los niveles de ROS y/o 2) un aumento en la degradación de la proteína. Un aumento en la actividad de unión de las IRPs ha sido determinada en células expuestas a óxido nítrico (Phillips y col., 1996), peróxido de hidrógeno (Martins y col., 1995), hierro (Núñez-Millacura y col., 2002) e hipoxia (Hanson y col., 1999). En estos casos, el aumento en la producción de ROS produciría el desensamblaje del complejo [4Fe-4S] presente en la proteína IRP1, lo que promueve su

activación. El posible aumento en los niveles de ROS observados en las células SH-SY5Y expuestas a las tres concentraciones de rotenona produciría la unión de IRP1 al IRE presente en el ARNm de ferritina citosólica impidiendo la traducción de esta proteína. De esta forma se explicaría el resultado observado para los niveles de proteína de ambas subunidades a las 24 horas de exposición a rotenona. Este resultado indicaría que un aumento en la actividad IRP1 ocurriría luego de 24 horas de exposición a rotenona.

Los datos obtenidos sugieren que, bajo condiciones de estrés oxidativo, cFt puede representar una molécula anti- o pro-oxidante de una manera tiempo-dependiente. En efecto, la exposición con rotenona indujo un aumento inicial de cFt (12 horas), limitando el estímulo oxidante. La posible degradación de ferritina o la disminución de su traducción luego de 24 horas de exposición a rotenona, contribuiría a un aumento en el cLIP.

4. Rotenona produce el aumento en la síntesis de ferritina mitocondrial

MtFt humana es expresada como un precursor con destinación a mitocondria, el cual es procesado en una proteína funcional con una estructura muy similar a la subunidad cFtH. MtFt incorpora hierro *in vivo* e *in vitro* de manera tan eficiente como cFt. La principal diferencia con cFt es su estructura cuaternaria: cFt es un hetero-polímero, mientras que MtFt es un homo-polímero que solamente se ensambla después del procesamiento en la mitocondria. El descubrimiento de MtFt resuelve un hallazgo antiguo. Desde hace cerca de 40 años, depósitos de hierro en la mitocondria han sido identificados por microscopía electrónica como centros de hierro similares a los observados en ferritina citosólica [Bessis y Breton-Gorius, 1962], pero la posibilidad de la existencia de una proteína similar a la ferritina en este organelo fue abandonada por años. El reciente descubrimiento de ésta y otras proteínas mitocondriales implicadas en el metabolismo de hierro, han hecho que la mitocondria sea considerada como un componente esencial en el metabolismo del hierro celular.

Se observó un aumento en los niveles de ARNm de MtFt a las 12 y 24 horas de

exposición a rotenona. Este aumento puede ser explicado por la activación de un mecanismo que produce una disminución del reservorio de hierro libre y la producción de ROS en la mitocondria. Sin embargo, se desconoce si el promotor de MtFt presenta algún sitio de unión similar al presente en ambas subunidades de cFt. Estudios preliminares de la región promotora indican sitios potenciales de unión a factores eritroides específicos como GATA y NFE2, además de la identificación de posibles sitios de unión de factores inflamatorios y de estrés como Nf- κ B, CREB, API y Oct1 (Levi y col., 2001), sin embargo la funcionalidad de estos factores aún no han sido determinados.

A diferencia a lo observado para cFt, en MtFt observamos un aumento dosis-dependiente en los niveles de proteína en células expuestas por 24 horas a rotenona, sin observar cambios significativos en la exposición por 12 horas. Este aumento de MtFt frente a rotenona podría regular el exceso de hierro presente en la mitocondria. Esto regularía tardíamente los niveles de hierro libre mitocondrial (mLIP). A pesar que los niveles de MtFt aumentan a las 24 horas de exposición a rotenona, los niveles de mLIP son elevados. Es posible que el hierro presente en MtFt contribuya al aumento del mLIP debido a: (i) la degradación de MtFt o (ii) debido a que MtFt es un homopolímero que carece de una subunidad que produce la mineralización del hierro, por lo que el hierro almacenado en MtFt podría estar disponible para intercambio con el medio lo que sería un factor que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a rotenona.

Estos resultados indicarían que cFt y MtFt no responden concertadamente en células expuestas a rotenona. Debido a que los niveles de proteína de cFt aumentan inicialmente (12 horas), pero a las 24 horas los niveles disminuyen a valores similares al control. Este comportamiento debiera aumentar la vulnerabilidad de estas células ya que los niveles de cLIP en este periodo de tiempo son mayores. Los niveles de proteína de MtFt aumentarían tardíamente (24 horas) posiblemente debido a un aumento en los niveles de mLIP.

5. Rotenona produce un aumento en la síntesis de DMT1

No observamos cambios significativos en los niveles de ARNm de DMT1+IRE en células expuestas por 12 y 24 horas a rotenona, pero si se observó un aumento en los niveles de la proteína. Estos resultados indicarían que rotenona no modifica los niveles de ARNm de DMT+IRE.

El aumento en los niveles de proteína de DMT+IRE en células SH-SY5Y expuestas a rotenona fue dependiente de la concentración de rotenona y del tiempo de cultivo con esta. Los niveles más elevados de proteína fueron observados en células expuestas a rotenona 1 μ M y 3 μ M a las 24 horas y en donde estos tratamientos producen una muerte celular de un 33% y 45%, respectivamente. Estos resultados son relevantes ya que podría revelar la vulnerabilidad de estas células al insulto de rotenona producto de un aumento en la incorporación de hierro. Mediciones del cLIP y mLIP revelaron aumentos significativos a las 12 y 24 horas de exposición a rotenona, por lo que el aumento de DMT1 participaría en el aumento en la incorporación de hierro, el aumento en los niveles de hierro libre, el consecuente aumento de ROS y, probablemente, la muerte celular.

La inhibición del complejo I mitocondrial, el evento inicial de la toxicidad de rotenona, podría modular la actividad de unión de la proteína IRP1 debido a un aumento en ROS. El aumento en la actividad de IRP1 aumentaría la expresión de DMT1+IRE y el consecuente aumento en los niveles de hierro celular.

6. Rotenona produce un aumento transitorio en la síntesis de ferroportina 1

En células expuestas por 12 horas a las diferentes concentraciones de rotenona se observó un aumento en los niveles de ARNm de ferroportina 1. Sin embargo, a las 24 horas de exposición a rotenona disminuyeron a niveles basales. Estos resultados indicarían una posible regulación transcripcional de ferroportina 1.

Western blots para ferroportina 1 revelaron aumentos significativos en células expuestas por 12 horas a rotenona. Este resultado indicaría un mecanismo inicial

destinado a disminuir los niveles de hierro celular. Sin embargo, a las 24 horas no se observaron cambios significativos de expresión con respecto a las células control.

Debido a que no se observan diferencias significativas en los niveles de ferroportina 1 a las 24 horas, que los niveles de DMT1+IRE aumentaron dramáticamente, que los niveles de cLIP también aumentaron y que los niveles de ferritina citosólica no se vieron modificados (por lo que la capacidad de buffer celular se ve disminuida en este periodo de tiempo) es que estos resultados favorecerían a un aumento en los niveles de hierro, el consecuente aumento de ROS y un aumento en el daño oxidativo.

7. Expresión factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo

7.1. Nrf2

La inducción de la expresión de algunas enzimas cito-protectoras en respuesta a estrés oxidativo es regulada principalmente a nivel transcripcional. Esta respuesta transcripcional es mediada por un elemento cis denominado ARE. La alteración del estado redox celular debido a un elevado nivel de ROS y/o una menor capacidad antioxidante (por ejemplo, menores niveles de glutatión reducido) es una importante señal para activar la respuesta transcripcional mediada por este potenciador. Además de su participación en la expresión génica inducible, ARE es también responsable de la expresión constitutiva de varios genes bajo condiciones no estresantes. Debido a que ROS y otras especies reactivas endógenas son constantemente producidos desde el metabolismo aeróbico normal, la participación de ARE en el control de la expresión génica constitutiva implica el rol crítico de este potenciador en mantener la homeostasis redox celular.

La activación de la transcripción génica a través de ARE es mediado principalmente por Nrf2. A las 12 y 24 horas observamos un aumento en los niveles de ARNm de Nrf2. El aumento fue mayor a las 24 horas. Sin embargo, los resultados obtenidos para la proteína indican que rotenona es capaz de inducir un aumento transitorio (12

horas) en los niveles de proteína de Nrf2. No se observaron diferencias significativas a las 24 horas. Otros estudios han estimado que la vida media de Nrf2 es muy corta, siendo menor de 20 minutos en macrófagos y en varias líneas celulares (Kensler y col., 2007). Todo parece indicar que la célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control primario de su función en este periodo de tiempo radicaría principalmente en su distribución nuclear, más que en la síntesis *de novo* (Kensler y col., 2007). Sin embargo, este resultado también puede ser debido a que la inhibición del complejo I por rotenona resulta en una mayor degradación de Nrf2 mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Kobayashi y col., 2006), lo que produciría una menor resistencia neuronal al estrés oxidativo.

7.2. mtHsp70

Desórdenes neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica se caracterizan por la acumulación neuronal de proteínas mal plegadas. En respuesta a varias formas de estrés, las células activan una respuesta altamente conservada de proteínas de shock térmico (Hsp). Diversas evidencias sugieren que la manipulación de esta respuesta podría ofrecer estrategias para proteger las células cerebrales de la neurodegeneración. Estudios de sobre-expresión de Hsp70, Hsp40 y Hsp27 han demostrado el efecto protector de Hsps en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Muchowski y Wacker. 2005). Las acciones protectoras de mtHsp70 podrían incluir la prevención de agregación proteica, el replegamiento de proteínas parcialmente denaturadas y la inhibición de las vías de muerte celular. Esto indica que mtHsp70 es una proteína capaz de proteger las células a través de una variedad de mecanismos.

A las 12 y 24 horas de exposición a rotenona observamos un aumento en los niveles de ARNm de mtHsp70. Los aumentos fueron dosis-dependiente en el rango. Sin embargo, los resultados obtenidos para la proteína indicaron que rotenona indujo un aumento en los

niveles de mtHsp70 a las 12 horas de incubación, no observándose diferencias significativas a las 24 horas. Esta diferencia entre el ARNm y proteína se debería posiblemente a un mecanismo de regulación post-transcripcional que impediría un aumento en los niveles de proteína. Estos mecanismos de regulación pueden ser explicados por: 1) un menor número de proteínas mal plegadas, lo que sería cuestionable debido a que los niveles de mLIP aumentan en este periodo de tiempo y un mayor número de modificaciones proteicas serían esperables o 2) una mayor degradación de esta proteína, lo que produciría una menor resistencia neuronal al estrés oxidativo.

Sobre la base a este y los anteriores resultados es razonable estimar que una pérdida en la homeostasis celular de hierro y en los mecanismos de protección a las 24 horas de exposición a rotenona sean los responsables de la muerte celular.

8. Consecuencias del knock-down de MfFt en células SH-SY5Y

Aunque la función fisiológica de MfFt está recién conociéndose, los resultados obtenidos en otros laboratorios han mostrado que la sobre-expresión de MfFt resulta en una rápida y eficiente redistribución del hierro presente en el citosol hacia la mitocondria (Nie y col., 2005; Nie y col., 2006). Debido a que la expresión de MfFt previene, al menos en parte, el daño inducido por estrés oxidativo en células Hela y levaduras deficientes en frataxina (Zanella y col., 2008; Campanella y col., 2004), es que nos planteamos como hipótesis que el knock-down de MfFt podría incrementar los efectos tóxicos de rotenona. Para probar esta hipótesis producimos células SH-SY5Y establemente transfectadas con un miARN para MfFt. En estas células, se observó una disminución en los niveles de ARNm de MfFt cercana a un 62% (células denominadas 3c). No se observaron diferencias morfológicas entre estas células y células control. Un resultado interesante fue que en estas células el tiempo de duplicación fue menor (de aproximadamente de 1-1.5 días) al de las células control (de aproximadamente 2 días). Este resultado se relaciona con el

obtenido para células tumorales de ratón en donde la sobre-expresión de MtFt produce un arresto del crecimiento (Guangjun y col., 2006).

Estudiamos los niveles de proteína de factores de transcripción relacionados con estrés oxidativo. Los resultados indicaron que la disminución en los niveles de MtFt resultó en el aumento en los factores Hsp90 y Nf- κ B posiblemente debido a un cambio en el estado oxidativo en el citosol. A diferencia de lo que esperábamos, no observamos cambios significativos en los niveles de proteína mtHsp70, lo que indicaría que en estas células no ocurrió un aumento en el estado oxidativo mitocondrial.

En acuerdo con el resultado anterior, las células SH-SY5Y knock-down para MtFt expuestas a rotenona no sufrieron una disminución significativa de la viabilidad. Existen dos posibles explicaciones para este resultado. La primera, es el aumento de los factores de transcripción Hsp90 y Nf- κ B proporcionarían protección en contra del daño y promoverían la sobrevivencia celular frente a condiciones de estrés. La otra explicación, esta relacionada con los resultados recientes (Lu y col., 2009) en donde la sobre-expresión de MtFt disminuyó la viabilidad celular en células expuestas a t-BHQ (un inductor de estrés celular) de una manera más dramática. Este aumento de la muerte celular sería originado por una disminución de la actividad metabólica mitocondrial y potencial de membrana, una reducción en los niveles de glutatión, un aumento en los niveles de ROS y apoptosis. De esta manera, el aumento de MtFt produciría un aumento en sensibilidad celular al estrés oxidativo. En células que sobre-expresan MtFt existe un dramático aumento en la incorporación de hierro vía transferrina-TfR y una disminución en cFT (Lu y col., 2009). También observaron que las mitocondrias ricas en hierro son degradadas intralisosomalmente incrementando el hierro redox activo celular (Lu y col., 2009). Sobre la base a estos antecedentes, el impedir el aumento de la proteína MtFt (a través de un microARN) en células SH-SY5Y expuestas a rotenona se favorecería la supervivencia.

En las células SH-SY5Y expuestas a rotenona se observó un aumento en los niveles de MtFt lo que podría producir un aumento en la incorporación de hierro a la mitocondria.

Además el aumento de DMT1 y de TfR1 y 2 (determinado por qPCR, dato no mostrado) favorecerían la vulnerabilidad de estas células a rotenona, producto de un aumento en la incorporación de hierro. Células SH-SY5Y expuestas a rotenona despliegan mecanismos destinados a disminuir y controlar los niveles de hierro celular para evitar un aumento en los niveles de ROS y el daño oxidativo. Sin embargo, pareciera ser que luego de 24 horas de exposición a rotenona existe una pérdida del control de este mecanismo evidenciado por un aumento en los niveles de cLIP y mLIP, un aumento en los niveles de DMT1 y una disminución en los niveles de Nrf2, mtHsp70, cFt y ferroportina 1 lo que favorecería a un daño celular.

El rol que tendría MtFt en evitar el daño oxidativo es contradictorio. El hierro acumulado en MtFt podría ser considerado como seguro, pero cada vez que MtFt es degradada el hierro liberado contribuye transitoriamente al mLIP y a un aumento de ROS. Esto ha sido probado para cFt. Ratones jóvenes que sobre-expresan la subunidad cFtH en neuronas de la SN muestran una mayor protección frente a la toxicidad a MPTP, sugiriendo que la quelación de hierro podría ser una efectiva terapia de neuroprotección (Kaur y col., 2003). Sin embargo, ratones viejos que sobre-expresan esta subunidad en neuronas de la SN y que no fueron expuestos a MPTP desarrollaron neurodegeneración de estas células (Kaur y col., 2007). Al exponer estos ratones a MPTP, ellos experimentaron una mayor neurodegeneración que los animales que no sobre-expresan cFtH (Kaur y col., 2009) debido a un aumento en los niveles de cLIP y ROS.

Estos resultados proveen una fuerte evidencia que la sobre-expresión de cFt y posiblemente la de MtFt podrían estar involucradas directamente a la neurodegeneración como ocurre en EP y otras enfermedades relacionadas.

Explicamos que el mecanismo de control homeostático del hierro es realizado principalmente por proteínas que registran la disponibilidad del metal a través de interacciones directas con el hierro presente en el citosol. Estas proteínas de unión a ARN son denominadas como IRP1 e IRP2. Al aumentar la expresión de MtFt se favorecería una

redistribución del hierro presente en el citosol hacia la mitocondria, la disminución del hierro citosólico produciría un aumento en la actividad de IRP1 y el consecuente aumento de la incorporación de hierro, debido a que existiría una falsa señal de carencia de hierro citosólico. Esto generaría un círculo vicioso que produciría un aumento en la incorporación de hierro y el consecuente aumento de ROS y daño celular.

La Figura 28 muestra un modelo sobre la desregulación en la homeostasis del hierro que ocurriría en neuronas dopaminérgicas humanas SH-SY5Y expuestas a rotenona.

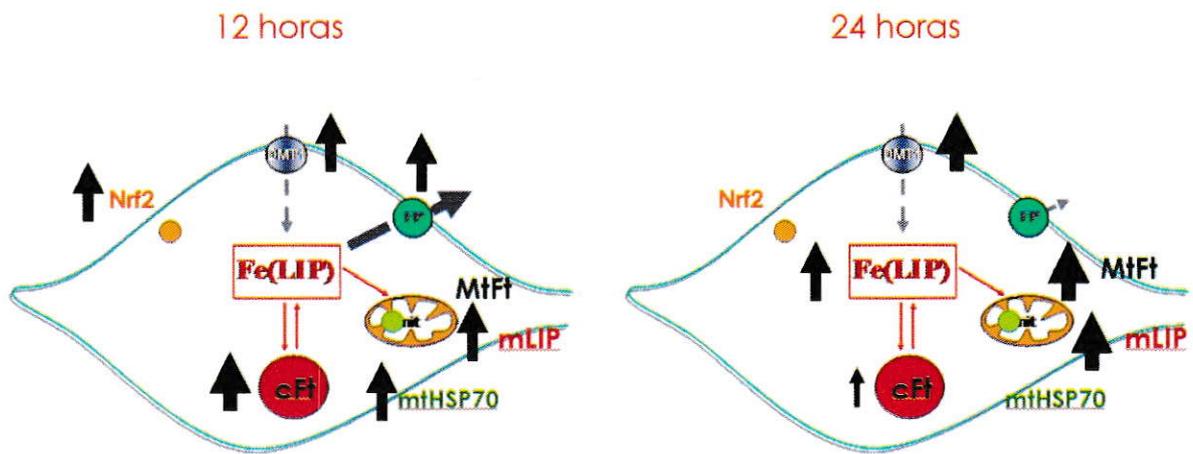


Figura 28. Efecto de rotenona en neuronas dopaminérgicas humanas SH-SY5Y. La inhibición del complejo I, luego de 24 horas de exposición a rotenona, produce un aumento en los niveles de DMT1+IRE y el consecuente aumento del cLIP. Una disminución en la capacidad de almacenamiento de hierro celular, debido a la disminución en los niveles de cFt, favorecería a un aumento de la disponibilidad del cLIP. La disminución o la no modificación de los niveles de proteína de ferroportina impiden eliminar el exceso de hierro celular en estas condiciones. El aumento de MfTf podría favorecer la incorporación de hierro hacia la mitocondria. EL aumento en la actividad de unión a IRE de la proteína IRP1, podría explicar el consecuente aumento de la incorporación de hierro, debido a que existiría una falsa señal de carencia de hierro citosólico. Esto generaría un círculo vicioso que produciría un aumento en la incorporación de hierro y el consecuente aumento de ROS, daño celular y la muerte celular.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se encontraron resultados relevantes relacionados con la pérdida de la regulación de la homeostasis del hierro celular en células neuronales dopaminérgicas SH-SY5Y expuestas a rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial utilizado como modelo de la enfermedad de Parkinson. En particular, observamos que el aumento de los niveles del hierro lábil citosólico podrían ser explicados por: (i) un aumento en los niveles del transportador de entrada de hierro DMT1, (ii) una disminución de la capacidad de almacenamiento del hierro citosólico debido a una disminución de ferritina citosólica y (iii) la no modificación del transportador de salida de hierro ferroportina.

A pesar que los niveles de ferritina mitocondrial aumentaron tardíamente luego de la exposición a rotenona, los niveles de niveles del hierro lábil mitocondrial fueron elevados. El aumento de MtFt podría favorecer la incorporación de hierro hacia la mitocondria y la consecuente disminución del hierro lábil citosólico. Esta disminución produciría un aumento en la actividad de IRP1 y un aumento de la incorporación de hierro, debido a que existiría una falsa señal de carencia de hierro citosólico. Además, el hierro presente en MtFt contribuiría al aumento del hierro lábil mitocondrial debido a: (i) la degradación de MtFt o (ii) debido a que MtFt es un homopolímero que carece de una subunidad que produce la mineralización del hierro, por lo que el hierro almacenado en MtFt se encuentra más disponible para intercambio con el medio intra-mitocondrial.

Estos resultados indican que la muerte de neuronas dopaminérgicas como resultado de la inhibición del complejo I mitocondrial se debe a la desregulación de la homeostasis celular del hierro, lo que generaría un aumento del estrés oxidativo y daño celular.

REFERENCIAS

- Abboud, S., Haile, D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 275(26):19906-12.
- Aguirre, P., Valdés, P., Aracena-Parks, P., Tapia, V., Núñez, M.T. (2007) Upregulation of gamma-glutamyl-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(6):C2197-203.
- Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997a) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 1997 69:1196-203.
- Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997b) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem.* 69:1326-9.
- Andrews, S.C., Arosio, P., Bottke, W., Briat, J.F., von Darl, M., Harrison, P.M., Lahlou, J.P., Levi, S., Lobreaux, S. and Yewdall, S.J. (1992) Structure, function, and evolution of ferritins. *J Inorg Biochem.* 47:161-74.
- Andrews, N.C. (1999) The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:991-4.
- Armijo, E.A. (2009) "Análisis de la expresión de ferritina mitocondrial y ferritina citosólica en un modelo progresivo de acumulación de hierro en células neuronales". Memoria de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Arosio, P. and Levi, S. (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 33:457-63.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W. and Vercellotti, G.M. (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 267:18148-53.
- Beard, J.L., Connor, J.R. (2003) Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr* 23:41-58.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. and Bishop, D.F. (2000) Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood.* 96:3256-64.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Breuer, W., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I. (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J Biol Chem.* 270(41):24209-15.

- Bessis, M.C., Breton-gorius, J. (1962) Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. *Blood*. 19:635-63.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. and Sheu, S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817–C833.
- Cairo, G., Ronchi, R., Recalcati, S., Campanella, A., Minotti, G. (2002) Nitric oxide and peroxynitrite activate the iron regulatory protein-1 of J774A.1 macrophages by direct disassembly of the Fe-S cluster of cytoplasmic aconitase. *Biochemistry*. 41(23):7435-42.
- Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H.A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P., Levi, S. (2004) The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet*. 13(19):2279-88.
- Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F. and Nakase, Y. (1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*. 254:4764-71.
- Chaston, T.B. and Richardson, D.R. (2003) Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am J Hematol*. 73:200-10.
- Connor, J.R., Snyder, B.S., Beard, J.L., Fine, R.E. and Mufson, E.J. (1992) Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 31: 327-35.
- Connor, J. R., Boeshore, K. L., Benkovic, S. A. and Menzies, S. L. (1994) Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J. Neurosci. Res*. 37: 461–465.
- Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., Park, B.K. (2008) The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246(1):24-33.
- Corsi, B., Cozzi, A., Arosio, P., Drysdale, J., Santambrogio, P., Campanella, A., Biasiotto, G., Albertini, A., Levi, S. (2002) Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 277(25):22430-7.
- Cullen, B. R. (2004) Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 102, 3-9.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39(6):889-909.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., Marsden, C.D. (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 52(6):1830-6.
- Dexter, D.T., Sian, J., Rose, S., Hindmarsh, J.G., Mann, V.M., Cooper, J.M., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Schapira, A.H., et al. (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*. 35(1):38-44.
- Dhakshinamoorthy, S., Long, D.J. and Jaiswal, A.K. (2000) Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul*. 36:201-16.

- Dickey, L. F., Sreedharan, S., Theil, E. C., Didsbury, J. R., Wang, Y.H. and Kaufman, R. E. (1987) Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits and identification of the first processed in amphibia. *J. Biol. Chem.* 262: 7901-07.
- Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C. (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 1(3):191-200.
- Drysdale, J., Arosio, P., Invernizzi, R., Cazzola, M., Volz, A., Corsi, B., Biasiotto, G. and Levi, S. (2002) Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 29:376-83.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., Comella, J.X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 75(3):991-1003.
- Epsztejn, S., Glickstein, H., Picard, V., Slotki, I.N., Breuer, W., Beaumont, C., Cabantchik, Z.I. (1999) H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood.* 94(10):3593-603.
- Espósito, B.P., Epsztejn, S., Breuer, W., Cabantchik, Z.I. (2002) A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal Biochem.* 304(1):1-18.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259-272
- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J.A., Singleton, S., Garrick, L.M. (2003) DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals.* 16(1):41-54.
- Garrido, C. and Kroemer, G. (2004) Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 16:639-46.
- Gibb, W.R., and Lees, A.J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 745-752.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2008) Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med.* 8:119-30.
- Glickstein, H., El, R.B., Shvartsman, M., Cabantchik, Z.I. (2005) Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood.* 106(9):3242-50. Epub 2005 Jul 14.
- Gorell, J.M., Ordidge, R.J., Brown, G.G., Deniau, J.C., Buderer, N.M., Helpert, J.A. (1995) Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology.* 45(6):1138-43.
- Götz, M.E., Double, K., Gerlach, M., Youdim, M.B. and Riederer, P. (2004) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1012:193-208.

- Greenamyre, J.T., Sherer, T.B., Betarbet, R., Panov, A.V. (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*. 52(3-5):135-41.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.*:899:136-47.
- Hanson, E.S., Foot, L.M., Leibold, E.A. (1999) Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem*. 274(8):5047-52.
- Harley, A., Cooper, J.M., Schapira, A.H. (1993) Iron induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction: relevance to Parkinson's disease. *Brain Res*. 627(2):349-53.
- Harrison, P.M. and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1275:161-203.
- Hauptmann, N., Grimsby, J., Shih, J.C., Cadenas, E. (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys*. 335(2):295-304.
- Hentze, M.W., Kühn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(16):8175-82.
- Hill, J.M. (1985) Iron concentration reduced in ventral pallidum, globus pallidus, and substantia nigra by GABA-transaminase inhibitor, gamma-vinyl GABA. *Brain Res*. 342:18-25.
- Hintze, K. J. and Theil, E. C. (2006) Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins *Cell. Mol. Life Sci*. 63:591-600.
- Hirsch, E.C., Brandel, J.P., Galle, P., Javoy-Agid, F., Agid, Y. (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem*. 56(2):446-51.
- Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 36(10):1199-207.
- Kakhlon, O., Gruenbaum, Y., Cabantchik, Z.I. (2001) Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. *Blood*. 97(9):2863-71.
- Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*. 33(8):1037-46.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J.Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M.F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Cherny, R.A., Bush, A.I., Andersen, J.K. (2003) Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron*. 37(6):899-909.
- Kaur, D., Rajagopalan, S., Chinta, S., Kumar, J., Di Monte, D., Cherny, R.A., Andersen, J.K. (2007) Chronic ferritin expression within murine dopaminergic midbrain neurons results in a progressive age-related neurodegeneration. *Brain Res* 1140:188-94.

- Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J.K. (2009) Chronic expression of H-ferritin in dopaminergic midbrain neurons results in an age-related expansion of the labile iron pool and subsequent neurodegeneration: implications for Parkinson's disease. *Brain Res.* 1297:17-22.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:89-116.
- Kimura, K., Tanaka, N., Nakamura, N., Takano, S., Ohkuma, S. (2007) Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 282(8):5910-8.
- Kobayashi, M., Yamamoto, M. (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 46:113-40.
- Langlois d'Estaintot, B., Santambrogio, P., Granier, T., Gallois, B., Chevalier, J.M., Précigoux, G., Levi, S. and Arosio, P. (2004) Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser144Ala. *J Mol Biol.* 340:277-93.
- Langston, J.W., Ballard, P.A. Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med.* 309(5):310.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219(4587):979-80.
- Latunde-Dada, G.O., Shirali, S., McKie, A.T., Simpson, R.J., Peters, T.J. (2004) Effect of transition metal ions (cobalt and nickel chlorides) on intestinal iron absorption. *Eur J Clin Invest.* 34(9):626-30.
- Lee, H.J., Shin, S.Y., Choi, C., Lee, Y.H., Lee, S.J. (2002) Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem.* 277(7):5411-7.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-4060
- Leggett, B. A., Fletcher, L. M., Ramm, G. A., Powell, L. W. and Halliday, J. W. (1993) Differential regulation of ferritin H and L subunit mRNA during inflammation and long-term iron overload. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8: 21-7.
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P. and Drysdale, J. (2001) A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem.* 276: 24437-40.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 278(10):8516-25.
- Li, Z., Lai, Z., Ya, K., Fang, D., Ho, Y.W., Lei, Y., Ming, Q.Z. (2008) Correlation between the expression of divalent metal transporter 1 and the content of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxic HepG2 cells. *J Cell Mol Med.* 12(2):569-79.

- Liang, L.P., Patel, M. (2004) Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J Neurochem.* 90(5):1076-84.
- Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:352-6.
- Liu, X.S., Patterson, L.D., Miller, M.J. and Theil, E.C. (2007) Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of iron recovery from the ferritin mineral. *J Biol Chem.* 282:1821-1825.
- Lu, Z., Nie, G., Li, Y., Soe-Lin, S., Tao, Y., Cao, Y., Zhang, Z., Liu, N., Ponka, P., Zhao, B. (2009) Overexpression of mitochondrial ferritin sensitizes cells to oxidative stress via an iron-mediated mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 11(8):1791-803.
- Marsden, C.D. (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 19:121-41.
- Martins, E.A., Robalinho, R.L., Meneghini, R. (1995) Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Arch Biochem Biophys.* 316(1):128-34.
- Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, J.N., Coleman, P.D., Kozik, B., Bellinger, D.L., Rogers, J. (2009) Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 30(11):1805-17.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 5(2):299-309.
- Mehlhase, J., Sandig, G., Pantopoulos, K., Grune, T. (2005). Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic. Biol .Med.* 38, 276-285,
- Missirlis, F., Holmberg, S., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Rouault, T.A. and Law, J.H. (2006) Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:5893-8.
- Moos, T. and Morgan, E.H. (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann NY and Acad Sci.* 1012:14-26.
- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R. (1995) Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(2):109-22.
- Muchowski, P.J., Wacker, J.L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci.* 6(1):11-22.
- Muckenthaler, M., Richter, A., Gunkel, N., Riedel, D., Polycarpou-Schwarz M., Hentze S. and col. (2003) Relationships and distinctions in iron-regulatory networks responding to interrelated signals. *Blood* 101: 3690–98.
- Mueller, S., Pantopoulos, K., Hübner, C.A., Stremmel, W., Hentze, M.W. (2001) IRP1 activation by extracellular oxidative stress in the perfused rat liver. *J Biol Chem.* 276(25):23192-6.

- Napier, I., Ponka, P. and Richardson, D.R. (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*. 105:1867-74.
- Nicklas, W.J., Youngster, S.K., Kindt, M.V., Heikkila, R.E. (1987) MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci*. 40(8):721-9.
- Nie, G., Sheffel, A.D., Kim, S.F. and Ponka, P. (2005) Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. *Blood*. 105:2161-7.
- Nie, G., Chen, G., Sheffel, A.D., Pantopoulos, K., Ponka, P. (2006) In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood*. 108(7):2428-34.
- Núñez, M.T., Núñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Mazariegos, D., Arredondo, M., Mura, C. and Maccioni, R.B. (2003) Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. *Biometals*. 16:83-90.
- Núñez, M.T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J., Speisky, H. (2004). Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med*. 37, 953-960.
- Núñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Maccioni, R.B., Núñez, M.T. (2002) An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *J Neurochem*. 82(2):240-8.
- Nussbaum, R.L., Ellis, C.E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 348(14):1356-64.
- Olanow, C.W. (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord*. 22 Suppl 17:S335-42.
- Pöhlman, S., Hoehner, J.C., Nånberg, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Johansson I, Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E., et al. (1995) Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 31A(4):453-8.
- Pandolfo, M. (2002). Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 2(1-2):87-93.
- Papanikolaou, G. and Pantopoulos, K. (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 202:199-211.
- Petrat, F., Rauen, U., de Groot, H. (1999) Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology*. 29(4):1171-9.
- Petrat, F., de Groot, H., Rauen, U. (2001) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem J*. 356(Pt 1):61-9.
- Petrat, F., Weisheit, D., Lensen, M., de Groot, H., Sustmann, R., Rauen, U. (2002) Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J*. 362(Pt 1):137-47.

- Phillips, J.D., Kinikini, D.V., Yu, Y., Guo, B., Leibold, E.A. (1996) Differential regulation of IRP1 and IRP2 by nitric oxide in rat hepatoma cells. *Blood*. 87(7):2983-92.
- Pietsch, E.C., Hurley, A.L., Scott, E.E., Duckworth, B.P., Welker, M.E., Leone-Kabler, S., Townsend, A.J., Torti, F.M., Torti, S.V. (2003) Oxathiolene oxides: a novel family of compounds that induce ferritin, glutathione S-transferase, and other proteins of the phase II response. *Biochem Pharmacol*. 65(8):1261-9.
- Presgraves, S.P., Ahmed, T., Borwege, S., Joyce, J.N. (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res*. 5(8):579-98.
- Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., Priyadarshi, S.S. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*. 2001, 86(2):122-7.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*. 27(2):181-6.
- Richardson, D.R. and Ponka, P. (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1331:1-40.
- Rouault, T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2: 406-14.
- Rustin, P., von Kleist-Retzow, J.C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A., Rötig, A. (1999) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*. 354(9177):477-9.
- Salazar, J., Mena, N., Núñez, M.T. (2006) Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. (71):205-13.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L.M., Nuñez, M.T., Garrick, M.D., Raisman-Vozari, R., Hirsch, E.C. (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(47):18578-83.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., Marsden, C.D. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 54(3):823-7.
- Scotcher, K.P., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, J.W., Di Monte, D. (1990) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes. *J Neurochem*. 54(4):1295-301.
- Shang, T., Kotamraju, S., Kalivendi, S.V., Hillard, C.J., Kalyanaraman, B. (2004) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric-oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem*. 279(18):19099-112.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Greenamyre, J.T. (2001) Pesticides and Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal*. 1:207-8.

- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., Greenamyre, J.T. (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*. 179(1):9-16.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., Youdim, M.B. (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm*. 74(3):199-205.
- Spencer, J.P., Jenner, A., Aruoma, O.I., Evans, P.J., Kaur, H., Dexter, D.T., Jenner, P., Lees, A.J., Marsden, D.C., Halliwell, B. (1994) Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett*. 353(3):246-50.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6469–6473.
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T., Kishi, F. (2000) Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J Biol Chem*. 275(29):22220-8.
- Talpade, D.J., Greene, J.G., Higgins, D.S. Jr, Greenamyre, J.T. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem*. 75(6):2611-21.
- Torti, F.M. and Torti, S.V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 99:3505-16.
- Tsuji, Y., Ayaki, H., Whitman, S.P., Morrow, C.S., Torti, S.V., Torti, F.M. (2000) Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 20(16):5818-27.
- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L. (2001) Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 500(3):105-8.
- Wang, X., Ghio, A.J., Yang, F., Dolan, K.G., Garrick, M.D., Piantadosi, C.A. (2002) Iron uptake and Nramp2/DMT1/DCT1 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282(5):L987-95.
- Wardman, P. and Candeias, L.P. (1996) Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*. 145:523-31.
- White, K. and Munro, H. N. (1988) Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J. Biol. Chem*. 263: 8938–42.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet*. 8(3):425-30.
- Wu, L.J., Leenders, A.G., Cooperman, S., Meyron-Holtz, E., Smith, S., Land, W., Tsai, R.Y., Berger, U.V., Sheng, Z.H. and Rouault, T.A. (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res*. 1001:108-17.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of premicroRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016
- Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., Yehuda, S. and Riederer, P. (1990) The role of iron in the basal ganglion. *Adv Neurol*. 53:155-62.
- Zanella, I., Derosas, M., Corrado, M., Cocco, E., Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Verardi, R., Arosio, P. (2008) The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim Biophys Acta*. 1782(2):90-8.
- Zancani, M., Peresson, C., Biroccio, A., Federici, G., Urbani, A., Murgia, I., Soave, C., Micali, F., Vianello, A. and Macrì, F. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem*. 271:3657-64.
- Zhang, D.D. (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*. 38(4):769-89.
- Zanninelli, G., Loréal, O., Brissot, P., Konijn, A.M., Slotki, I.N., Hider, R.C., Ioav Cabantchik, Z. (2002) The labile iron pool of hepatocytes in chronic and acute iron overload and chelator-induced iron deprivation. *J Hepatol*. 36(1):39-46.
- Zanninelli, G., Glickstein, H., Breuer, W., Milgram, P., Brissot, P., Hider, R.C., Konijn, A.M., Libman, J., Shanzer, A., Cabantchik, Z.I. (2002) Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol Pharmacol*. 51(5):842-52.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R. and Crichton, R.R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 5:863-73.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B. R. (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J* 24, 138-148
- Zheng, M., Storz, G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*. 59(1):1-6