

UCH-FC  
JOC-BIEN  
M534  
C.A

Examen de grado 12/4/2011.

**“Efectos de la inhibición del complejo I sobre la homeostasis del hierro mitocondrial, implicancias en la enfermedad de Parkinson”**



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

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y  
Neurociencias**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Natalia Paz Mena Jiménez**

**Abril 2011**

**Director de Tesis Dr. Marco Tulio Núñez**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

**NATALIA PAZ MENA JIMÉNEZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendida el día 18 de Enero del año 2011.

Director de Tesis:  
Dr. Marco Tulio Núñez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marco Tulio Núñez", positioned above a horizontal dotted line.

Co-Director de Tesis  
Dr. Etienne Hirsch

A horizontal dotted line intended for the signature of Dr. Etienne Hirsch.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Virginia Fernández

Dr. Mauricio González

Dr. Juan Segura

Dr. Hernan Speisky

A collection of handwritten signatures in blue ink for the thesis evaluation committee. The signatures are stacked vertically, with each one positioned above a horizontal dotted line. The names are partially legible as "Virginia Fernández", "Mauricio González", "Juan Segura", and "Hernan Speisky".

***Dedicada a Raúl y Francisca***

## AGRADECIMIENTOS



Primero que todo quisiera agradecer al Doctor Marco Tulio Núñez por el enorme apoyo y confianza que tuvo en mí, por darme la oportunidad siempre de realizar mis ideas y creer en ellas. Y por la gran sabiduría con la que ha guiado mi formación científica.

Quiero también agradecer al Doctor Etienne Hirsch, director y jefe del laboratorio de neurodegeneración, del hospital de la Salpêtrière, Paris, Francia por todo el apoyo y por las contribuciones realizadas a esta tesis.

A los miembros de su laboratorio: el Dr. Stéphane Hunot, Dra. Anne Laure Bulteau, Dr. Patrick Michelle, Dra. Rita Raisman, Dr. Christian Lobsinger, Dr. Eric Kremer, Laure Ginestet y Amaury Bakaert, por su gran ayuda y colaboración en la realización de esta tesis.

A Julio Salazar por el apoyo, por ser un equipo y por su amistad.

Agradezco a los integrantes del laboratorio del doctor Marco Tulio Núñez, a todos los que desde el principio estuvieron conmigo, siendo parte esencial en la realización de esta tesis: Alejandro Rojas, Victoria Tapia, Pabla Aguirre, Pablo Muñoz, Dora Mazariegos, Patricia Muñoz, Claudia Núñez, Viviana Gallardo, Raúl Araya, Andrés Esparza, Nicole Diemer, Carolina Carriel, Carolina Garri, Carol San

Martín, Pamela Valdés, Daniela Sandoval, Pamela Urrutia, Daniel Borquez, Francisco Gómez y Carlos Fuentealba.

Gracias a mis mejores amigos el Cato (Alejandro Rojas) y la Tuti (Susana Valenzuela), eternos amigos de vida y estudio. Y a las bellas familias que tienen.

A mis grandes amigos de carrera: el Richi, Caroca, Felipe, Nacho, Marcos, Dani y Pilar por su amistad.

A mis amigos del doctorado, por ser el mejor grupo que se puede querer para esta etapa: Sharo, Paula, Carola, Lupe, Richy, Undu y Leo. Todos Grandes Doctores.

A mis padres Raúl Mena y Eugenia Jiménez por su incondicional amor, apoyo y enorme dedicación.

A mis hermanos Raúl y Francisca por su inmenso amor y por lo mucho que me han enseñado.



# INDICE DE CONTENIDO



<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Enfermedad de Parkinson: historia	1
1.2. Definición general de la enfermedad de Parkinson	1
1.3. Enfermedad de Parkinson y degeneración del sistema nigro-estriatal	3
1.4. Terapia	6
2. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson	6
3. Eventos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra	7
3.1. La disfunción mitocondrial	7
3.2. Aumento de hierro en la enfermedad de Parkinson	9
3.3. Agregación de proteínas y disfunción del sistema ubiquitina proteasoma (UPS)	10
3.4. La inflamación dada por las células gliales	11
4. Metabolismo celular del hierro	11
4.1. Metabolismo del hierro mitocondrial: núcleos hierro-azufre	12
4.2. Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro mitocondrial	14
4.3. El hierro como productor de especies reactivas del oxígeno	17
5. ¿Por qué relacionar la disfunción mitocondrial (mediada por una inhibición del complejo I) y el metabolismo del hierro mitocondrial?	18
5.1. Efectos de la disminución de los niveles de ATP	19
5.2. Efectos del aumento del nivel de estrés oxidativo	19
6. Enfermedad incidental de cuerpos de Lewy	22
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	23
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	24
1. Determinar el efecto de rotenona sobre la actividad del complejo I mitocondrial y la producción de ATP	24
1.1. Estudio de dosis-respuesta	24
1.2. Determinar el efecto de rotenona sobre la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, en células SH-SY5Y	24
1.2.1. Determinar el efecto de rotenona sobre proteínas mitocondriales: mitoferrina, frataxina, glutaredoxina 2, heat shock protein-70, proteína ABC-B7	24
1.2.2. Determinar el efecto de rotenona sobre proteínas citosólicas: DMT-1 y ferroportina	24
1.3. Determinar el efecto de rotenona sobre los niveles de hierro en células SH-SY5Y	24
1.3.1. Determinar los niveles del pool de hierro lábil mitocondrial	24
1.3.2. Determinar los niveles del LIP citosólico	24

1.4.	Determinar el efecto de rotenona sobre la actividad de enzimas que contienen núcleos hierro-azufre en su estructura	24
1.4.1.	Determinar la actividad de la enzima aconitasa citosólica	24
1.4.2.	Determinar la actividad de la enzima aconitasa mitocondria	25
1.4.3.	Determinar la actividad de la enzima xantina oxidasa	25
1.4.4.	Determinar el grado de maduración de la enzima glutamina Fosforibosil pirofosfato amidotransferasa	25
1.5.	Determinar la integridad del núcleo Fe-S de la enzima aconitasa mitocondrial, en células SH-SY5Y tratadas con rotenona	25
1.6.	Determinar el efecto de rotenona sobre la producción de radicales libres, estrés oxidativo y defensas antioxidantes	25
1.6.1.	Determinar los niveles de producción de superóxido	25
1.6.2.	Determinar el grado de carbonilación de proteínas	25
1.6.3.	Determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, Cu/Zn SOD y MnSOD	25
2.	Evaluación de la participación del transportador mitoferrina, en el aumento del hierro mitocondrial en la enfermedad de Parkinson	
2.1.	Producción de un miARN para mitoferrina y evaluación de su efecto sobre el contenido de hierro y la viabilidad celular	25
2.2.	Determinar los cambios de expresión de mitoferrina en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (intoxicación con MPTP)	25
2.3.	Determinar los cambios de expresión de mitoferrina en tejido Post mortem de pacientes con la enfermedad de Parkinson, versus individuos controles	25
2.4.	Producción de un virus con un microARN para mitoferrina para ser testeado en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (intoxicación con MPTP)	26
2.5.	Determinar el nivel de transducción del virus producido, en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson	26
2.6.	Determinar el efecto de la disminución de mitoferrina sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, en ratones inyectados con el virus	26
<b>MATERIALES</b>		27
1.	Material biológico	27
1.1.	Células	27
1.2.	Medio de cultivo celular	27
1.3.	Animales	27
1.4.	Material post mortem	27
2.	Material químico	28
2.1.	Anticuerpos	29
2.2.	Radioisótopos	30
2.3.	Reactivos químicos generales	30
3.	Biología molecular	31
3.1.	Enzimas de restricción	31
3.2.	Enzimas adicionales	31
4.	Equipos	31





## MÉTODOS

1.	Cultivo celular	33
2.	Medición de la actividad del complejo I mitocondrial	33
3.	Medición de los niveles de ATP	34
4.	Medición del pool de hierro reactivo mitocondrial y citosólico	34
5.	Extractos celulares y análisis por western blot	36
5.1.	Extracto celular total	36
5.2.	Extracción mitocondrial	36
5.3.	Western blot y cuantificación	37
6.	Ensayo de EMSA	37
7.	Espectroscopia de absorción atómica	38
8.	Modelo animal de la enfermedad de Parkinson: intoxicación con 1-metil-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	38
9.	Morfología: Inmunohistoquímica	39
10.	Western blot de tejido humano	39
11.	Análisis de imágenes y conteo celular	39
12.	Medición del grado de carbonilación en proteínas	40
13.	Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa	40
14.	Gel de isoelectroenfoque	41
15.	Medición de la producción de superóxido	41
16.	Medición de la actividad de la enzima xantina oxidasa	41
17.	Medición de la actividad de la enzima aconitasa	41
18.	Ensayo de viabilidad celular	42
19.	Clonación de un miARN para mitoferrina	42
20.	Diseño de un virus que lleva una secuencia interferente para el transportador mitoferrina	43
21.	Inyecciones estereotáxicas con el vector viral	45
22.	Metodología utilizada para la inyección estereotáxica viral, intoxicación con MPTP y conteo de neuronas dopaminérgicas	45
23.	Análisis estadístico	46

## RESULTADOS

1.	Efecto de rotenona sobre la actividad del complejo I mitocondrial y la producción de ATP	4
2.	Efecto de rotenona y hierro sobre la expresión del transportador de hierro mitocondrial mitoferrina	47
3.	Medición de los niveles del pool de hierro lábil mitocondrial y citoplasmático, en células SH-SY5Y tratadas con rotenona	48
4.	Efecto de rotenona sobre la expresión de frataxina, chaperona mitocondrial del hierro	50
5.	Efecto de rotenona sobre la expresión del transportador ABC-B7	50
6.	Efecto de rotenona sobre la expresión de las proteínas glutaredoxina 2 y HSP70	51



7.	Efecto de rotenona sobre la expresión de los transportadores DMT-1 y ferroportina	53
8.	Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima aconitasa citosólica en células SH-SY5Y	56
9.	Efecto de rotenona sobre la actividad de la proteína aconitasa mitocondrial en células SH-SY5Y	58
10.	Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima xantina oxidasa y la estructura de glutamina fosforibosilpírofosfato amidotransferasa en células SH-SY5Y	62
11.	Efecto de rotenona sobre la producción de superóxido en células SHSY5Y	65
12.	Efecto de rotenona sobre la carbonilación de proteínas mitocondriales en células SH-SY5Y	66
13.	Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa	67
14.	Efecto de MPTP sobre la expresión de mitoferrina en mesencéfalo de ratones	70
15.	Determinar la expresión de mitoferrina en neuronas dopaminérgicas de ratones intoxicados con MPTP	72
16.	Determinar la expresión de mitoferrina en pacientes con la enfermedad de Parkinson	73
17.	Determinar el efecto knockdown de la expresión de mitoferrina en la viabilidad y contenido de hierro en células SH-Y5Y	74
18.	Producción de un virus con una secuencia interferente para mitoferrina	76
19.	Medición de la efectividad del virus producido	77
<b>DISCUSIÓN</b>		82
1.	Disfunción mitocondrial y enfermedad de Parkinson	82
2.	Efectos de la inhibición del complejo I mediada por rotenona, en la homeostasis del Fe	83
3.	¿Evento primario: mitocondria o citosol?	86
3.1.	La mitocondria como el lugar inicial de la desregulación	86
3.2.	El citosol como el lugar inicial de la desregulación	87
4.	Inhibición del complejo I mitocondrial y estrés oxidativo	92
5.	Análisis del rol de mitoferrina en la enfermedad de Parkinson	94
<b>CONCLUSIONES</b>		96
<b>PROYECCIONES A FUTURO</b>		98
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		99



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Características de los individuos controles y pacientes con la enfermedad de Parkinson analizados	28
-----------------	---	----



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Comparación de la SNpc de un paciente con la enfermedad de Parkinson y un individuo sano (control)	2
<b>Figura 2.</b>	Circuito nigro-estriatal	4-5
<b>Figura 3.</b>	Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro mitocondrial	16
<b>Figura 4.</b>	Metodología utilizada para la medición del LIP mitocondrial y citosólico	35
<b>Figura 5.</b>	Vectores y metodología utilizada para la producción de un virus que lleva una secuencia interferente para mitoferrina	44
<b>Figura 6.</b>	Metodología utilizada para las inyecciones virales e intoxicación con MPTP	46
<b>Figura 7.</b>	Rotenona produce una baja en la actividad del complejo I y en los niveles de ATP mitocondrial en células SH-SY5Y	47
<b>Figura 8.</b>	La expresión de mitoferrina responde a concentraciones de rotenona y hierro, en células SH-SY5Y	49
<b>Figura 9.</b>	La expresión de frataxina responde a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y	51
<b>Figura 10.</b>	Expresión de ABC-B7 en células SH-SY5Y tratadas con rotenona	52
<b>Figura 11.</b>	Glutaredoxina 2 y HSP-70 responden a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y	53
<b>Figura 12.</b>	DMT-1 y ferroportina responden a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y	54
<b>Figura 13.</b>	Rotenona afecta la actividad de la enzima aconitasa citosólica	58



<b>Figura 14.</b> Rotenona afecta la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial	59
<b>Figura 15.</b> Rotenona afecta la integridad del núcleo Fe-S de la enzima aconitasa mitocondrial	60
<b>Figura 16.</b> Rotenona afecta la integridad del núcleo Fe-S de la enzima xantina oxidasa	62
<b>Figura 17.</b> Rotenona afecta la maduración de la enzima GPAT	63
<b>Figura 18.</b> Rotenona produce un aumento en los niveles de superóxido en células SH-SY5Y	65
<b>Figura 19.</b> Rotenona produce un aumento en la carbonilación de proteínas mitocondriales en células SH-SY5Y	66
<b>Figura 20.</b> Rotenona produce un aumento en la actividad de la enzima MnSOD en células SH-SY5Y	67
<b>Figura 21.</b> Modelo propuesto: secuencia de eventos que llevan a la muerte neuronal según los resultados obtenidos en células SH-SY5Y tratadas con rotenona	69
<b>Figura 22.</b> MPTP produce un aumento en la expresión del transportador mitoferrina en mesencéfalo de ratones intoxicados	71
<b>Figura 23.</b> MPTP produce un aumento en la expresión del transportador mitoferrina en neuronas dopaminérgicas de ratones intoxicados	72
<b>Figura 24.</b> Mitoferrina se encuentra sobre expresada en sustancia negra de pacientes con la enfermedad de Parkinson	73
<b>Figura 25.</b> Efecto de un miARN interferente para mitoferrina sobre la viabilidad celular y el contenido de hierro mitocondrial	75
<b>Figura 26.</b> Transducción del virus que lleva una secuencia interferente para mitoferrina (CAV-GFP-miMtn) en sustancia negra de ratones	77
<b>Figura 27.</b> Mitoferrina disminuye significativamente su expresión en Ratones inyectados con el virus CAV-GFP-miMtn	78
<b>Figura 28.</b> La disminución de la expresión de mitoferrina protege de la muerte neuronal en ratones intoxicados con MPTP	80

## LISTA DE ABREVIATURAS



<b>6-OHDA</b>	6 Hidroxi dopamina
<b>AF</b>	Ataxia de Friedreich
<b>ABC-B7</b>	Proteína de unión a ATP-B7 (ATP Binding Cassette B7)
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BCA</b>	Ácido bicincolínico
<b>CA</b>	Calceína
<b>CO<sub>3</sub><sup>•-</sup></b>	Radical carbonato
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DMT1</b>	Transportador de Metales Divalentes 1
<b>DMEM</b>	Medio Mínimo Esencial Dulbeco
<b>eGP</b>	Globo pálido externo
<b>Em</b>	Emisión
<b>EMSA</b>	Ensayo de cambio de movilidad electroforética (electrophoretic mobility shift assay)
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>Ex</b>	Excitación
<b>Fe</b>	Hierro
<b>Fe<sup>55</sup></b>	Isótopo hierro 55
<b>Fe<sup>+2</sup></b>	Hierro ferroso
<b>Fe<sup>+3</sup></b>	Hierro férrico
<b>Fe-S</b>	Núcleo hierro azufre



<b>FP</b>	Ferroportina
<b>Ftx</b>	Frataxina
<b>Grx2</b>	Glutaredoxina 2
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxido de hidrógeno
<b>HSP-70</b>	Proteína de choque térmico-70 (Heat Shock Protein-70).
<b>ILBD</b>	Enfermedad Incidental de cuerpos de Lewy (Incidental Lewy Body disease)
<b>IGP</b>	Globo Pálido Interno
<b>iNOS</b>	Oxido Nítrico Sintasa inducible
<b>IRE</b>	Elemento de Respuesta a Hierro
<b>IRP</b>	Proteína Reguladora del Hierro
<b>LBD</b>	Enfermedad de cuerpos de Lewy ( <i>Lewy Body Disease</i> )
<b>LIP</b>	Pool de hierro lábil (Lábil Iron Pool)
<b>MAO-B</b>	Monoamina Oxidasa-B
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>Mtfn</b>	Mitoferrina
<b>MPP+</b>	1-metil-4-fenil piridinio
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina
<b>MTT</b>	(3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilterazolium bromido)
<b>NMR</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	Dióxido de Nitrógeno
<b>NO</b>	Oxido Nítrico

<b>NST</b>	Núcleo Subtalámico
<b>OH·</b>	Radical Hidroxilo
<b>ONOOH</b>	Acido Peroxinitroso
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PET</b>	Tomografía de Emisión de Positrones
<b>RNS</b>	Especies Reactivas del Nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
<b>RPA</b>	Rhodamine B- [(1,10-phenanthroline-5-yl) amino carbonyl] benzyl ester
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SN</b>	Sustancia Negra
<b>SNpc</b>	Sustancia Negra Pars Compacta
<b>SNpr</b>	Sustancia Negra Pars Reticulata
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>MnSOD</b>	Manganeso Superóxido Dismutasa
<b>Cu/ZnSOD</b>	Cobre/Zinc Superóxido Dismutasa
<b>S<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ion sulfúro
<b>STN</b>	Núcleo Subtalámico
<b>Tf</b>	Transferrina
<b>TfR</b>	Receptor de transferrina
<b>UCHL-1</b>	Esterasa terminal Ubiquitina Carboxilo L1
<b>UPS</b>	Sistema Ubiquitina Proteasoma
<b>XLSA/A</b>	Anemia Sideroblástica Asociada al Cromosoma X con Ataxia



## RESUMEN



La enfermedad de Parkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa más común del movimiento, caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas remanentes. Entre los síntomas de la enfermedad se encuentran: rigidez muscular, temblor y una lentitud en los movimientos físicos (bradiquinesia). La prevalencia de la enfermedad es de 1% en la población mayor a 60 años de edad (de Rijk y col., 1997, 2000). El tratamiento con levodopa produce una notable mejoría de los síntomas y de la calidad de vida. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan resistencia y efectos secundarios (Rascol y col., 2002, 2003, 2006; Thanvi y col., 2007). Por lo cual, es crítico comprender los eventos bioquímicos y moleculares que conllevan a la progresión de la enfermedad. A pesar de que la etiología de la EP es desconocida, estudios realizados en modelos animales y post-mortem en tejidos de pacientes con la EP, entregan evidencias claras de la existencia de cuatro eventos implicados en la neurodegeneración: (1) disfunción mitocondrial, (2) estrés oxidativo, relacionado con el aumento del hierro celular y la disminución de los niveles de glutatión, (3) inflamación dada por las células gliales y (4) alteración del sistema ubiquitina-proteasoma. En esta tesis postulamos la siguiente hipótesis: *En un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, la inhibición del complejo I mitocondrial altera la homeostasis del hierro citosólico y mitocondrial, induciendo su acumulación y contribuyendo a la muerte de las neuronas dopaminérgicas.*

Para probar esta hipótesis, utilizamos como modelos experimentales de la EP, la línea de células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico, ratones intoxicados con 1-metil-4-fenil -1, 2, 3, 6- tetrahidropiridina y tejido post-mortem de pacientes que padecieron la enfermedad. Nuestros resultados sugieren que la inhibición del complejo I produce significativos cambios en la expresión de proteínas del metabolismo del hierro mitocondrial y citosólico y que este aumento se correlaciona con niveles de hierro y estrés oxidativo. Se encontró también una relación entre esta inhibición y la actividad de proteínas que contienen núcleos hierro-azufre. Adicionalmente realizamos un análisis sobre la expresión de mitoferrina en modelos de la enfermedad de Parkinson, encontrándose en todos ellos un aumento en su expresión. Debido a esto es que analizamos el efecto de un micro-ARN para mitoferrina. Los resultados indicaron que una baja en su expresión, produce protección neuronal en un modelo in vivo de la enfermedad de parkinson.



## ABSTRACT

Parkinson Disease (PD) is the most common movement disorder, characterized by death of dopaminergic neurons of the Substance Nigra pars compact (SNpc) and the presence of Lewy bodies in remaining neurons. Clinically, PD is characterized by rigidity, tremor, bradykinesia and postural instability. The prevalence is 1% on the population over sixty years (de Rijk et al.,1997). Treatment with Levodopa produced a significant improvement in symptoms and quality of life. However, most patients develop resistance and side effects (Rascol et al; 2002, 2003, 2006; Thanvi et al., 2007). Thus, it is critical to clarify the biochemical and molecular events that lead to disease progression. Although the etiology of PD is unknown, studies in animals models and post-mortem tissue of patients with PD, give clear evidence of four events involved in neurodegeneration. These events are: (1) Mitochondrial dysfunction, (2) Oxidative stress, associated with increased of cellular iron and reduced glutathione levels, (3) Inflammation in glial cells, and (4) Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. In this thesis, we postulated the following hypothesis: *In a experimental model of PD, the inhibition of mitochondrial complex I alter the homeostasis of cytosolic and mitochondrial iron, inducing its accumulation and contributing to the death of dopaminergic neurons.* To test this hypothesis, we used three experimental models of PD: the neuroblastoma cell line SH-SY5Y differentiated to dopaminergic phenotype, mice intoxicated with MPTP, and post-mortem tissue of PD patients. In this work we found that an inhibition of complex I produces a significant changes in protein expression of mitochondrial and cytosolic iron metabolism, and this increase is correlated with iron levels and

oxidative stress. There was a relationship between this inhibition and the activity of proteins containing iron-sulfur cluster. Additionally we did an analysis of mitoferrin's expression in models of PD, we found an increased in its expression. Because of this we analyze the effect of micro-RNA on the expression of mitoferrina. The results indicated that a low expression of mitoferrin, which correlated with iron levels, produce neuronal protection an in vivo model of PD.

# 1. Introducción

## ***1.1 Enfermedad de Parkinson: historia***

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico, descrito en 1817 por el médico Inglés James Parkinson (1755-1824). En su monografía de 66 páginas: "Ensayo de la parálisis temblante", la describe como un síndrome caracterizado por la presencia de temblores, postura flexionada y parálisis (Parkinson, 1817). Setenta años más tarde en el hospital de la Salpetriere en Paris, Charcot ilustró que los pacientes afectados manifestaban rigidez, inestabilidad postural y lentitud en los movimientos, proponiendo el nombre de enfermedad de Parkinson, en lugar de parálisis temblante (Goetz, 1986a, 1986b). Hoy, al revisar la monografía de Parkinson, es notable el rigor de su investigación enfocada en solo 6 pacientes sin inspección neuropatológica, de la cual pudo describir las generalidades de la enfermedad. James Parkinson dio como explicación al fenómeno observado, una "alteración al funcionamiento de la médula espinal, que podría extenderse al bulbo". El gran mérito de Parkinson consistió en relacionar un conjunto de síntomas en una entidad común.

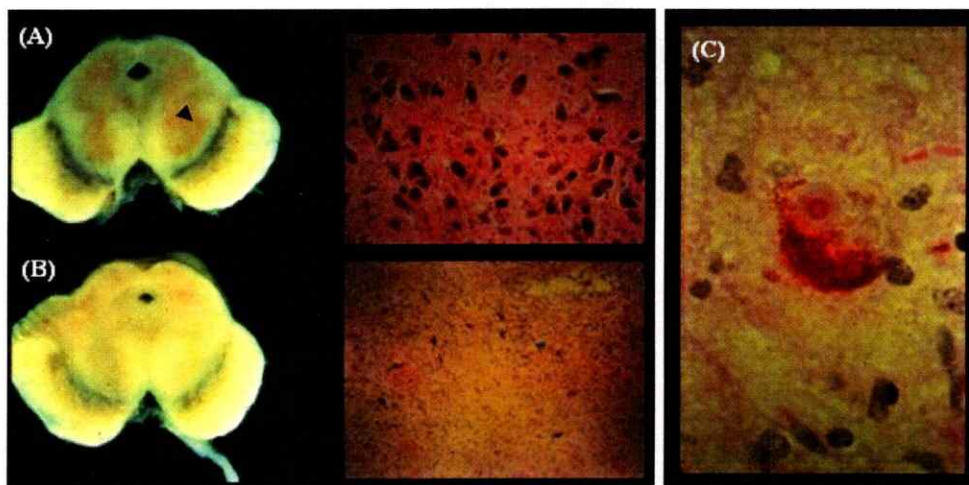
## ***1.2 Definición general de la enfermedad de Parkinson***

La EP es el desorden neurodegenerativo del movimiento más común en el mundo, se origina principalmente desde los 55 años de edad y su prevalencia es de 1 a 4% en las personas mayores a 60 y 80 años respectivamente (Nussbaum y Ellis, 2003). Sus marcadores patológicos son la pérdida de las neuronas

dopaminérgicas y la presencia de agregados proteicos, denominados cuerpos de Lewy en la SNpc de los pacientes afectados (Fahn, 2003), (Figura 1).

Clínicamente la enfermedad se caracteriza por: rigidez muscular, temblor, inestabilidad en la postura y una lentitud en los movimientos físicos (bradicinecia).

El 90% de los casos de la enfermedad tienen un origen desconocido, llamado Parkinson esporádico o idiopático. Sin embargo, existe un 10% de casos de tipo genético.



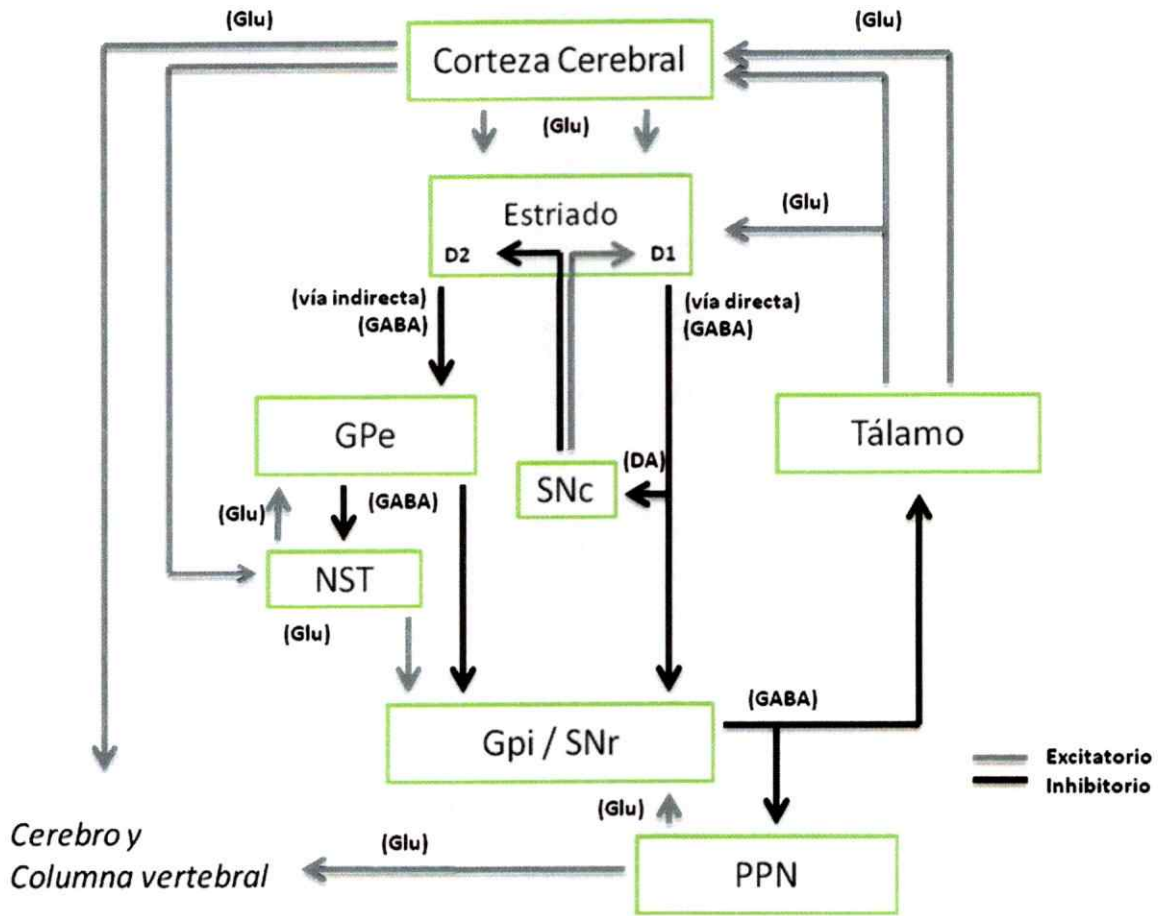
**Figura 1. Comparación de la SNpc de un paciente con la enfermedad de Parkinson y un individuo sano (control).** (A) Cerebro de un individuo sano, la estructura observada en negro corresponde a la SNpc, su color se debe a la neuromelanina presente en las neuronas dopaminérgicas, (punta de flecha negra). (B) Cerebro de un paciente con la EP, el color negro es mucho menos intenso, debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc (C) Cuerpos de Lewy, agregados proteicos característicos de la enfermedad.

### ***1.3 Enfermedad de Parkinson y degeneración del sistema nigro-estriatal***

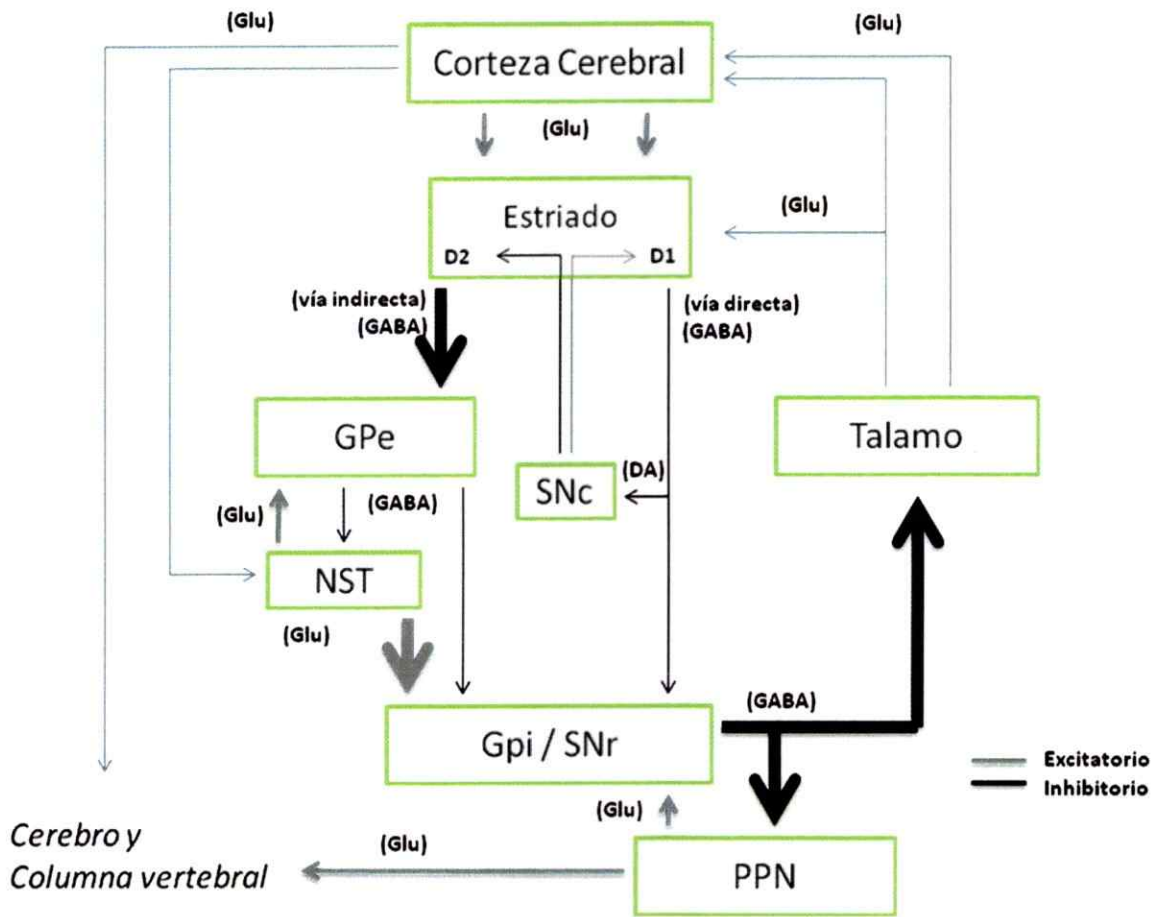
El síndrome motor asociado a la EP aparece luego de una pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo cual provoca un 60% de depleción de dopamina (DA) en el estriado (caudado-putamen) (Bernheimer y col., 1973). En condiciones normales, la señal de DA hacia el estriado modula la actividad de dos circuitos de los ganglios basales: (i) estimula la vía directa, inhibiendo la señal del núcleo basal como el Globus Pálido interno (iGP) y la sustancia negra pars-reticulata (SNpr); y (ii) inhibe la vía indirecta, que estimula el núcleo de salida, el Globus Pálido externo (GPe) y el Núcleo Subtalámico (NST) (Figura 2A). De esta forma, el resultado final de la modulación dopaminérgica es la reducción de un efecto inhibitorio en la zona tálamo cortical, produciéndose así los movimientos normales iniciados por la corteza.

En la EP, por el contrario, la depleción de la DA estriatal produce un aumento en la actividad del NST alterando la actividad de los ganglios basales, produciéndose los problemas del movimiento típicos de la enfermedad, (Figura 2B) (Bezard y col., 2001; Vila y col., 1997).

(A)



(B)



**Figura 2. Circuito nigro-estriatal.** (A) En un individuo sano: los niveles de DA son normales y modula mediante los neurotransmisores GABA y glutamato la respuesta del tálamo hacia la corteza, lo que produce una coordinación adecuada de los movimientos. (B) En un paciente enfermo: los niveles deficientes de DA producen un aumento en los niveles de GABA, lo que induce una fuerte inhibición del tálamo y esto a su vez una desregulación de las señales hacia la corteza, en consecuencia se produce una alteración de los movimientos voluntarios, típicos de la enfermedad. (Obtenido desde Stereotaxic surgery and deep brain stimulation for Parkinson's disease and movement disorders. In: Watts RL, Koller WC, eds. Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice. New York: McGraw-Hill, 1997:240).

## **1.4 Terapia**

Levodopa (L-dopa), un precursor del neurotransmisor DA, produce una notable mejoría de los síntomas y de la calidad de vida, sin embargo, esto es solo temporal, puesto que luego de 5 a 10 años de terapia los pacientes muestran nuevamente problemas posturales, problemas del habla, mayores disquinesias y psicosis. De esta forma, es crítico clarificar los eventos bioquímicos, moleculares y farmacológicos que conllevan a la progresión de la enfermedad.

## **2. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson**

Los modelos experimentales de la EP agrupan a animales con alteraciones genéticas y a toxinas que inducen un cuadro de síntomas similares a los de la enfermedad. Todos ellos juegan un papel crítico para responder las preguntas sobre los mecanismos y causas involucradas en la EP.

Los modelos más usados son el de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), toxina ambiental que causa un agudo e irreversible parkinsonismo (Aras y col., 1998; Przedborski y col., 1998; Smeyne y col., 2005) y el de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) (Simola y col., 2007; Iancu y col., 2005). El modelo de MPTP tiene una ventaja comparativa frente a los demás, debido a que en humanos y primates induce un síndrome virtualmente idéntico a la EP. La toxina produce inhibición del complejo I mitocondrial (Schapira y col., 1990), aumento del Fe redox-activo mitocondrial (Liang y col., 2004), aumento de estrés oxidativo celular (Przedborski y col., 1996), disminución de los niveles de glutatión (Ferraro y col., 1986), aumento del contenido de Fe total neuronal detectado por tinción de Perl's



(Mochizuki y col., 1994; Liang y col., 2004) y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Przedborski y col., 1996).

En estudios celulares, el modelo más utilizado es el compuesto químico rotenona, un derivado vegetal, que causa una inhibición específica del complejo I mitocondrial (Hoglinger y col., 2006; Gao y col., 2003; Perder y col., 2003).

### ***3. Eventos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra***

A pesar que la etiología de la EP es desconocida, los modelos experimentales de la enfermedad entregan evidencias claras de la existencia de cuatro eventos implicados en la neurodegeneración: i) disfunción mitocondrial, ii) aumento de hierro (Fe) (relacionado a un aumento de estrés oxidativo y disminución de los niveles de glutatión), iii) alteración del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y iv) inflamación, (Przedborski y col., 2003).

#### ***3.1 La disfunción mitocondrial***

Las evidencias de una disfunción mitocondrial en la EP comienzan en el año 1980, cuando 4 personas luego de una inyección intravenosa de drogas ilícitas, desarrollaron un marcado parkinsonismo. El posterior análisis de las sustancias inyectadas reveló en ellas la existencia de MPTP un potente inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Langston y col., 1983).

En las células gliales, el MPTP es convertido a su metabolito activo, el ion 1metil-4-fenil-1 piridinium (MPP+) por la enzima Monoamina Oxidasa B (MAO-B). Posteriormente, el MPP+ es selectivamente incorporado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT). Dentro de las neuronas, el MPP+ inhibe el complejo I mitocondrial (Mizuno y col., 1987). Entre los efectos producidos por esta inhibición se encuentran una disminución de los niveles de ATP (Scotcher y col., 1990) y un aumento en la producción de radicales libres y estrés oxidativo (Wong y col., 1999). Desde su descubrimiento, ratones y monos intoxicados con MPTP han sido utilizados como modelos experimentales de la EP.

Las evidencias de la disfunción mitocondrial en la enfermedad, han sido complementadas por el análisis de tejido post-mortem de las enzimas que participan en la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados mostraron una disfunción específica del complejo I en la SNpc de enfermos con la EP (Schapira y col., 1990). Adicionalmente, mutaciones en las proteínas mitocondriales PINK-1 y DJ-1 generan una forma genética de la EP, lo que plantea un importante papel de la mitocondria en la neurodegeneración (Bonifati y col., 2003 a y b; Valente y col., 2004; Blackinton y col., 2005).

El grupo de Greenamayer mostró, que la administración a ratas del inhibidor selectivo del complejo I, rotenona, desarrolla un síndrome similar a la EP, caracterizado por la degeneración neuronal y la formación de cuerpos de inclusión

ricos en alfa-sinucleína (Betarbet y col., 2000). De esta forma, es clara la relevancia de la disfunción mitocondrial en la EP.

### ***3.2 Aumento de hierro en la enfermedad de Parkinson***

Otro mecanismo implicado en la progresión de la enfermedad, corresponde al aumento del Fe celular. Los primeros estudios fueron realizados en tejido post-mortem, en los que se observó un incremento en los niveles de Fe en la SNpc de pacientes con la EP, en relación a controles (Sofic y col., 1988; Dexter y col., 1989; Hirsch y col., 1991). Este resultado fue posteriormente confirmado por estudios de NMR (Gorell y col., 1995; Berg y col., 1999) y en animales inyectados con MPTP (He y col., 2003). Adicionalmente estudios de resonancia de imagen magnética muestran una relación entre la acumulación de Fe y la severidad de la enfermedad (Schuff y col, 2009).

Apoyando un papel para el Fe en el desarrollo de la enfermedad, métodos farmacológicos que inducen un secuestro del metal, muestran una prevención de la neurotoxicidad inducida por el MPTP en ratones (Kaur y col., 2003). De forma similar, tratamientos con quelantes de Fe disminuyen la neurodegeneración producida por 6-OHDA en ratas (Youdim y col., 2004).

Los mecanismos celulares por los cuales podría estar ocurriendo este aumento no están claros. Al respecto, estudios de nuestro laboratorio indican que dos elementos del sistema homeostático del Fe están anormalmente activados en neuronas de la SNpc de ratas tratadas con 6-OHDA: el regulador post

transcripcional IRP1 y el transportador de entrada de Fe a la célula DMT-1 (Salazar y col., 2006, 2008). Dado que la actividad de ambas proteínas facilitan la incorporación del Fe a estas neuronas, nuestras observaciones ofrecen un posible correlato molecular entre estrés oxidativo, activación del regulador IRP1 y la acumulación de Fe observada en la enfermedad.

### ***3.3 Agregación de proteínas y disfunción del sistema ubiquitina proteasoma (UPS).***

La idea sobre el papel de la agregación de proteínas en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP, surge debido a la presencia de cuerpos de Lewy en la SNpc. Posteriormente toma más fuerza, cuando se identifica a alfa-sinucleína, principal componente de los agregados, como uno de los genes asociados al parkinson familiar (PARK1) (Polymeropoulos y col., 1997). La contribución de alfa-sinucleína a la EP proviene de estudios en que mutaciones en la proteína o su sobre expresión, favorecen la formación de protofibrillas tóxicas (Conway y col., 2000).

La relación entre el sistema UPS y la EP se basa en: (i) identificación de genes PARK, que codifican para proteínas como E3 ubiquitina ligasa, y UCHL-1 (PARK 5), una proteína involucrada en el reciclaje de ubiquitina; y (ii) la identificación de un déficit en la actividad de subunidades del proteasoma en la SNpc de pacientes con la EP (McNaught y col., 2006). La hipótesis general apunta a que la disrupción del sistema UPS promueve la acumulación tóxica de proteínas afectando la sobrevivencia neuronal.

### **3.4 La inflamación dada por las células gliales**

De manera similar a otras enfermedades neurodegenerativas, procesos inflamatorios acompañan a la muerte neuronal en la EP. Estos han sido detectados en la SNpc, estriado, y en cuerpos de Lewy de pacientes con EP (Hunot y Hirsch, 2003; Bertand y col., 1997).

La respuesta inflamatoria se observa en roedores intoxicados con MPTP, rotenona o posterior a la inyección estereotáxica con 6-OHDA (Liberatore y col., 1999; Sherer y col., 2003; Cicchetti y col., 2002). Evidencias de una menor incidencia de la EP en sujetos que utilizan drogas anti-inflamatorias no esteroideas, demuestran que la inflamación podría contribuir a la muerte neuronal. Este proceso ejerce su toxicidad por contribución a la producción de ROS/RNS, por activación de la iNOS en la microglia activada (Wu y col., 2003; Liberatore y col., 1999). Adicionalmente, Kim y colaboradores, mostraron que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc presentan mayor susceptibilidad a estímulos pro-inflamatorios, atribuibles al gran número de microglías residentes en esta región (Kim y col., 2000).

### **4. Metabolismo celular del hierro**

El Fe inorgánico proveniente de los alimentos es absorbido por los enterocitos del duodeno mediante el transportador de metales divalentes DMT-1. Posteriormente, el Fe abandona la célula vía ferroportina (FP), transportador ubicado en la membrana basolateral del enterocito. Una vez en el plasma sanguíneo, el Fe se une a transferrina que lo transporta a los diferentes órganos (Ghio y col., 2006; Garrick y col., 2009).

En neuronas, el Fe ingresa por endocitosis de transferrina (Moos y col., 2007) o directamente a través del transportador DMT-1. Ambas vías de entrada son operativas ya que la concentración de Fe en el líquido céfalo raquídeo (0,5-1,5  $\mu\text{M}$ ) a menudo sobrepasa la capacidad de unión de transferrina (0,6  $\mu\text{M}$ ). Una vez en el citoplasma el Fe puede formar parte del pool de Fe lábil (LIP) citosólico, dirigirse a la mitocondria o ser almacenado en ferritina (Mazariegos y col., 2006). Para entrar a la mitocondria, el Fe requiere del transportador mitoferrina (Mtfn), ubicado en la membrana interna de la mitocondria. Una vez en su interior el Fe es utilizado para la síntesis de los núcleos Fe-S, del Hemo o para ser almacenado en ferritina mitocondrial (Napier y col., 2005, Richardson y col., 2010).

#### ***4.1 Metabolismo del hierro mitocondrial: núcleos hierro-azufre***

El Fe es transportado a la mitocondria, debido a que es esencial para la síntesis del Hemo y la biogénesis de los núcleos hierro-azufre (Fe-S).

Los núcleos Fe-S son pequeños cofactores inorgánicos, de los que se cree son uno de los primeros catalizadores involucrados en la evolución de las macromoléculas. Hoy en día, son encontrados en todos los tipos de vida, siendo parte de una amplia gama de proteínas, estando además involucrados en una serie de funciones biológicas. Actúan como catalizadores en reacciones químicas, transportadores de electrones (cadena respiratoria mitocondrial), como sensores y estabilizadores de la estructura de proteínas. En eucariontes los más comunes son el [2Fe-2S] y el [4Fe-4S], formados por coordinaciones tetraédricas de grupos sulfuro con átomos de Fe (Lill y col., 2005, 2006, 2008; Rouault y col., 2005; Ye y

Rouault, 2010). En la mitocondria, proteínas como la NADH deshidrogenasa o complejo I, succinato deshidrogenasa o complejo II, citocromo c oxido reductasa o complejo III y aconitasa, entre otras, utilizan estos cofactores para su función. Los núcleos Fe-S también son exportados hacia el citosol para ser incorporados en proteínas citoplasmáticas que los requieran, tales como aconitasa mitocondrial, xantina oxidasa, glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa y proteínas nucleares involucradas en la reparación del ADN, (Martelli y col., 2007).

La biogénesis de los núcleos Fe-S de la mitocondria ha sido propuesta como un sensor de los niveles de Fe celular (Rouault y col., 2005). Adicionalmente, en humanos la pérdida de la función de proteínas involucradas en la biogénesis de los núcleos y su exporte, ha sido asociada a una desregulación del metabolismo del Fe citoplasmático, acumulación de Fe mitocondrial y manifestaciones clínicas como anemia y ataxia (Rouault y Tong, 2008; Camaschella y col., 2009; Sheftel y col., 2010).

#### **4.2 Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro mitocondrial**

Entre las proteínas mitocondriales involucradas en el metabolismo del Fe se encuentran mitoferrina, frataxina, el transportador ABC-B7, glutarredoxina 2 y HSP-70.

**Mitoferrina (Mtfn):** transportador de Fe ubicado en la membrana interna mitocondrial, encargado de su importe desde el citoplasma (Figura 3). Trabajos realizados en levaduras, determinaron que la alteración en su expresión se correlaciona con cambios en los niveles de Fe celular (Foury y col., 2002; Shakoury y col., 2004; Li y col., 2004). Mutantes en pez cebra y ratón para Mtfn presentan serias alteraciones en el metabolismo del Fe, produciendo individuos anémicos (Shaw y col., 2006).

**Frataxina (Ftx):** chaperona mitocondrial de Fe, cuya función es unir Fe y posteriormente entregarlo para la síntesis de los núcleos Fe-S (Figura 3) (Yoon y col., 2003; Bou y col., 2004). En levadura, una disminución en la expresión de la proteína Yfh1 (homólogo de Ftx), se asocia a una disminución en la síntesis de los núcleos Fe-S y a un aumento del Fe mitocondrial (Chen y col., 2002; Duby y col., 2002; Anderson y col., 2005). Mutaciones en el gen de Ftx, producen la enfermedad conocida como Ataxia de Friedreich (AF), la cual es causada por una expansión repetida del triplete GAA en el primer intrón del gen que codifica para la proteína, produciendo su pérdida de función. Estudios realizados en pacientes con AF mostraron un aumento del Fe mitocondrial y una alteración en la actividad de las enzimas que contienen núcleos Fe-S (Wilson y col., 2006).

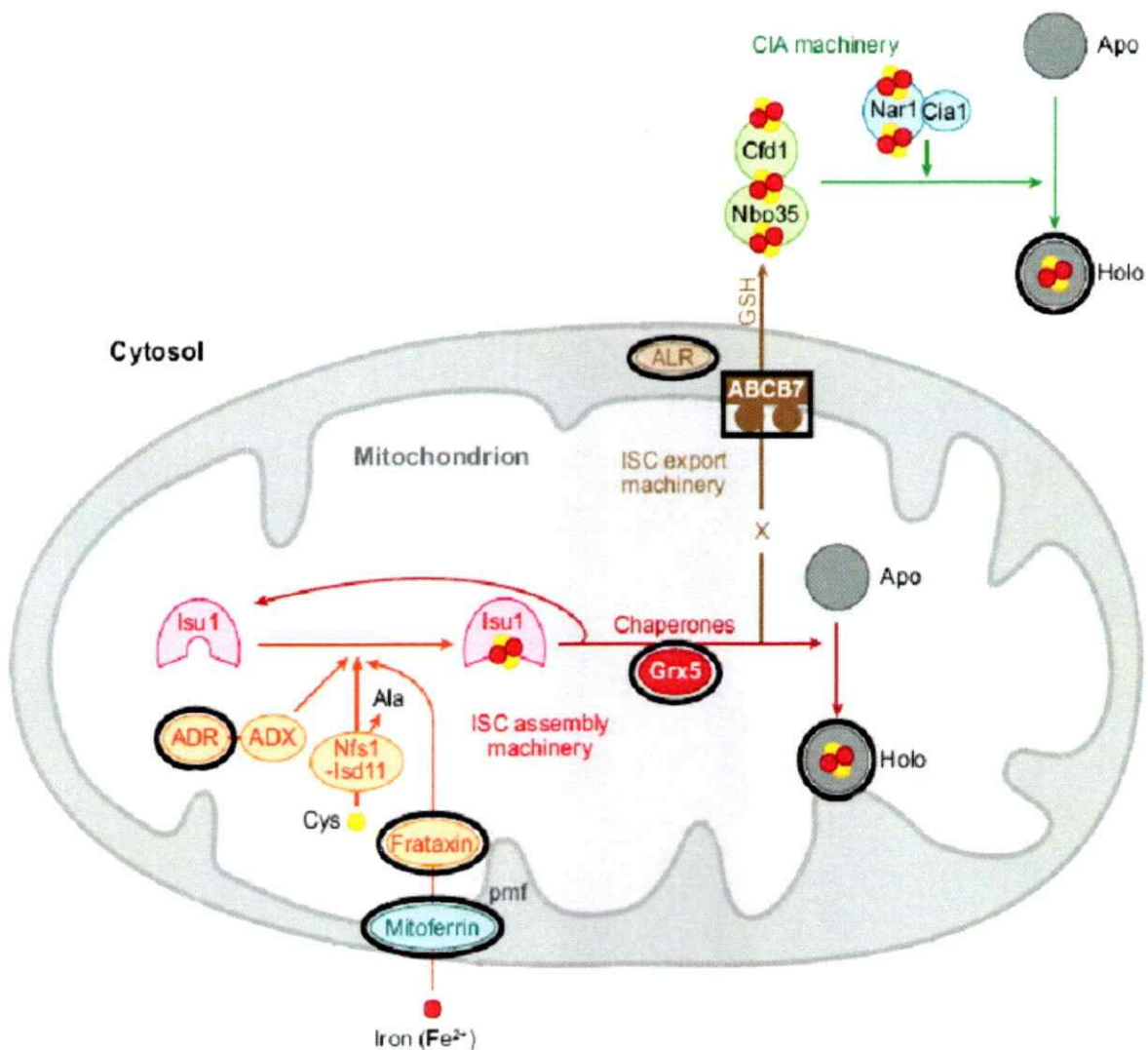


**Transportador ABC-B7:** proteína del tipo ABC (ATP binding cassette-B7), cuya función es transportar los núcleos Fe-S desde la mitocondria al citoplasma (Figura 3). Ratones que carecen del transportador, muestran una acumulación de Fe mitocondrial y una desregulación del ensamblaje de los núcleos Fe-S citosólicos, como IRP1, sin observar cambios en las proteínas mitocondriales que presentan núcleos (Pondarre y col., 2006).

En humanos, mutaciones en el transportador producen la enfermedad denominada anemia sideroblástica asociada al cromosoma x con ataxia (XLSA/A). En la cual, los pacientes muestran una acumulación de Fe en la mitocondria (Pondarre y col., 2007).

**Glutaredoxina 2 (Grx2):** proteína de bajo peso molecular, ubicada en la matriz mitocondrial. Existen dos hipótesis referentes a su función: (i) proteína encargada del ensamblaje del núcleo Fe-S en la apo-proteína (ii) enzima con actividad tioreductasa que regula el estado redox de proteínas de la maquinaria de ensamblaje de los núcleos, por modificación de residuos de cisternas, usando como dador de electrones glutatión reducido (GSH) (Rouhier y col; 2010), (Figura 3).

**HSP-70:** proteína regulada por shock térmico, ubicada en la matriz mitocondrial. Su función es ser una proteína chaperona que ayuda al ensamblaje de los núcleos Fe-S en la apo-proteína, (Figura 3), (Wiedemann y col., 2006; Adam y col., 2006; Schilke, 2006).



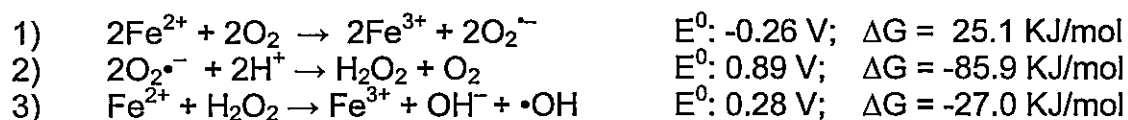
**Figura 3. Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro mitocondrial.**

Inicialmente el Fe es transportado desde el citosol a la matriz mitocondrial por el transportador Mtfn. El Fe incorporado es tomado por Ftx quien lo entrega a una proteína andamio denominada Isu1. Isu1, que previamente ha captado el azufre (S) proveniente de una cisteína desulfurasa, liga Fe y forma el núcleo Fe-S. Posteriormente, éste es tomado por chaperonas (HSP-70) y glutaredoxinas (Grx2), las que lo entregan a las apo-proteínas mitocondriales que lo necesitan. Adicionalmente, el núcleo puede ser transportado por ABC-B7 hacia el citosol, para ser incorporado a enzimas citosólicas (obtenido desde Lill y Muhlenhoff; 2008).

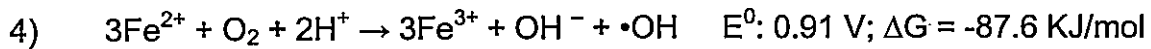
### 4.3 El hierro como productor de especies reactivas del oxígeno

En el contexto de la hipótesis que señala al Fe como un factor importante dentro de la patogénesis de la EP, el estrés oxidativo generado por éste es un factor fundamental a considerar (Halliwell y col., 2006). El estrés oxidativo corresponde al desbalance entre la producción de especies pro-oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidantes, a favor de los primeros (Halliwell y col., 1992).

El hecho que el Fe esté involucrado en la producción de especies reactivas, se debe a su capacidad de aceptar o donar un electrón, produciendo radicales libres capaces de dañar ADN, proteínas y lípidos (Halliwell y col., 1992; 1998; Britton y col., 2002). El Fe contribuye a la generación de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), en un conjunto de reacciones conocidas como Haber-Weiss y Fenton (Walling y col., 1998; Burkitt y col., 2003).



Estas tres reacciones conforman la base de la relación Fe/ROS en ambientes intracelulares. Su acoplamiento resulta en la reacción 4, la cual es termodinámicamente muy favorable, y establece la relación entre Fe y daño celular (Borquez y col., 2008).



Por lo tanto, es claro que existe una relación directa entre la concentración celular de Fe redox activo (LIP) y la producción de ROS.

Ahora bien, estudios que relacionen la disfunción mitocondrial (asociada a una inhibición del complejo I) con los niveles de Fe en la mitocondria, y más aún que determinen niveles de estrés oxidativo asociado a estos dos fenómenos, son escasos. La única evidencia es la entregada por el grupo de Liang, que indica que ratones intoxicados con MPTP (4 dosis de 20 mg / kg / día), muestran un aumento del Fe redox-activo mitocondrial, solo 24 horas después de la aplicación de la última dosis de MPTP (Liang y Patel, 2004).

Aún no existen investigaciones en modelos de la EP sobre la homeostasis del Fe mitocondrial, y la regulación de la expresión de proteínas que participan en su metabolismo.

**5. ¿Por qué relacionar la disfunción mitocondrial (mediada por la inhibición del complejo I) y el metabolismo del hierro mitocondrial?**

Cuando el complejo I mitocondrial es inhibido, ocurren dos eventos (1) Los niveles de ATP disminuyen (Scotcher y col., 1990) y (2) Los niveles de estrés oxidativo aumentan (Hasegawa y col., 1990, 1997).

### **5.1 Efectos de la disminución de los niveles de ATP**

En el contexto de la relación entre ATP y homeostasis del Fe mitocondrial, podemos mencionar dos proteínas claves de este metabolismo que requieren ATP para su función.

(i) La primera corresponde a ABC-B7, el transportador de núcleos Fe-S. (Shimada y col., 1998). La inhibición del transportador resulta en un aumento en los niveles de Fe, de estrés oxidativo mitocondrial, y en una alteración de la actividad de proteínas citosólicas con núcleos Fe-S (Cavadini y col., 2007).

(ii) Del mismo modo, dentro de la maquinaria involucrada en la síntesis de los núcleos Fe-S, se encuentra la proteína HSP-70. Cuya función es actuar como una chaperona encargada de integrar los núcleos en apo-proteínas mitocondriales que lo requieran (Wiedemann y col., 2006; Adam y col., 2006).

De este modo, una baja en los niveles de ATP, producidos por una inhibición del complejo I, afectará la función de ambas proteínas y de este modo el metabolismo de los núcleos Fe-S.

### **5.2 Efectos del aumento del nivel de estrés oxidativo**

Más del 95% del oxígeno intracelular es utilizado por la mitocondria (Babcock y col., 1999). Bajo condiciones normales, la mayor producción de ROS ocurre en la mitocondria, esto debido a una fuga del 2% de los electrones que pasan por la cadena transportadora de electrones.

En este proceso el oxidante producido en mayor cantidad es el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Turrens y col., 1997; 2003), cuya toxicidad es disminuida, por la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que lo dismuta a  $H_2O_2$  y agua (Robinson y col., 1998; Fridovich y col., 1995). El  $H_2O_2$  producido de la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  puede participar en conjunto con el Fe, en la reacción de Fenton, formando la especie radicalaria de mayor toxicidad, el radical libre hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (Cadenas y col., 2000).

El anión superóxido a su vez, es capaz de reaccionar con óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), compuesto pro-oxidante que participa en reacciones que gatillan daño celular. A pH fisiológico el  $ONOO^-$  se protona rápidamente a ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), siendo este un agente muy reactivo capaz de oxidar directamente proteínas, lípidos y ADN (Álvarez y col., 2003).

El  $ONOO^-$  puede también reaccionar con  $CO_2$  (Greenacre y col 2001; Álvarez y col., 2003; Ischiropoulos y col., 2003) produciendo dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ) y el radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ). Tanto el  $NO_2^{\bullet}$  como el  $CO_3^{\bullet-}$  son poderosos radicales, productores de un daño importante a diferentes niveles en la célula (Augusto y col., 2002).

De esta forma, al extrapolar estas reacciones a eventos moleculares asociados a la EP, la disfunción mitocondrial mediada por una inhibición del complejo I, aumentará significativamente los niveles de  $O_2^{\bullet-}$ , lo que se traducirá en un aumento de todas las especies pro-oxidantes anteriormente mencionadas.

Al relacionar la toxicidad de estas especies y el metabolismo del Fe, se puede señalar que:

(i) El  $\bullet\text{NO}$  es capaz de inhibir los complejos I y II de la mitocondria, y la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial, al inducir la liberación del Fe redox-activo de sus núcleos Fe-S (Drapier y col., 1988; Lancaster y col., 1990).

(ii) Por medio del mismo mecanismo el  $\bullet\text{NO}$  produce la inhibición de la enzima Ferredoxina, la cual provee de electrones para la formación del grupo sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) de los núcleos Fe-S.

(iii) El  $\text{ONOO}^-$  causa inactivación de la aconitasa mitocondrial, por modificación química de su estructura (Gardner y col., 1997).

(iv) Aumento en los niveles de  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  inducen activación de la aconitasa citosólica (IRP1), lo que se traduce en un aumento en la expresión del transportador de entrada de Fe a la célula, DMT-1, y una baja en el transportador de salida, FP, lo cual produce un aumento en los niveles de Fe intracelular (Rouault y col., 2006).

(v) Aumentos de los niveles de estrés oxidativo producen una baja en la concentración GSH, (Clementi y col., 1998). El GSH es el mayor agente antioxidante de la célula, involucrado en procesos de detoxificación y protección frente a estrés oxidativo (Meister y col., 1995). Así el GSH ha sido descrito como

un elemento clave en la maduración de los núcleos Fe-S de la mitocondria y en su exporte hacia el citosol. De esta forma, una baja en los niveles de GSH afecta directamente al ensamblaje de los núcleos Fe-S mitocondriales y a su exporte hacia el citoplasma (Csere y col., 1998; Sipos y col., 2002; Rouault T y col., 2009).

### ***5.3 Enfermedad incidental de cuerpos de Lewy***

Otra de las evidencias que relacionan la disfunción mitocondrial y los niveles de Fe, es la planteada por estudios realizados en pacientes con "incidental Lewy body disease" (ILBD), los cuales son individuos asintomáticos que presentan cuerpos de Lewy en neuronas de la SNpc (estudio post mortem). En ellos se determinó que existe un orden temporal de eventos, donde primero ocurre una baja en los niveles de GSH, seguido de una disfunción mitocondrial y posterior aumento en los niveles de Fe (Gu y col., 1998; Merad-Boudia y col., 1998).

De este modo, de acuerdo a las evidencias planteadas, hay fundamentos para proponer que una disfunción mitocondrial, mediada por una inhibición del complejo I, altera el metabolismo mitocondrial del Fe.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

*En un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, la inhibición del complejo I mitocondrial altera la homeostasis del hierro citosólico y mitocondrial, induciendo su acumulación y contribuyendo a la muerte de las neuronas dopaminérgicas.*

## **OBJETIVO GENERAL**

*Estudiar la relación entre la disfunción mitocondrial producida por la inhibición del complejo I y el metabolismo del hierro mitocondrial, en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### ***1. Determinar el efecto de rotenona, sobre la actividad del complejo I mitocondrial y la producción de ATP***

El modelo utilizado para cumplir este objetivo y los relacionados a cultivo celular, es la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciada con ácido retinoico a neuronas dopaminérgicas.

#### ***1.1. Estudio de dosis-respuesta***

#### ***1.2 Determinar el efecto de rotenona sobre la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, en células SH-SY5Y***

1.2.1 Determinar el efecto de rotenona sobre proteínas mitocondriales: Mfn, Ftx, Grx2, HSP-70, ABC-B7.

1.2.2 Determinar el efecto de rotenona sobre proteínas citosólicas: DMT-1 y FP.

#### ***1.3 Determinar el efecto de rotenona sobre los niveles de hierro en células SH-SY5Y***

1.3.1 Determinar los niveles del LIP mitocondrial.

1.3.2 Determinar los niveles del LIP citosólico.

#### ***1.4 Determinar el efecto de rotenona sobre la actividad de enzimas que contienen núcleos Fe-S en su estructura***

1.4.1. Determinar la actividad de la enzima aconitasa citosólica

1.4.2. Determinar la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial.

1.4.3. Determinar la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO).

1.4.4. Determinar el grado de maduración de la enzima glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa (GPAT).

***1.5. Determinación de la integridad del núcleo Fe-S de la enzima aconitasa mitocondrial, en células SH-SY5Y tratadas con rotenona***

***1.6. Determinar el efecto de rotenona sobre la producción de radicales libres, estrés oxidativo y defensas antioxidantes***

1.6.1. Determinar los niveles de  $O_2^{\bullet-}$

1.6.2. Determinar el grado de carbonilación de proteínas.

1.6.3. Determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, dependiente de Cu/Zn (Cu/ZnSOD) y dependiente de Mn (MnSOD).

***2. Evaluación de la participación del transportador mitoferrina, en el aumento del hierro mitocondrial en la enfermedad de Parkinson***

2.1. Producción de un miARN para Mtn y evaluación de su efecto sobre el contenido de Fe y la viabilidad celular.

2.2. Determinar los cambios de expresión de Mtn en un modelo animal de la EP (intoxicación con MPTP).

2.3. Determinar los cambios de expresión de Mtn en tejido post-mortem de pacientes con la EP, versus individuos controles.

2.4. Producción de un virus con un miARN para Mtn para ser testeado en un modelo animal de la EP (intoxicación con MPTP).

2.5. Determinar el nivel de transducción del virus producido, en un modelo animal de la EP.

2.6. Determinar el efecto de la disminución de Mtn sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, en ratones inyectados con el virus.

## **MATERIALES**

### **1. Material Biológico**

#### **1.1 Células**

Línea SH-SY5Y, obtenidas del American Type Cell Culture Collection (ATCC) # CRL-2266, Rockville.

#### **1.2 Medio de Cultivo celular**

Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), MEM-F12, penicilina, estreptomycin, aminoácidos no esenciales y 10% de suero bovino fetal (SBF), (GIBCO).

#### **1.3 Animales**

Ratones machos C57BL/6J, de dos meses de edad, obtenidos de Janvier Breeding Center, LeGenest St. Isle, Francia.

#### **1.4 Material Post mortem**

Los cerebros fueron obtenidos de la cerebroteca del laboratorio del doctor Etienne Hirsch. Los controles, corresponde a individuos sin un historial de desórdenes neurológicos o psiquiátricos. Los pacientes son individuos con una EP definida, tratados con levodopa, e histológicamente confirmados por pérdida neuronal de la SNpc, presencia de cuerpos de Lewy en la SNpc y el locus cerulio. La tabla N° 1 muestra que los pacientes parkinsonianos y los individuos controles no difieren

significativamente con respecto a la edad media de muerte y el tiempo de obtención del tejido post-mortem.

**Tabla N° 1.** Características de los individuos controles y pacientes con la EP analizados.

Paciente	Diagnóstico	Sexo	Edad	tRPM
C884	Control	M	85	25:45
C902	Control	F	79	13:00
C922	Control	F	83	07:00
C1042	Control	M	88	22:30
P775	EP	F	63	23:15
P1050	EP	F	94	27:30
P1007	EP	M	76	10:30
P1081	EP	F	78	15:30

**tRPM:** tiempo de retraso post mortem

Dos horas posteriores a la autopsia, los cerebros fueron diseccionados congelados en hielo seco y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Luego, secciones de  $20\ \mu\text{m}$  fueron cortadas desde bloques congelados a  $-12^{\circ}\text{C}$  usando un criostato. Los cortes fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Material químico

Trabajo con células: la sonda calceína, el quelante bupiridilo, rotenona. Todos fueron obtenidos de Sigma.

La sonda RPA: fue una donación del doctor Cabantchik ZI.

Trabajo en ratones C57BL/6J: el compuesto químico MPTP de Sigma.

## 2.1 Anticuerpos

- **Anti-mitoferrina:** anticuerpo policlonal, no comercial, donación del doctor Barry Paw, Boston, USA.
- **Anti-frataxina:** anticuerpo policlonal, no comercial, donación de la doctora Anne Laure Bulteau, Paris, Francia.
- **Anti-acnitasa mitocondrial:** anticuerpo policlonal, no comercial, donación de la doctora Anne Laure Bulteau, Paris, Francia.
- **Anti-ABC-B7:** anticuerpo policlonal, comercial, adquiridos de Abcam (ab66359).
- **Anti-glutaredoxina 2:** anticuerpo policlonal, comercial, adquiridos de Abcam (ab85267).
- **Anti-porina:** anticuerpo monoclonal, comercial, adquiridos de Abcam (ab14734).
- **Anti-DMT-1:** anticuerpo policlonal contra el carboxilo terminal de la isoforma +IRE de DMT-1 preparado por BioSynthesis Inc.
- **Anti-ferroportina (FP):** anticuerpo policlonal contra la secuencia carboxilo terminal CGPDEKEVTKENQPNTSVV, consenso para humano, rata y ratón, no comercial, preparado por BioSynthesis Inc.

- **Anti-Actina:** anticuerpo monoclonal, comercial, adquiridos de Abcam (ab8227).
- **Anti-TH:** anticuerpo policlonal, comercial, adquiridos de Chemicon (AB152).
- **Anti-GFAP:** anticuerpo policlonal, comercial, adquiridos de Abcam (ab90601).
- **Anticuerpos secundarios:** Alexa fluor 488 y Alexa fluor 594 adquiridos de Invitrogen- Molecular Probes (Carlsbad, CA).

## 2.2 Radioisótopos

Hierro radioactivo ( $^{55}\text{Fe}$ ), fue traído de New England Nuclear, Boston, EEUU.

## 2.3 Reactivos químicos generales

**Merck:** Fenol, cloroformo, tampón salino fosfato (PBS), etanol, metanol, isopropanol, ácido clorhídrico (HCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), acetato de magnesio ( $\text{MgOAc}$ ), cloruro de sodio (NaCl), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), fosfato de sodio ( $\text{NaHPO}_2$ ), fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), paraformaldehído (PFA), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), sacarosa, dodecil sulfato de sodio (SDS), tris tampón salino (TBS), tris base, hidróxido de sodio (NaOH), ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), tampón TRIS (Tris hidroximetil aminometano), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), agarosa, albúmina de suero bovino (BSA), tampón fosfato salino (PBS), glicerol, hepes, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), tween-20, tritón X-100.



**Sigma:** detergente NP-40, TEMED, acrilamida, bis-acrilamida, azul de bromofenol, azul de tripán,  $\beta$ -mercapto-etanol, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

**Invitrogen:** trizol, lipofectamina 2000, Opti MEM, oligo nucleótidos (oligo dt), marcador de peso molecular de ADN y proteína, persulfato de amonio (PSA), cóctel de inhibidores de proteasa, LB, agar.

**Chemicon:** kit de quimioluminiscencia para análisis de western blot, SuperSignal (Pierce Chem. Co., Rockford, IL).

### **3. Biología molecular**

#### **3.1 Enzimas de restricción**

Kpn1, Xho1, Fsp1, Pme1 adquiridas de Fermenta.

#### **3.2 Enzimas adicionales**

T4 DNA Ligasa, Taq Polimerasa, Transcriptasa Reversa, DNAsa I, ARNasa I, adquiridas de Fermentas

### **4. Equipos**

Espectrofotómetro PERKIN ELMER Lambda EZ210, lector de Elisa TECAN SUNRISE Magellan, termociclador Mini Cycler MJ Research, lector de fluorescencia CytoFLuor II Series 4000, centrífuga Sorvall RT6000B, centrífuga

Mikro-22R Hettich, microscópio confocal carl zeiss laser scanning system LSM510,  
sistema estereotáxico (KOPF), incubador Thermo scientific, serie 8000 WJ,  
campana de flujo laminar MSC 9 EM-NF 6 Jouan.

## MÉTODOS

### **1. Cultivo celular**

1.1. Condiciones de cultivo. La línea celular SH-SY5Y fue cultivada bajo humedad, a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en el medio DMEM + F12, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 10 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 10% aminoácidos no esenciales. El medio fue cambiado cada 2 días.

Las células fueron diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico cultivándolas por 4 días con ácido retinoico 10 µM.

Tratamiento con rotenona: las células fueron incubadas por 24 h con rotenona a concentraciones: 250 nM, 1 µM y 3 µM, (Ammer y col., 1994; Conn y col., 2003).

### **2. Medición de la actividad del complejo I mitocondrial**

Posterior al tratamiento de las células con rotenona, se realizó una extracción mitocondrial (descrita más adelante). La actividad enzimática fue medida por la oxidación de NADH a 340nm por 3 minutos utilizando un espectrofotómetro (100 µM NADH, 50 µM decilubiquinona, 50 mM KPO<sub>4</sub> pH: 7,5, 3,75 mg/ml BSA, 20 µg de mitocondrias). Cada medición se hizo en presencia y ausencia de rotenona (12,5 µM). La actividad específica del complejo I fue calculada como la diferencia entre la actividad enzimática en ausencia de rotenona y la actividad más rotenona, ambas a 37°C, (protocolo adaptado de Janssen y col., 2007).

### **3. Medición de los niveles de ATP**

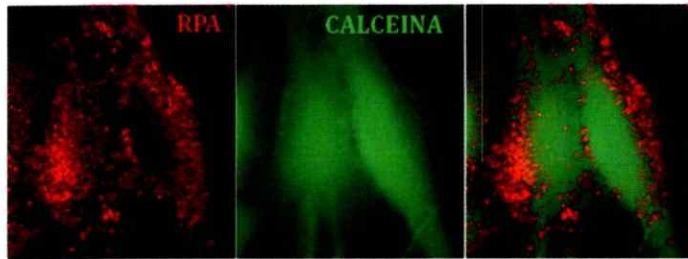
Para la determinación de los niveles de ATP, se utilizó el kit ATP Bioluminescence Assay según las instrucciones de manufactura (Roche, número de catálogo: 11 699 709 001). Este kit utiliza la dependencia de ATP de la luz emitida por luciferasa en la oxidación de luciferin. Puede ser utilizado para mediciones de niveles extremadamente bajos de ATP.

### **4. Medición del pool de hierro reactivo mitocondrial y citosólico**

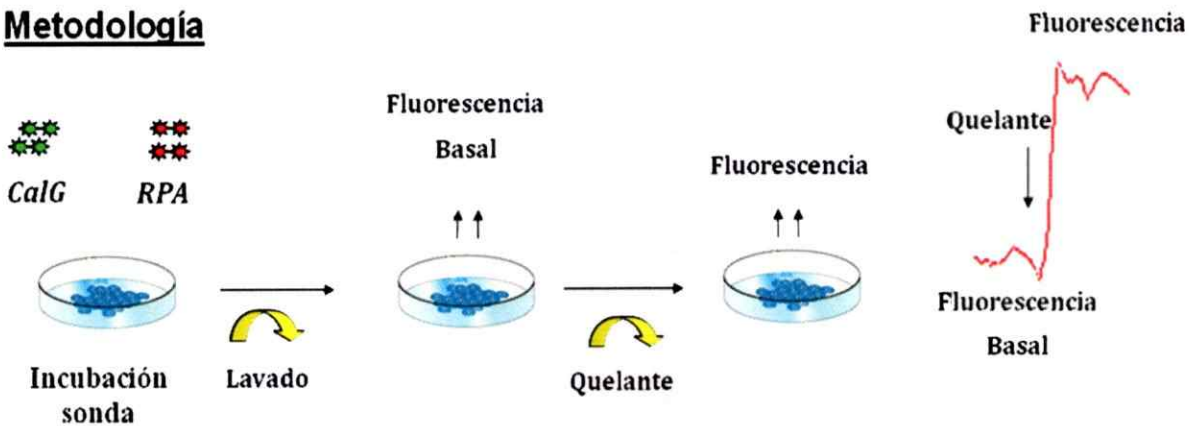
Para cumplir este objetivo células de neuroblastoma humano fueron expuestas a sondas radioactivas, las cuales funcionan como indicadores del contenido del pool de Fe lábil (LIP). Para esto, son utilizadas las sondas RPA, la cual detecta el LIP mitocondrial y calceína, que detecta el LIP citosólico. La metodología utilizada se explica en la Figura 4, (Kakhlon y col., 2002 y 2010).

**RPA:** Sonda de sensaje de hierro mitocondrial

**Calcein:** Sonda de sensaje de hierro citosólico



## Metodología



**Figura 4. Metodología utilizada para la medición del LIP mitocondrial y citosólico.** Inicialmente las células son tratadas durante 24 h con rotenona (250 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M), luego se agregan las sondas calceína o RPA (0,25  $\mu$ M por 10 minutos) registrándose una fluorescencia basal. Posteriormente se añade el quelante Bpiridilo (5  $\mu$ M), el cual compite con la sonda por el Fe, produciéndose un cambio en la fluorescencia. La diferencia en las fluorescencias indica el contenido del LIP presente en cada compartimento (mitocondria o citosol).

## **5. Extractos celulares y análisis por western blot**

### **5.1 Extracto celular total**

Las células fueron removidas de las placas de cultivo mediante incubación de 5 minutos en tampón salino TRIS-EDTA (40 mM Tris, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA, pH 7.4). Posteriormente, los extractos celulares fueron obtenidos tratando las células con tampón de lisis (10 mM MOPS, pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 1mM fenil metil sulfonil fluoruro, 10 µg/mL leupeptina, 0.5 µg/mL aprotinina, 0.7 µg/mL pepstatina A, 5% glicerol, 1 mM ditiotreitól y 0.1% Tritón X-100). Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en hielo y centrifugadas a 10.000g por 10 minutos, el sobrenadante fue guardado a -20°C, hasta realizar el western blot. La concentración de proteínas fue determinada usando el ensayo de proteínas de ácido bicincolínico (BCA), (Núñez y col, 2002).

### **5.2 Extracción mitocondrial**

Las células fueron removidas de las placas de cultivo por incubación de 5 minutos en tampón salino TRIS-EDTA. Posteriormente fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1000g. El pellet obtenido fue resuspendido en 700 µl de tampón de mantención mitocondrial (50 mM Tris HCl; pH: 7,5, 5 mM glucosa, 1mM piruvato, 1 mM EGTA, 210 mM manitol). Luego las células fueron lisadas en un poter. El homogenizado obtenido fue centrifugado por 10 minutos a 500 g, recuperándose el sobrenadante. Este nuevamente fue centrifugado por 30 minutos a 12.000 g. El pellet obtenido corresponde a la fracción mitocondrial y el sobrenadante a la fracción citosólica. Todas las muestras fueron mantenidas a -20°C, hasta la realización del ensayo (protocolo modificado desde Guillon y col., 2009)

### **5.3 Western blot y cuantificación**

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, y para cada ensayo fueron cargados de 10-20  $\mu\text{g}$  de proteínas. Los inmunoblot fueron visualizados usando anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa contra IgG y un sustrato quimio-luminiscente (SuperSignal ultra, pierce). Las bandas fueron cuantificadas usando el programa image j (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### **6. Ensayo de EMSA**

Para el ensayo de EMSA se utilizó el kit de Pierce (N° de catálogo 20148), según instrucciones de manufactura. Esta técnica se basa en la observación que el complejo ADN-proteína sufre un retardo en su migración, respecto a fragmentos lineales de ADN, al ser separados en condiciones no denaturantes en una electroforesis en gel de agarosa.

Para el ensayo, se sintetizó un oligonucleótido de una secuencia IRE, que lleva unido en uno de sus extremos una molécula de biotina. Esta secuencia fue sintetizada por la empresa BioSynthesis Inc.

El experimento comenzó con la incubación de un extracto de proteínas con la secuencia sintetizada, luego la mezcla se corrió en el gel de retardo y mediante la reacción de unión de biotina y streptoabidina se reveló por luminiscencia. Mientras más marca es observada, más es la unión de la proteína al mensajero, lo cual indica mayor actividad enzimática. La ventaja del kit es que no utiliza radioactividad para la medición.

## **7. Espectroscopia de absorción atómica**

El contenido de Fe total fue determinado por medio de espectroscopia de absorción atómica. Células o el mesencéfalo ventral de ratones intoxicados con MPTP (según el experimento), fueron homogenizados y se realizó un fraccionamiento subcelular (como fue descrito). 10 µg de proteínas fueron mezcladas con 100 µl de ácido nítrico ultra puro e incubados a 60°C por 12 horas. Las muestras digeridas fueron centrifugadas a 12.000 g por 2 minutos y el sobrenadante diluido a 1 mL con 0,2% de ácido nítrico ultra puro. El contenido de Fe fue determinado en un espectrómetro de absorción atómica (SIMAA 6100, Perkin Elmer, Shelton CT). Preparaciones de la comisión Chilena de energía nuclear fueron usadas como material de referencia para validar el análisis del mineral. Estas mediciones fueron realizadas en el laboratorio del Doctor Miguel Arredondo, INTA.

## **8. Modelo animal de la EP: Intoxicación con MPTP**

Grupos de cinco ratones fueron inyectados 4 veces con 20 mg/Kg de MPTP en intervalos de dos horas, durante un mismo día (protocolo agudo de intoxicación), posteriormente, los animales fueron sacrificados a 1, 2, 4, 7 y 21 días para la disección del mesencéfalo ventral. Para bioquímica el mesencéfalo fue congelado a -80°C y luego fue realizada la extracción de proteínas. Para inmunohistoquímica el mesencéfalo fue previamente cortado en secciones de 20 µm (Jackson y Przedborski, 2007).



### **9. Morfología: inmunohistoquímica**

Los cerebros de ratones fueron fijados por perfusión trascardiaca, disectados, fijados durante 48 horas (4% para-formaldehído en 0,1 M PBS), criopreservados en 30% sacarosa y cortados en un micrótomo. Los cortes flotantes fueron permeabilizados, bloqueados e incubados con el anticuerpo primario. La marca fue visualizada usando Alexa 488 y Cy3-conjugado como anticuerpos secundarios (Invitrogen y laboratorio Jackson, respectivamente) o anticuerpos secundarios conjugados a HRP y el sustrato de la peroxidada (Gray, vector SG; red, NOVARED; Brown, DAB; Vector Laboratorios). Como control negativo se utilizó solo el anticuerpo secundario (Salazar y col, 2008).

### **10. Western blot de tejido humano**

Las muestras humanas para realizar los inmunoblot fueron obtenidas de la cerebroteca del laboratorio del doctor Etienne Hirsch. Las muestras correspondían a cortes de mesencéfalo en porta objetos congelados, de los cuales por raspaje se obtiene la SNpc. Posteriormente, se realizó un extracto proteico y el inmunoblot (Salazar y col, 2008).

### **11. Análisis de imagen y conteo celular**

Para la cuantificación estereológica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se utilizó un microscopio óptico, equipado con una cámara de video conectada a un computador. La SNpc fue delineada siguiendo la base del trabajo de German y colaboradores (German y col., 1996). El número total de células TH positivas fue calculado por métodos estereológicos, usando el software de Explora Nova (La

Rochelle, Francia). Fueron contados 1 de 10 cortes de mesencéfalo por cada animal.

### ***12. Medición del grado de carbonilación en proteínas***

Se utilizó el kit OxyBlot de detección de oxidación de proteínas de Millipore (S7150) siguiendo las instrucciones de manufactura (Número de catálogo: S7150). El ensayo requirió de una muestra de proteína, la cual inicialmente fue desnaturada con SDS, lo que produjo que los grupos carbonilos de las proteínas quedaran expuestos. Posteriormente, a la muestra se le agregó 2,4 dinitrofenilhidrazona, que transforma los grupos carbonilos al compuesto dinitrofenilhidrazina, el cual fue detectado por western blot mediante anticuerpo.

### ***13. Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa***

El ensayo fue realizado en extractos citosólicos y mitocondriales, mediante el kit de Calbiochem (número de catálogo 574601), según instrucciones de manufactura. El ensayo se basó en el uso de la sal de tetrazodium para la detección del radical superóxido. Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de enzima necesaria para obtener el 50% de dismutación del radical  $O_2^{\bullet}$ . Este ensayo mide las tres isoenzimas de la enzima SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD), siendo una forma simple, reproducible y rápida para la medición de la actividad enzimática. La actividad de cada SOD puede ser medida independientemente, posterior a un fraccionamiento sub-celular y por el uso de cianida para la medición de la actividad de la SOD mitocondrial.

#### **14. Gel de isoelectroenfoque**

Para la separación de proteínas por punto isoeléctrico las muestras fueron cargadas en un gel de gradiente de pH de BIORAD (número de catálogo: 161-0310), realizado según instrucciones de manufactura.

#### **15. Medición de la producción de superóxido**

Para la determinación de los niveles de  $O_2^{\bullet-}$  se utilizó el kit Mitosox de Molecular Probes (Invitrogen M36008). El kit se basa en el uso de una sonda que por diferencia de potencial tiene destinación mitocondrial. Una vez en la mitocondria, se une al radical  $O_2^{\bullet-}$  oxidándose y emitiendo una fluorescencia de color rojo, indicador de los niveles de  $O_2^{\bullet-}$  mitocondrial.

#### **16. Medición de la actividad de la enzima xantina oxidasa**

Para el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos de color negro, agregándose a cada pocillo 130  $\mu$ l del tampón 50 mM  $KH_2PO_4$ , 0,1 mM EDTA. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu$ g del extracto de proteínas, el sustrato pterine y se midió la fluorescencia (Em/Ex: 345/390 nm). El ensayo fue realizado a temperatura ambiente durante 10 minutos (Martelli y col, 2007).

#### **17. Medición de la actividad de la enzima aconitasa**

La actividad aconitasa fue medida como el rango de reducción de NADP a 340nm por la enzima isocitrato deshidrogenasa. El ensayo se realizó por adición al medio de 1 mM de citrato de sodio, 0,6 mM  $MnCl_2$  (cofactor de la isocitrato deshidrogenasa) y 0,2 mM NADP. Se utilizó oxalomalato (2mM) un inhibidor

competitivo de la aconitasa, para asegurar la especificidad del ensayo (Bulteau y col., 2003).

### **18. Ensayo de viabilidad celular**

Para el ensayo de viabilidad, células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a cada uno se le agregó 10 µL de una solución 12 mM de MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilterazolium bromide) (Molecular Probes). La placa fue incubada de 2 a 4 h a 37 °C. Por microscopio invertido, se chequeó la aparición de un precipitado azul intenso, momento en que la reacción se detuvo con 100 µl de una solución de 1mg de SDS en 10 mL de 0,01M HCl. Las células fueron mantenidas como mínimo 4 h más en el incubador. Posteriormente, se registró la absorbancia a 570nm.

### **19. Clonación de un mi-ARN para mitoferrina**

Para el diseño del micro-RNA se siguió el tutorial de invitrogen de diseño de micro-RNA ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)), escogiéndose la siguiente secuencia:

5'- TGCTGTGGTAAATGACTCTGGCCTGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCAGGCCAGTCATTTACCA -3'

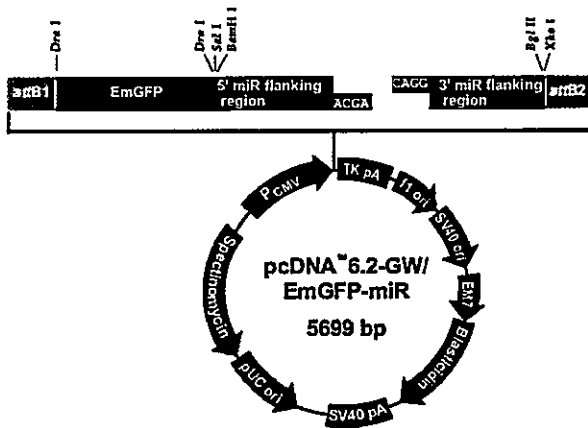
5'- CCTGTGGTAAATGACTGGCCTGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCAGGCCAGAGTCATTTACCAC -3'

Posteriormente, la secuencia fue clonada en el plásmido pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR, el cual se transfectó en las células SH-SY5Y.

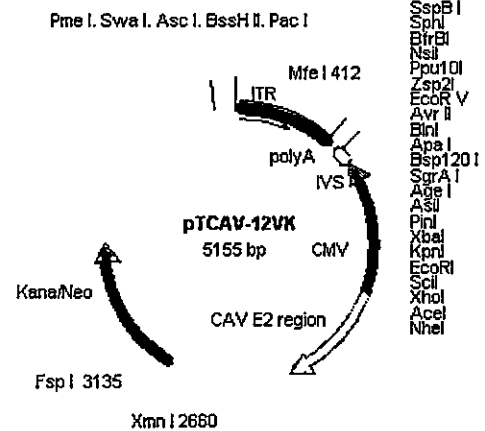
## **20. Diseño de un virus que lleva una secuencia interferente para el transportador mitoferrina**

Para estudiar el efecto in vivo de la disminución del transportador Mtn, sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se diseñó un sistema de transfección viral con una secuencia interferente para el transportador. La producción del virus implicó dos pasos de clonación. El primero corresponde al subclonamiento de la secuencia de miARN-Mtn-GFP desde el vector pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR, en el vector viral pTCAV-12VK. Esto fue realizado con las enzimas de restricción: KpnI y XhoI. Posteriormente, se realizó un segundo sub-clonamiento, utilizando las enzimas Pme I y Fsp I. En este, la secuencia liberada contiene el sitio promotor a demás de la secuencia miARN-Mtn-GFP. Luego se realizó una reacción de recombinación homóloga con un segundo vector viral denominado pTG5412. Los vectores utilizados y la metodología de recombinación homóloga se muestran en la Figura 5.

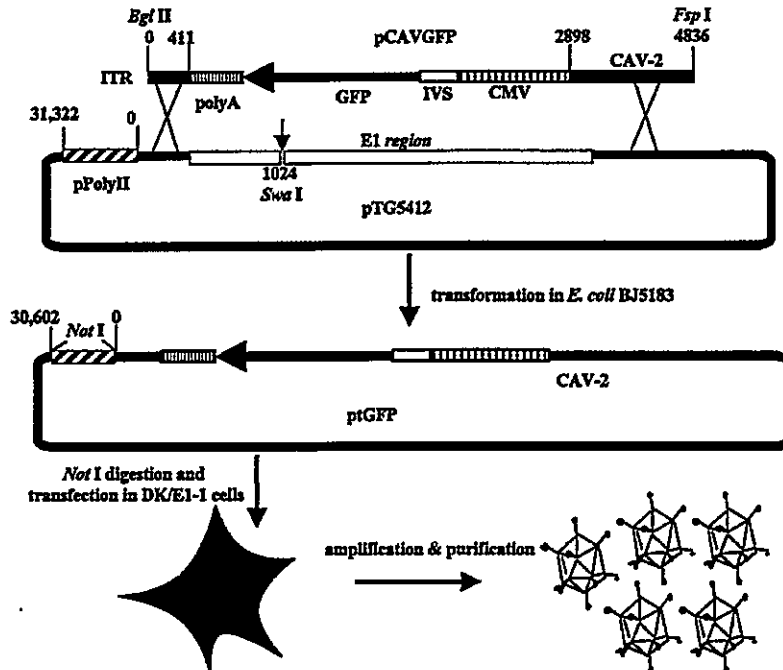
(A)



(B)



(C)



**Figura 5. Vectores y metodología utilizada para la producción de un virus que lleva una secuencia interferente para mitoferina.** (A) El plásmido pcDNA-6.2-GW/EmGFP-miR corresponde al plásmido inicial en el que fue clonada la secuencia interferente para Mtn, con él se obtiene un clonamiento adyacente del miARN con la secuencia para GFP. (B) pTCAV-12VK, es el primer plásmido viral utilizado, necesario para la obtención de la zona promotora. La secuencia miARN-Mtn-GFP (proveniente del plásmido en A), fue clonada entre los sitios Pme I y Fsp I. (C) pTG5412 segundo vector viral utilizado, con el cual se lleva a cabo la reacción de recombinación homóloga. Luego, el vector miARN-Mtn-GFP-pTG5412 se transfectó en las células DK/E1-1, las cuales permiten la amplificación viral. Finalmente, por purificación se obtuvo el virus que fue inyectado estereotáxicamente en los ratones.

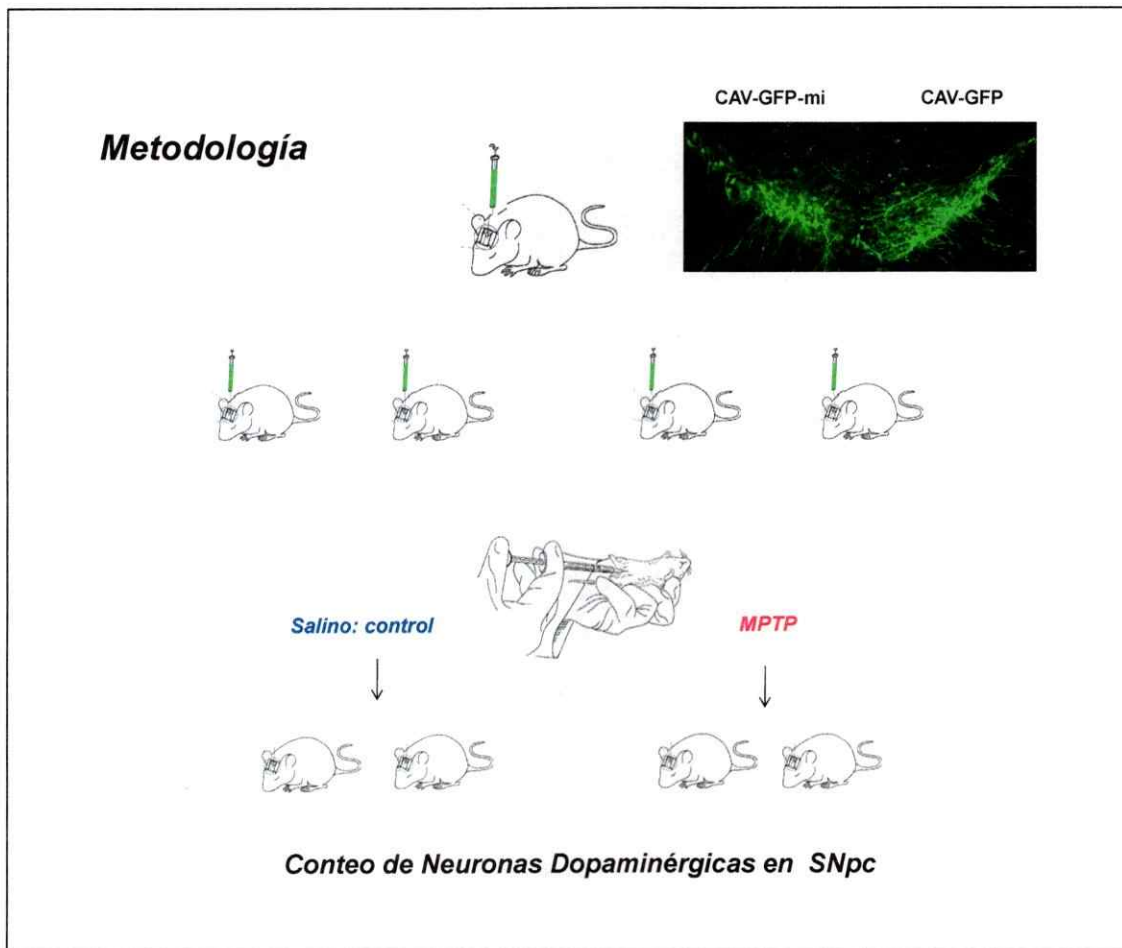
## **21. Inyecciones estereotáxicas virales**

Los ratones fueron anestesiados con 35  $\mu$ l de una solución compuesta por ketamina (1 mL), xilasina (rompón) (0,5 mL) y NaCl al 0,9% (8,5 mL). Una vez anestesiados, se fijaron por la cabeza a un aparato estereotáxico. Posteriormente, la piel fue abierta con un bisturí, se fijó el bregma y se realizó la inyección viral en el estriado del ratón utilizando las coordenadas: antero posterior (AP): 1,0, lateral (L): 1,5, dorso ventral (DV): -3,5.

Las inyecciones fueron realizadas con 2  $\mu$ L del virus ( $10^{exp12}$  de título viral) utilizando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L, manejada mediante bomba peristáltica (Soudais y col., 2004).

## **22. Metodología utilizada para la inyección estereotáxica viral, intoxicación con MPTP y conteo de neuronas dopaminérgicas**

Para evaluar si la disminución de Mfn producida en las neuronas dopaminérgicas tiene un papel protector en un modelo animal de la EP, se inyectaron ratones estereotáxicamente con el virus que lleva el interferente para Mfn. Como control, se inyectó en el lado contrario del cerebro el mismo virus que expresa GFP, pero sin la secuencia interferente para Mfn. Luego de 10 días, los ratones fueron tratados con MPTP o con solución salina (controles), siguiendo el protocolo de intoxicación aguda descrito anteriormente. Los ratones fueron sacrificados 7 días posterior a la intoxicación (para metodología ver Figura 6)



**Figura 6. Metodología utilizada para las inyecciones virales e intoxicación con MPTP.** Ratones son inyectados estereotáxicamente en el lado derecho del cerebro con el virus CAV-GFP-mi, el cual contiene la secuencia interferente para Mtn. El lado izquierdo del cerebro es inyectado con un virus control, que solo expresa GFP. Posterior a la inyección, se esperan 10 días, luego un grupo de ratones es intoxicado intraperitonealmente con MPTP y otro con solución salina (controles). Siete días después el cerebro es disectado, cortado, y realizada una inmuno-histoquímica para TH

### 23. Análisis estadístico

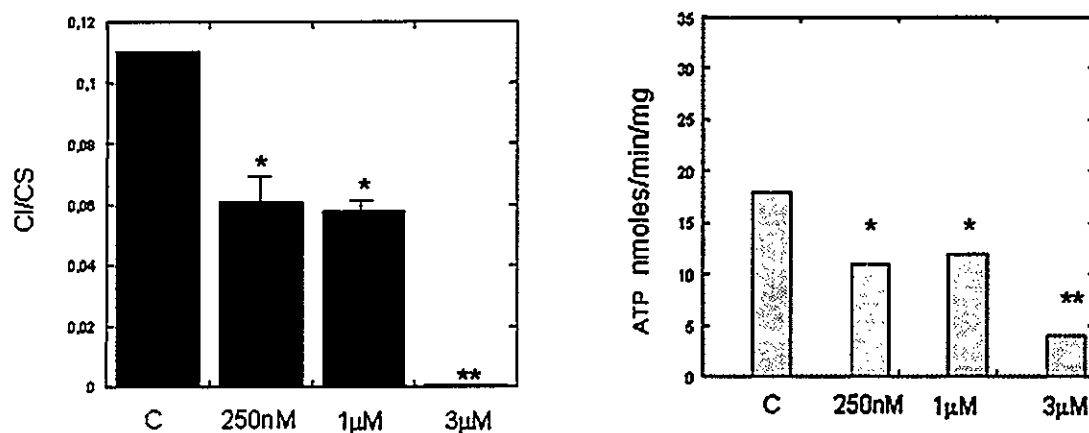
La prueba estadística utilizada en cada uno de los experimentos fue ANOVA (1 o 2 variables), considerando a \* $P < 0,05$ ; y \*\* $P < 0,01$  como significativos.



## Resultados

### 1. Efecto de rotenona sobre la actividad del complejo I mitocondrial y la producción de ATP

Rotenona produce una inhibición del complejo I y una baja en los niveles de ATP. De esta forma, el primer objetivo de esta tesis fue evaluar si las concentraciones y el tiempo de exposición a rotenona utilizados, producían el efecto directo esperado. Los resultados indicaron que rotenona produce una disminución significativa en la actividad del complejo I y en los niveles de ATP, efecto que es dosis dependiente, (Figura 7).

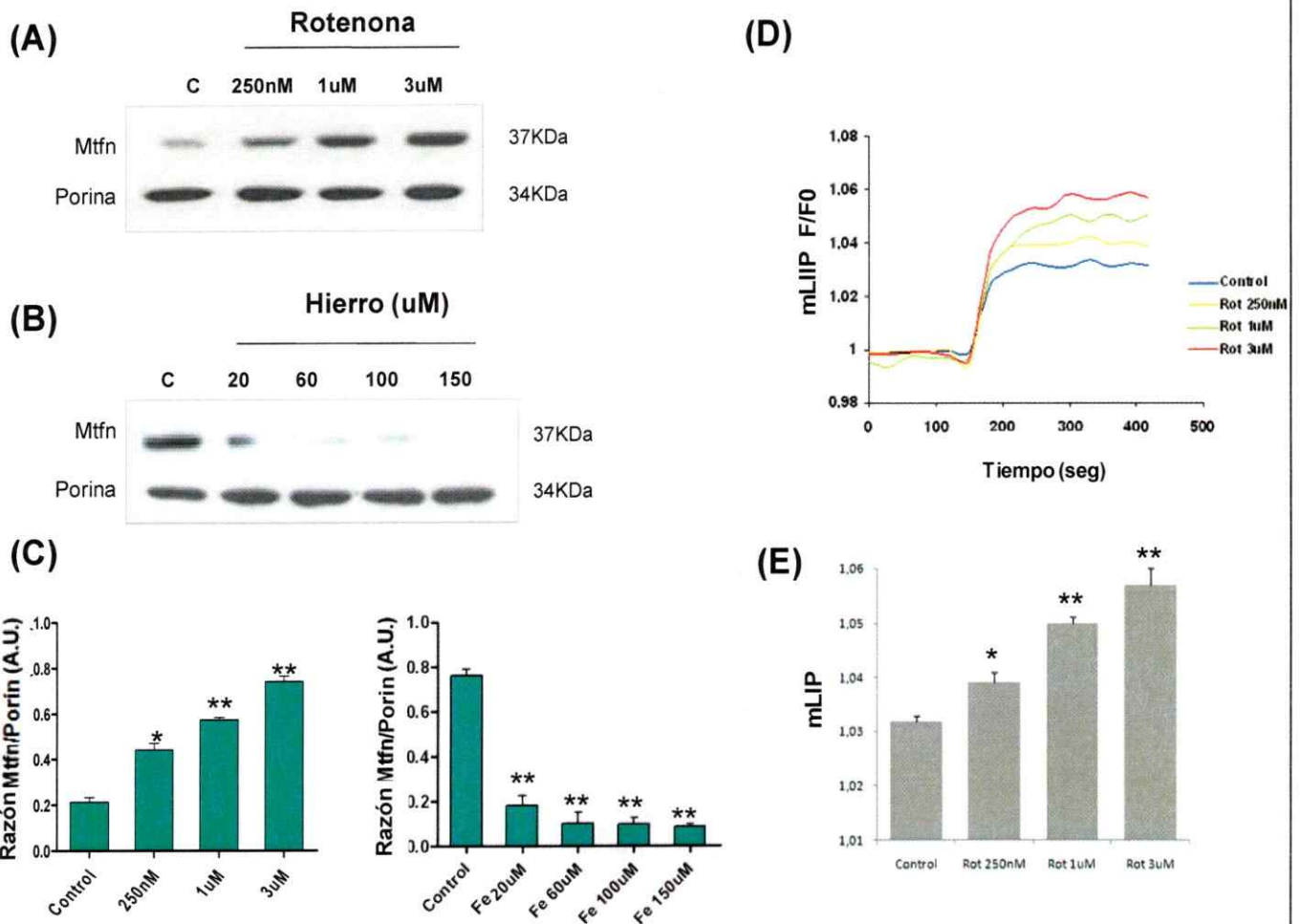


**Figura 7. Rotenona produce una baja en la actividad del complejo I y en los niveles de ATP mitocondrial en células SH-SY5Y.** Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), son tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM), C=control. Posteriormente, se realiza un fraccionamiento sub celular, obteniéndose un extracto mitocondrial, en el que se mide (A) la actividad del complejo I, determinada espectrofotométricamente y graficada según la oxidación de NADH a 340nm. Los datos fueron estandarizados por la actividad de la enzima citrato sintasa (CI/CS). (B) Niveles de ATP, medidos por la luminiscencia de luciferasa en una reacción de oxidación, expresados en nmoles/min/mg, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

Luego de lograr una estandarización del sistema, y comprobar efectivamente que rotenona tiene un efecto sobre la actividad del complejo I y los niveles de ATP, se planteó como objetivo determinar su efecto, sobre la expresión de proteínas mitocondriales, citoplasmáticas, y sobre los niveles de Fe.

## ***2. Efecto de rotenona y hierro sobre la expresión del transportador de hierro mitocondrial mitoferrina***

Para el desarrollo de este objetivo, células SH-SY5Y fueron tratadas con concentraciones crecientes de rotenona (0,25-3  $\mu\text{M}$ ) o Fe (20-150  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, se analizó la expresión de Mtfn mediante western blot. Adicionalmente, mediante la sonda RPA fue medido el LIP mitocondrial, posterior al tratamiento con rotenona. Se observó que rotenona produjo un aumento en la expresión de Mtfn, mientras que el Fe produjo su disminución, (Figura 8). Debido a que el aumento en Mtfn coincide con el aumento del LIP mitocondrial, es posible pensar en una posible co-relación entre la expresión del transportador y los niveles del metal.



**Figura 8. La expresión de mitoferrina responde a concentraciones de rotenona y hierro, en células SH-SY5Y.** (A) Las células fueron tratadas por 24 h con diferentes concentraciones (250nM, 1µM, 3µM) de rotenona. La expresión de Mtn (37 KDa) fue determinada en extractos celulares de las células tratadas. Porina (34 KDa) fue usada como control de carga. (B) Las células fueron tratadas por 48 h con 20-150 µM de Fe, después de lo cual la expresión de Mtn fue determinada como se indicó anteriormente. (C) Cuantificación de A y B, \* p<0,05, \*\* p<0,01, n=3. (D) Determinación del mLIIP en células tratadas durante 24 h con 0,25-3 µM de rotenona. La magnitud del cambio de fluorescencia posterior a la adición del quelante bipyridilo, es proporcional al tamaño del LIP. (E) Cuantificación de los cambios de mLIIP descritos en D, \* p<0,05, \*\* p<0,01, n=6.

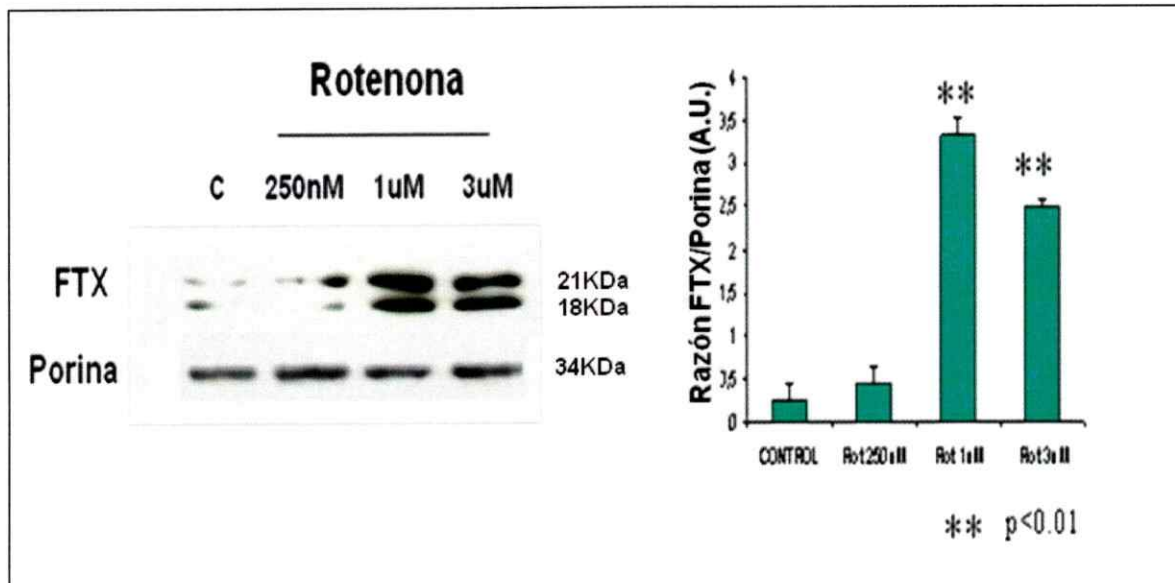
### **3. Medición de los niveles del LIP mitocondrial y citoplasmático, en células SH-SY5Y tratadas con rotenona**

Para evaluar si los niveles de LIP se ven modificados posterior a una inhibición del complejo I, células SH-SY5Y fueron tratadas con rotenona. Posteriormente fueron expuestas a sondas fluorescentes, las cuales funcionan como indicadores del contenido de Fe reactivo. Para esto son utilizadas dos sondas (a) RPA: la cual detecta el LIP mitocondrial y (b) Calceína: que detecta el LIP citoplasmático (para metodología ver Figura 4). Los resultados fueron expresados en gráficos de fluorescencia versus tiempo. Se observó que tanto la mitocondria (Figura 8), como el citoplasma (Figura 12), presentaron un aumento del LIP, posterior a los tratamientos. Los cambios fueron dosis dependiente.

### **4. Efecto de rotenona sobre la expresión de frataxina, chaperona mitocondrial del hierro**

Ftx es una proteína ubicada en la matriz mitocondrial, cuya función consiste en ser una chaperona de Fe encargada de entregarlo a la proteína andamio (Isu-1), para el ensamblaje de los núcleos Fe-S (Lill y col., 2009).

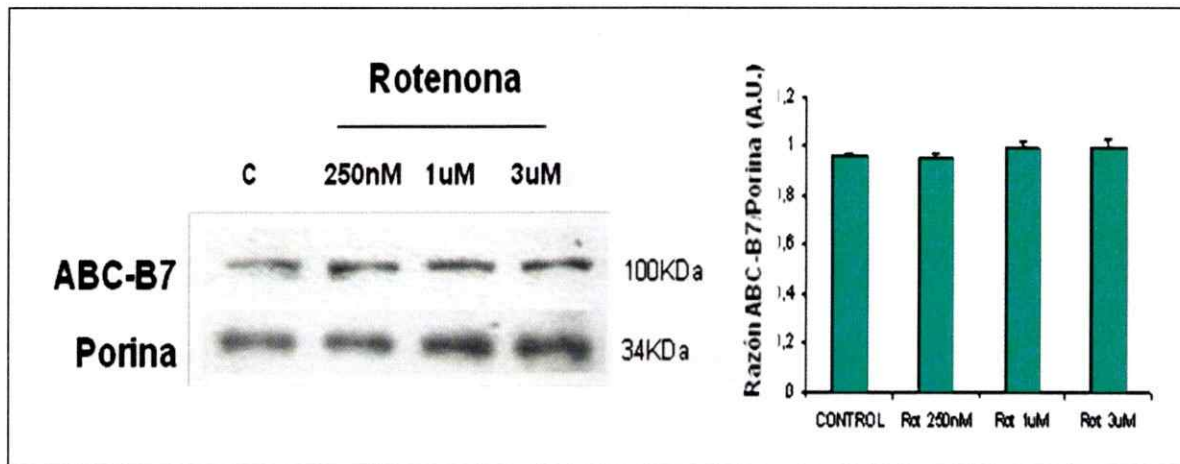
De esta forma, con el objetivo de evaluar una segunda proteína mitocondrial relacionada al metabolismo del Fe, es que células SH-SY5Y fueron tratadas con diferentes concentraciones de rotenona, determinándose su efecto sobre la expresión de Ftx. Los resultados indicaron un aumento de la expresión de la chaperona, posterior a los tratamientos, (Figura 9).



**Figura 9. La expresión de frataxina responde a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y.** (A) Células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM). La expresión de Ftx (18-21 KDa) fue determinada desde extractos celulares de las células tratadas. Porina (34 KDa) fue usada como control de carga. (B) Cuantificación de A, \*\* p<0,01, n=3.

### 5. Efecto de rotenona sobre la expresión del transportador ABC-B7

ABC-B7 es una proteína ubicada en la membrana interna de la mitocondria, encargada de la salida de los núcleos Fe-S hacia el citosol. Con el objetivo de evaluar qué ocurre con este transportador luego de la inhibición del complejo I, células SH-SY5Y fueron tratadas con diferentes concentraciones de rotenona. No se observaron cambios significativos en la expresión de ABC-B7, posterior a los tratamientos, (Figura 10).

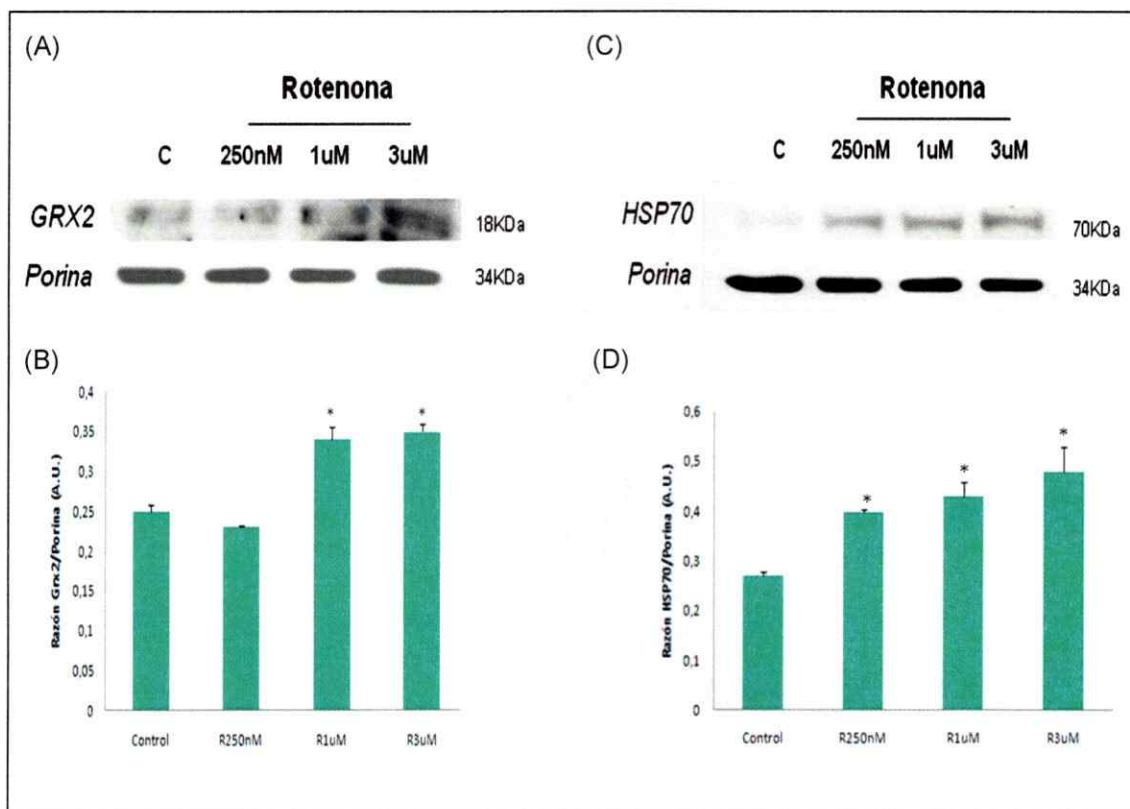


**Figura10. Expresión de ABC-B7 en células SH-SY5Y tratadas con rotenona.** (A) Células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1μM, 3μM). La expresión de ABC-B7 (100 KDa) fue determinada desde extractos de las células tratadas. Porina (34 KDa) fue usada como control de carga. (B) Cuantificación de A, n=3.

## 6. Efecto de rotenona sobre la expresión de las proteínas Grx2 y HSP-70

Posteriormente, se evaluó posibles cambios en los niveles de otras chaperonas involucradas en el metabolismo de los núcleos Fe-S, luego de la inhibición del complejo I. Para esto, células SH-SY5Y fueron tratadas con rotenona, y se determinó la expresión de Grx2 y HSP-70.

Según los resultados obtenidos, es posible observar que ambas chaperonas aumentan su expresión, posterior a los tratamientos con rotenona (Figura 11).

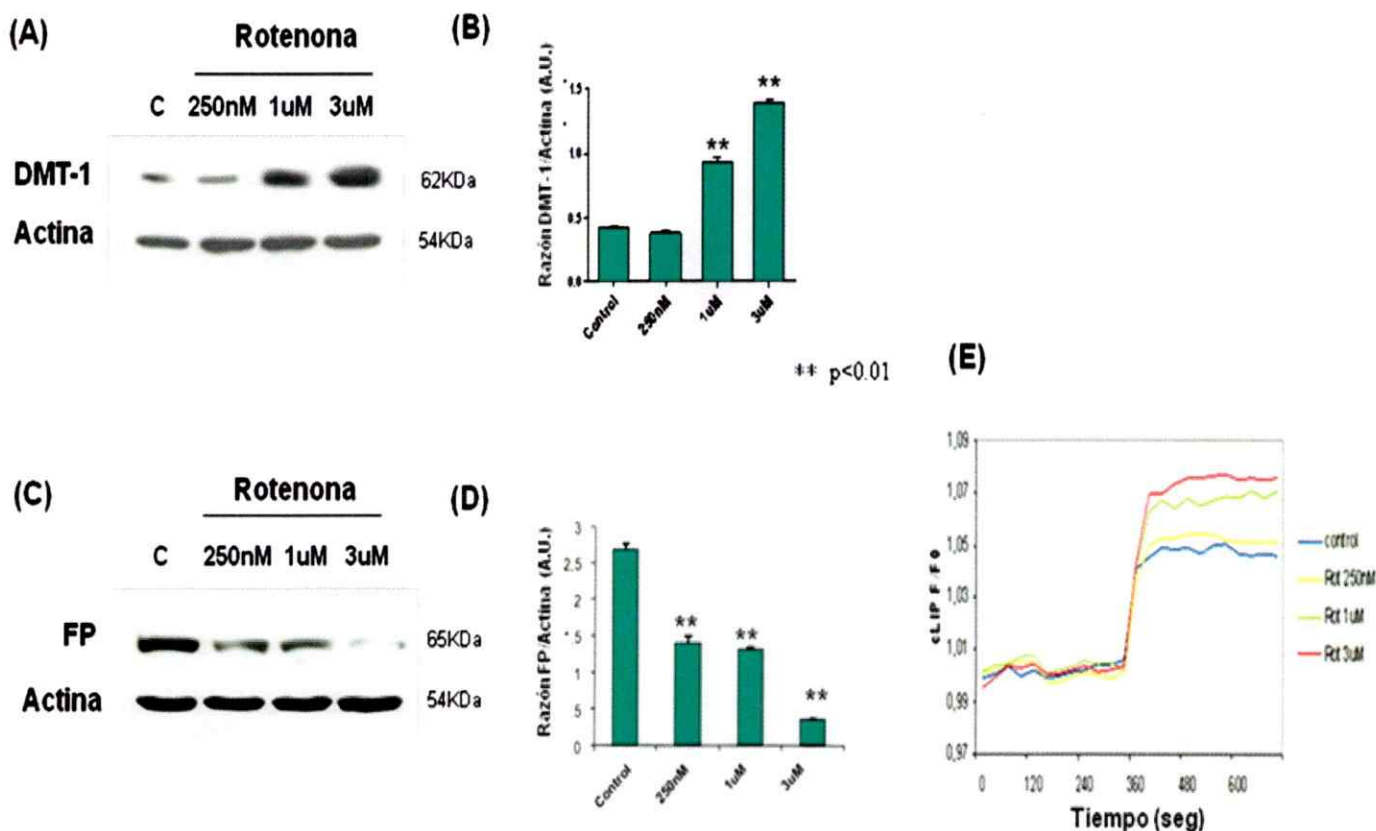


**Figura 11. Grx2 y HSP-70 responden a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y.** Células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1μM, 3μM). (A) La expresión de Grx2 (18 KDa) fue determinada desde extractos celulares de las células tratadas. (B) Cuantificación de A (C) La expresión de HSP-70 (70 KDa) fue determinada desde extractos celulares de las células tratadas. (D) Cuantificación de B. Porina (34 KDa) fue usada como control de carga, n=3.

### **7. Efecto de rotenona sobre la expresión de los transportadores DMT-1 y ferroportina (FP)**

Para evaluar si la inhibición del complejo I, mediada por rotenona afecta a transportadores celulares del metabolismo del Fe, se estudió la expresión del transportador de entrada de Fe a la célula DMT-1 y del transportador de salida FP, posterior al tratamiento. Los resultados indicaron, que ambos transportadores responden a rotenona. DMT-1 aumenta su expresión y FP la disminuye, (Figura

12). Es de notar que ambas respuestas llevan a un aumento del contenido de Fe celular.



**Figura 12. DMT-1 y FP responden a concentraciones de rotenona en células SH-SY5Y.** Las células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones (250nM, 1µM, 3µM) de rotenona. (A) La expresión de DMT-1 (62 KDa) fue determinada en extractos de las células tratadas. (B) Cuantificación de A, \*\* p<0,01, n=3. (C) La expresión de FP (65 KDa) fue determinada en extractos celulares. Actina (54 KDa) fue usada como control de carga. (D) Cuantificación de C, \*\* p<0,01, n=3. (E) Determinación del LIP en células tratadas durante 24 h con 250nM, 1µM, y 3µM de rotenona, la sonda utilizada fue 0,25 µM de calceína. La magnitud del cambio de fluorescencia, posterior a la adición del quelante bipyridilo, es proporcional al tamaño del LIP, n=6.



En resumen, la inhibición del complejo I mediada por rotenona, produjo una desregulación de proteínas involucradas en el metabolismo del Fe. Se observó un aumento en el transportador mitocondrial Mtn, que se correlacionó con un aumento del LIP mitocondrial. Del mismo modo existe un aumento de Ftx, Grx2 y HSP-70, todas proteínas involucradas en el metabolismo mitocondrial de los núcleos Fe-S.

A nivel celular existe un aumento del transportador de entrada de Fe a la célula DMT-1 y una disminución del transportador de salida FP, lo que a su vez se correlacionó con un aumento del LIP citosólico. De esta forma, tanto la respuesta mitocondrial como celular a rotenona, conducen a una situación de sobrecarga de Fe.

Una pregunta pertinente a responder es: *¿Por qué estas proteínas mitocondriales aumentan su expresión en respuesta a rotenona?*. En base a ello se postuló, que debido a que rotenona produce una baja en los niveles de ATP, lo que afecta directamente la función de las proteínas ABC-B7 y HSP-70, esto produciría que tanto la mitocondria como el citosol no tendrán los niveles necesarios de núcleos Fe-S, produciéndose a nivel celular una señal de bajo Fe, lo que gatillaría el aumento de la expresión de Mtn, Ftx, Grx2, y HSP70 (para compensar la falta de núcleos Fe-S).

De esta forma, los siguientes objetivos tienen relación con analizar la actividad de proteínas con núcleos Fe-S, y evaluar si rotenona produce un efecto sobre su síntesis.

Las actividades enzimáticas evaluadas fueron:

- 1.- Aconitasa citosólica/IRP
- 2.- Aconitasa mitocondrial
- 3.- Xantina oxidasa (XO)
- 4.- Glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa (GPAT).

#### **8. Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima aconitasa citosólica en células SH-SY5Y**

La aconitasa citosólica es una proteína que contiene en su estructura un núcleo 4Fe-4S, el cual es esencial para su función. Este cataliza el paso de citrato a isocitrato, reacción ligada a la síntesis de glutamato, (Wang y col., 2008).

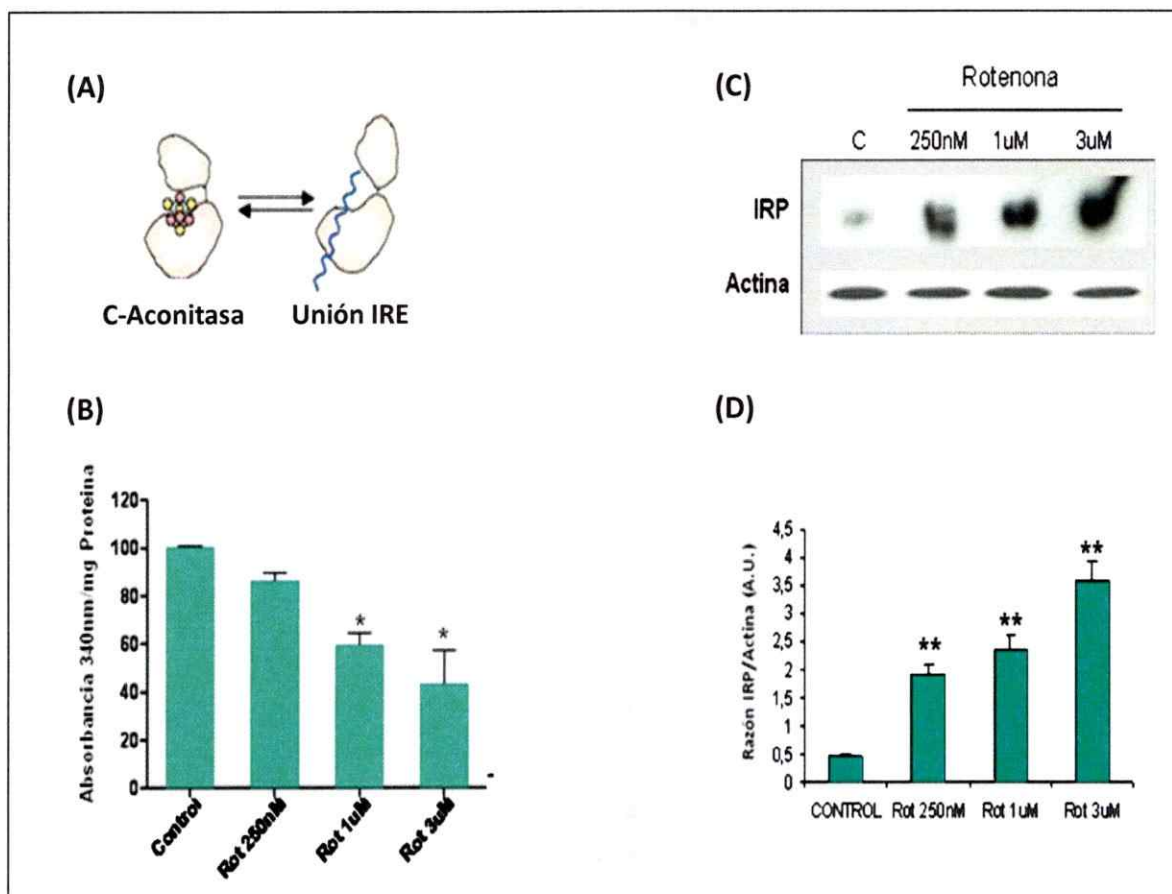
La pérdida del núcleo Fe-S, produce que la enzima adquiera actividad IRP-1, uniéndose a elementos de respuesta a Fe, denominados IRE.

La actividad IRP induce la síntesis de proteínas de entrada de Fe (DMT-1; TfR) e inhibe la síntesis de proteínas de almacenamiento (ferritina) o salida (FP) del metal (Eisenstein y Blemings, 1998).

La figura 13 A muestra que el tratamiento con rotenona produjo una baja significativa en la actividad aconitasa de la proteína.

Considerando su función alternativa, se determinó también la actividad IRP, mediante un ensayo EMSA. En el cual se encontró un aumento significativo de la actividad IRP (Figura 13, B).

De esta manera, la inhibición del complejo I se correlacionó con una baja en la actividad aconitasa y un aumento en su actividad IRP.

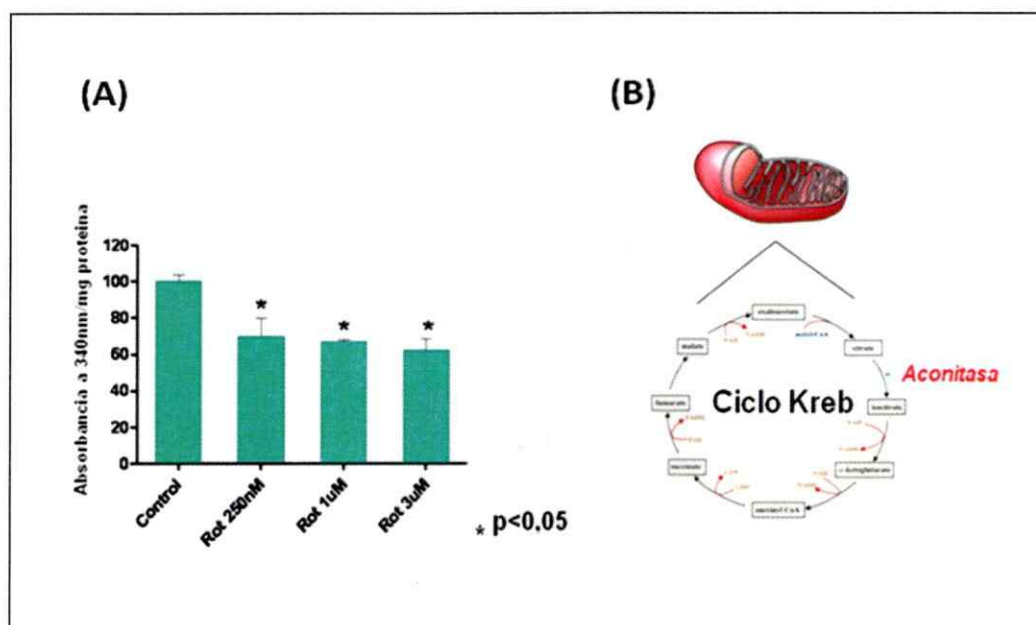


**Figura 13. Rotenona afecta la actividad de la enzima aconitasa citosólica.** (A) Esquema de la interconversión entre la función de aconitasa citosólica (c-aconitasa) y la función IRP de unión a elementos IRE (B) Las células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM). La actividad aconitasa fue determinada desde extractos citosólicos de las células tratadas. La actividad fue medida en extractos citosólicos mediante un ensayo espectrofotométrico. La concentración total de proteína en mg, fue utilizada como control de carga. (C) Las células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM). Posteriormente, se obtiene un extracto citosólico, en el cual se realiza un ensayo EMSA, actina es utilizada como control de carga. (D) Cuantificación de B. \*p<0,05, \*\* p<0,01, n=3.

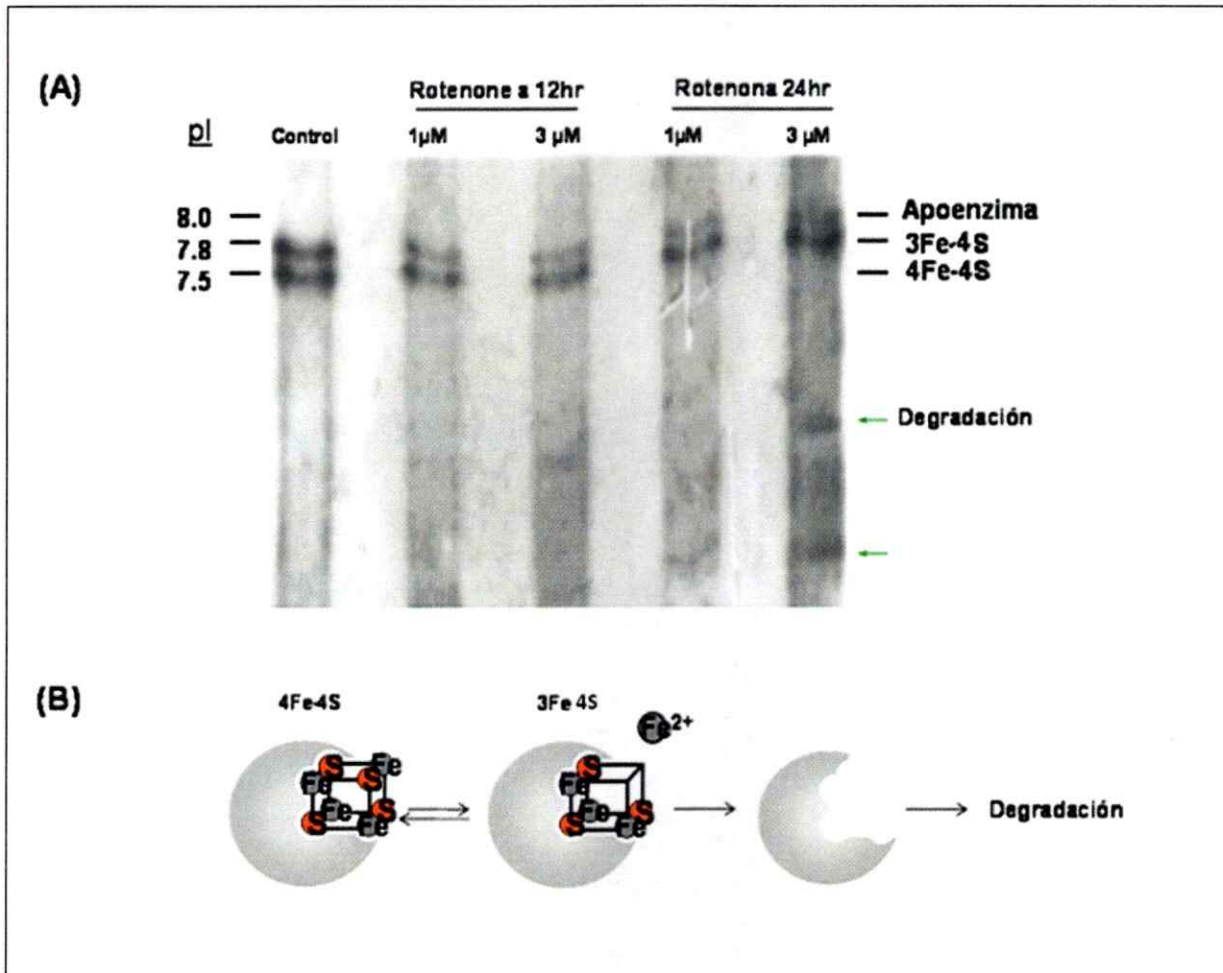
### 9. Efecto de rotenona sobre la actividad de la proteína aconitasa mitocondrial en células SH-SY5Y

La aconitasa mitocondrial es una enzima del ciclo del ácido cítrico que cataliza la conversión de citrato a isocitrato. Contiene un núcleo 4Fe-4S, el cual es esencial

para su función. Siguiendo la misma lógica del objetivo anterior, se determinó su actividad enzimática. Los resultados indicaron que al aumentar la concentración de rotenona, la actividad aconitasa mitocondrial disminuyó significativamente (Figura 14). Adicionalmente, para una evaluación directa de la integridad del núcleo 4Fe-4S que contiene la enzima, se realizó un ensayo de iso-electroenfoco, el cual indica exactamente el estado (4Fe-4S, 3Fe-4S o apoenzima) en que se encuentra la enzima, posterior al tratamiento con rotenona. Los resultados indicaron que a medida que la concentración de rotenona aumenta, la proteína pasa desde un estado mixto de 4Fe-4S / 3Fe-4S normal de equilibrio, a un estado mixto de 3Fe-4S y apoenzima, en el que ha perdido su núcleo (Figura 15).



**Figura 14. Rotenona afecta la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial.** (A) Las células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM). La actividad fue determinada desde extractos mitocondriales de las células tratadas, mediante un ensayo espectrofotométrico, por medición de la absorbancia a 340nm. La concentración total de proteína en mg, fue utilizada como control de carga. \* p<0,05, n=3. (B) Ciclo de Krebs y sitio de acción de la aconitasa mitocondrial.



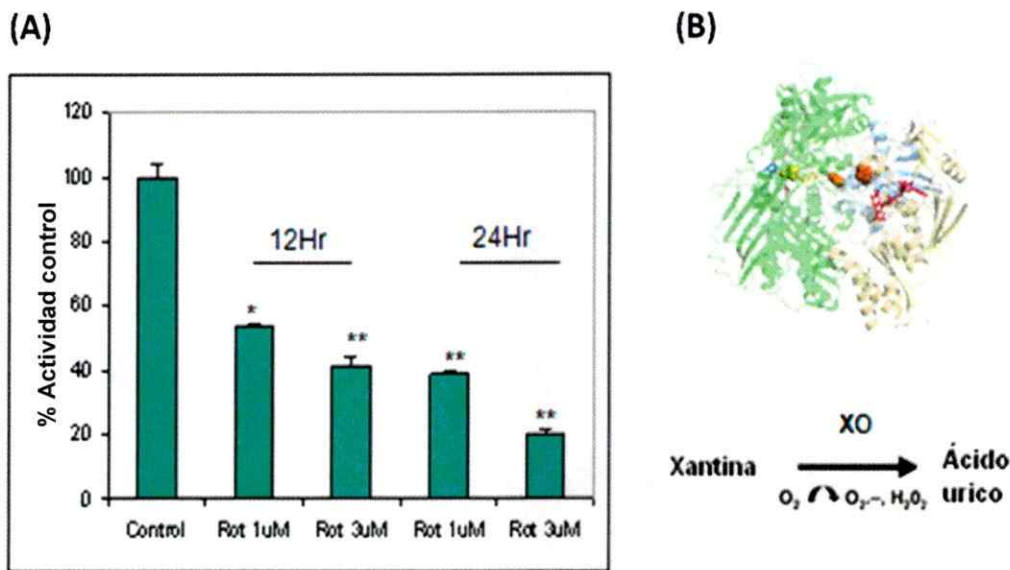
**Figura 15. Rotenona afecta la integridad del núcleo Fe-S de la enzima aconitasa mitocondrial.** (A) Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M). La integridad del núcleo fue determinada mediante un ensayo de iso-electroenfoque, en el que se hizo migrar un extracto mitocondrial en un gel que separa las proteínas según su punto iso-eléctrico (PI). El PI para la conformación del núcleo 4Fe-4S es: 7.5, para 3Fe-4S: 7,8, y para la apoenzima: 8,0. Las bandas que se observan en la parte inferior del gel corresponden a degradación de la enzima. (B) Esquema representativo de los cambios en la integridad del núcleo de la enzima. Los círculos naranjos corresponden a azufre (S), los círculos plomos a Fe. (1) Enzima aconitasa con su núcleo completo: 4Fe-4S, (2) Enzima que ha perdido un Fe, quedando su estructura como 3Fe-3S, (3) Degradación de la enzima, debida a la pérdida de su núcleo.

Evidencias en la literatura indican que la integridad de los núcleos Fe-S puede ser afectada por dos eventos (1) problemas en su síntesis y (2) daño del núcleo debido a estrés oxidativo (Bulteau y col; 2005, 2006, Martelli y col; 2007). La pérdida de actividad observada en las aconitasas mitocondrial y citosólica podría deberse a una síntesis disminuida de los núcleos Fe-S, secundaria a la baja de niveles de ATP. Sin embargo, un efecto inhibitorio debido al aumento en los niveles de estrés oxidativo no puede ser descartado. Para lograr un mejor conocimiento del proceso inhibitorio, se planteó determinar la actividad de dos enzimas que contienen núcleos Fe-S, participantes en el metabolismo de las purinas, la xantina oxidasa (XO) y la glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa (GPAT).

La actividad de estas enzimas no es afectada por el estrés oxidativo, pero sí por defectos en el proceso de síntesis de sus núcleos Fe-S, (Martelli y col, 2007; Skibba y col 1989),

**10. Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO) y la estructura de glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa (GPAT) en células SH-SY5Y**

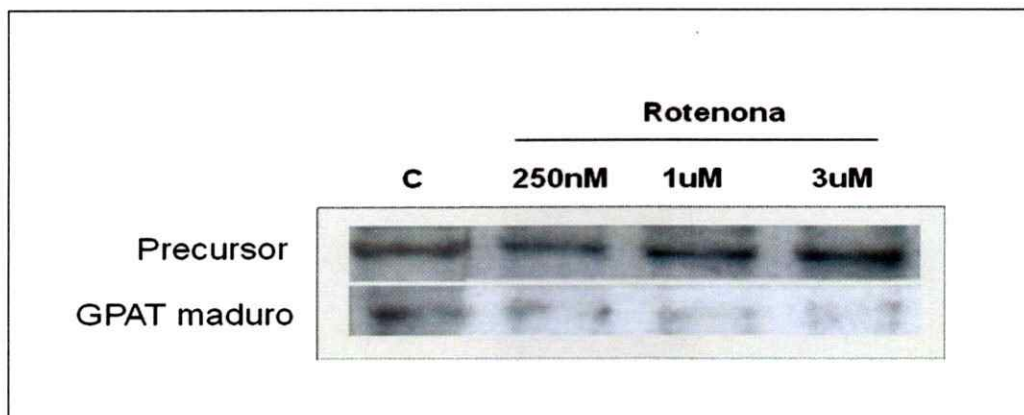
XO es una enzima del metabolismo de las purinas, involucrada en la conversión de xantina a ácido úrico. Esta enzima contiene un núcleo 4Fe-4S en su estructura, el cual es necesario para su función. Como se mencionó anteriormente, su actividad sólo se ve afectada cuando los núcleos no logran formarse correctamente en su estructura. De esta manera, se midió la actividad enzimática de XO, mediante un ensayo colorimétrico, el cual utiliza Pterin como sustrato. Los resultados mostraron que la actividad de la enzima disminuye significativamente con rotenona, (Figura 16).



**Figura 16. Rotenona afecta la integridad del núcleo Fe-S de la enzima xantina oxidasa.** (A) Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1μM, 3μM). Posteriormente, se realiza un fraccionamiento sub celular, del cual se toma la parte citosólica y se mide la actividad de la enzima XO. La medición es realizada mediante un ensayo colorimétrico, el cual utiliza Pterin como sustrato, la absorbancia es medida a 340nm en un espectrofotómetro. \* p<0,5, \*\* p<0,01, n=3. (B) Estructura proteica de la enzima XO y reacción química en la que participa.



La segunda proteína evaluada fue GPAT, la que cataliza la primera etapa del metabolismo de las purinas. Esta enzima contiene un núcleo 4Fe-4S en su estructura, el cual es esencial para su función. Inicialmente es sintetizada como un precursor inactivo, que requiere de la incorporación del núcleo, para generar la enzima activa. La incorporación del núcleo produce la ruptura de un péptido de 11 residuos en el extremo amino terminal. Tanto la apo-proteína, como su forma madura son detectables y diferenciables mediante western blot, (Martelli y col., 2007). La figura 17 indica que rotenona produce una disminución de la forma activa. Ambos resultados dan cuenta de una anomalía en la incorporación del núcleo a la proteína.



**Figura 17. Rotenona afecta a la maduración de la enzima GPAT.** Las células fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M). Posteriormente se realiza un western blot para la enzima GPAT, donde se reconoce tanto el precursor, como la forma madura de la proteína.

En resumen, el estudio de la actividad de cuatro enzimas mitocondriales y citosólicas, que contienen núcleos Fe-S, mostró una disminución en sus actividades, posterior a la inhibición del complejo I, producida por rotenona. De esta forma, es posible plantear una correlación entre la baja en los niveles de ATP (hipótesis planteada) y un defecto en la síntesis de los núcleos Fe-S.

Como se describió en la introducción, cuando la concentración de Fe supera niveles fisiológicos es tóxico, debido a que participa en reacciones como Fenton, donde al unirse al oxígeno es capaz de producir el radical libre  $\text{OH}^\cdot$ , modificando ADN, proteínas y lípidos.

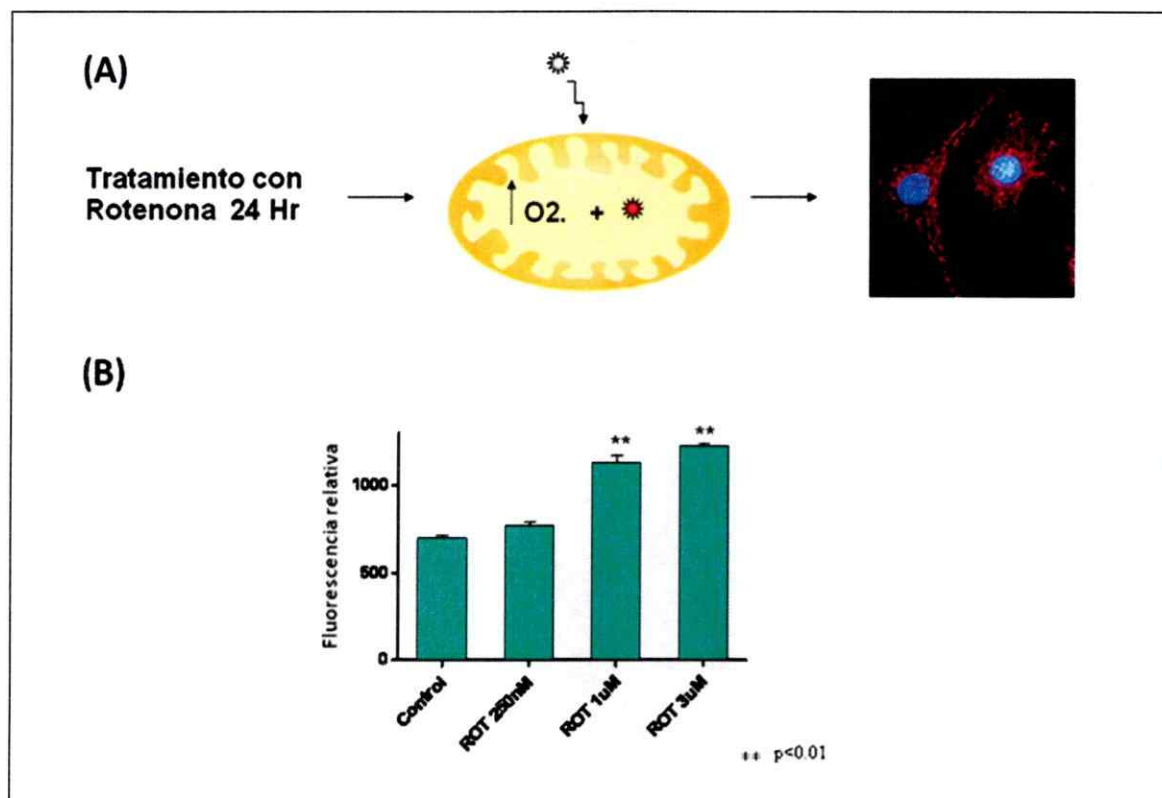
Como los tratamientos con rotenona mostraron un aumento de Fe a nivel mitocondrial y citosólico (Figuras 8 y 12), se planteó como siguiente objetivo analizar los niveles de estrés oxidativo, luego de tratamientos con rotenona.

Los objetivos fueron:

1. Medición de los niveles de superóxido
2. Medición del nivel de carbonilación de proteínas mitocondriales
3. Medición de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD)

## 11. Efecto de rotenona sobre la producción de superóxido en células SH-SY5Y

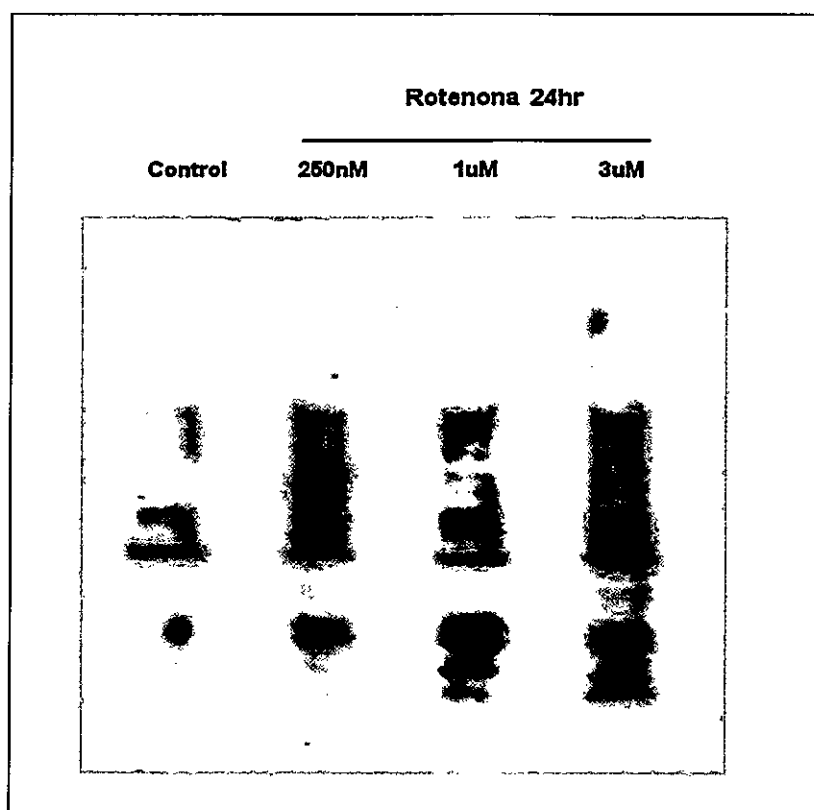
Para cumplir este objetivo, las células fueron tratadas con rotenona durante 24 h, y posteriormente se utilizó una sonda mitocondrial fluorescente, la que al unirse a  $O_2^{\bullet-}$  se oxida y fluoresce a un color rojo. La figura 18 indica que los niveles de fluorescencia son directamente proporcional a la concentración de  $O_2^{\bullet-}$  presente en la mitocondria. De esta forma, a medida que los niveles de rotenona aumentan existe un aumento significativo de  $O_2^{\bullet-}$ .



**Figura 18. Rotenona produce un aumento en los niveles de superóxido en células SH-SY5Y.** (A) Metodología: Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1µM, 3µM), durante 24 h. Posteriormente, son incubadas con 5 µM de RPA, sonda de destinación mitocondrial que al unirse a  $O_2^{\bullet-}$  fluoresce a un color rojo. (B) Gráfico de fluorescencia relativa versus las condiciones de rotenona utilizadas, la fluorescencia fue medida en un lector de placas. \*\* p<0,01, n=3.

## 12. Efecto de rotenona sobre la carbonilación de proteínas mitocondriales en células SH-SY5Y

La presencia de grupos carbonilo, aldehído o cetona en proteínas como resultado de modificaciones oxidativas, es un marcador de estrés oxidativo celular. Por esto, se evaluó el nivel de carbonilación de proteínas mitocondriales posterior al tratamiento de células SH-SY5Y con rotenona (Figura 19). Se observó que rotenona produjo un aumento significativo del grado de carbonilación de proteínas mitocondriales.

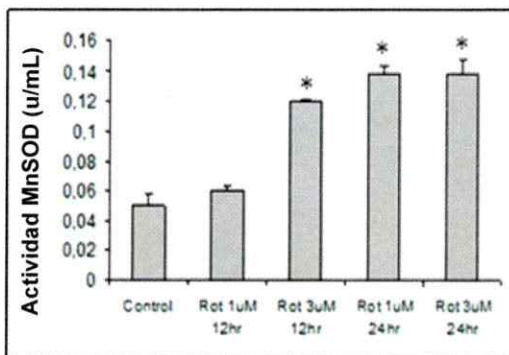


**Figura 19. Rotenona produce un aumento en la carbonilación de proteínas mitocondriales en células SH-SY5Y.** Las células fueron tratadas por 24 h con diferentes concentraciones de rotenona (250nM, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M). Posteriormente, se realizó un fraccionamiento sub celular, la fracción mitocondrial se denaturó e incubó con dinitrofenil hidrazona, para exponer los grupos carbonilos presentes en las proteínas y se realizó un western blot con un anticuerpo que los identifica.

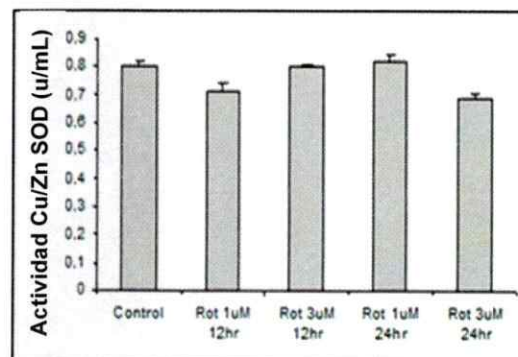
### 13. Efecto de rotenona sobre la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Como parte de la respuesta antioxidante, la actividad de esta enzima aumenta con el aumento del nivel de estrés oxidativo. Así, se planteó como objetivo evaluar la actividad de la SOD mitocondrial (MnSOD) y la SOD citoplasmática (Cu/ZnSOD) en células SH-SY5Y tratadas con rotenona. Fue posible observar que los tratamientos con rotenona produjeron el aumento significativo de la MnSOD, no así de la Cu/Zn SOD (Figura 20). Estos resultados son concordantes con lo descrito en pacientes con la EP, donde se ha demostrado un aumento en la actividad de la SOD mitocondrial (Radunovic y col., 1997; Yoritaka y col., 1997).

Mitocondria: MnSOD (A)



Citosol: Cu/ZnSOD (B)



\*  $p < 0,05$

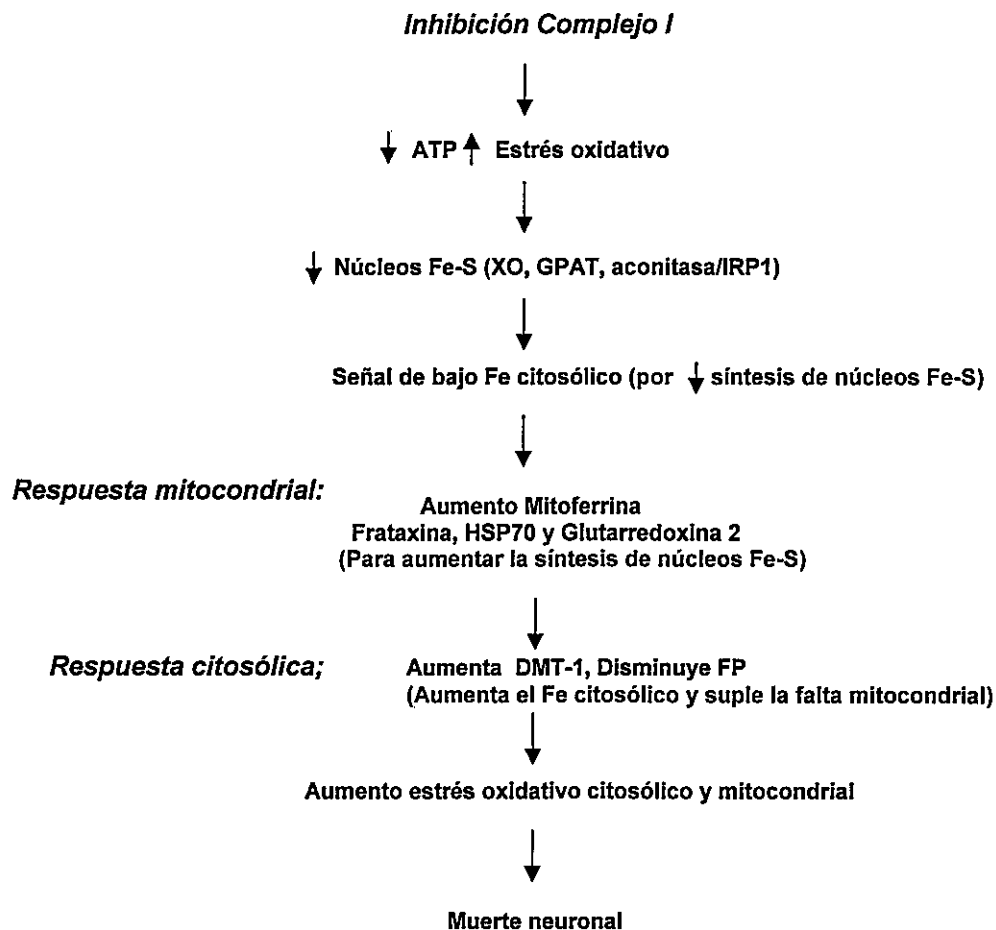
**Figura 20. Rotenona produce un aumento en la actividad de la enzima antioxidante MnSOD en células SH-SY5Y.** Células de neuroblastoma humano son tratadas por 24 h con 250nM, 1µM o 3µM de rotenona. Posteriormente, se obtuvo un extracto mitocondrial y citosólico. Mediante un ensayo de luminiscencia, utilizando luciferasa, se determina (A) la actividad de la enzima Mn SOD en el extracto mitocondrial y (B) la actividad enzimática de Cu/ZnSOD en el extracto citosólico. La actividad es determinada en Unidades/mL.

\*  $p < 0,05$ ,  $n=3$ .

En resumen, probablemente la inhibición del complejo I mitocondrial produce un aumento significativo del estrés oxidativo y de las respuestas antioxidantes celulares.

De acuerdo a los resultados obtenidos en estudios utilizando cultivos celulares, es que se propone el siguiente esquema:

## Modelo Rotenona:



**Figura 21. Modelo propuesto: secuencia de eventos que llevan a la muerte neuronal según los resultados obtenidos en células SH-SY5Y tratadas con rotenona.** Inicialmente rotenona induce una inhibición del complejo I mitocondrial, lo que trae como consecuencia directa una baja en los niveles de ATP y un aumento del estrés oxidativo. Esto produce una baja en la síntesis de los núcleos Fe-S, provocando una disminución en la actividad de enzimas que contienen estos núcleos y un aumento en la actividad IRP1. En la mitocondria, esto trae como consecuencia un aumento en la expresión de proteínas relacionadas al metabolismo del Fe (Mtn, Ftx, Grx2 y HSP-70), y a nivel citosólico un aumento en la actividad IRP1, en la expresión de DMT-1 y una baja en FP. Ambas respuestas provocan un aumento en los niveles de Fe citosólico y mitocondrial, lo que resulta en un aumento de estrés oxidativo y finalmente en la muerte neuronal.

Debido al desconocimiento de la importancia de Mfn en el metabolismo mitocondrial del Fe, y por los resultados encontrados sobre la desregulación de su expresión en el modelo de rotenona, es que nos planteamos como siguiente objetivo estudiar a Mfn, en el modelo in vivo del ratón, utilizando MPTP y tejido pos mortem de pacientes con la EP.

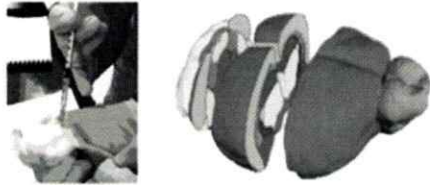
#### **14. Efecto de MPTP sobre la expresión de mitoferrina en mesencéfalo de ratones**

Para llevar a cabo este objetivo, ratones fueron intoxicados con MPTP, un inhibidor del complejo I mitocondrial, utilizado como modelo animal de la EP. Posteriormente, el mesencéfalo fue disectado, y se realizó una extracción de proteínas. Se observó que la expresión de Mfn en los ratones intoxicados aumenta (Figura 22). Resultado coincidente con lo observado con rotenona en la línea celular SH-SY5Y.

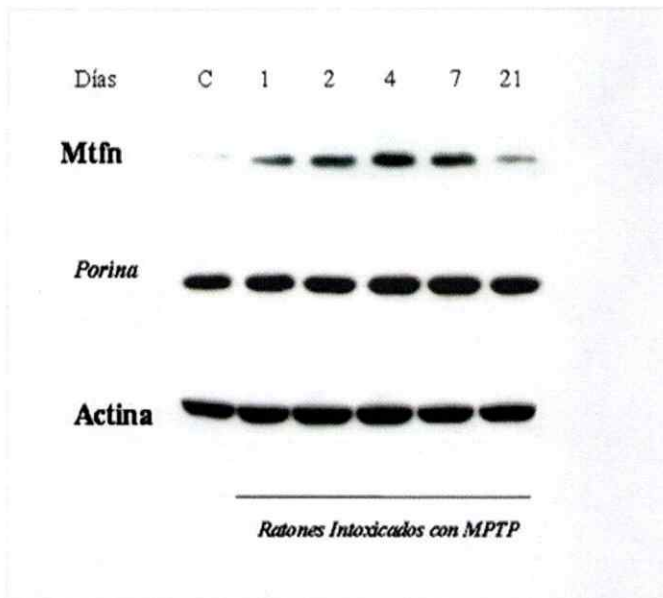
Adicionalmente, en las mismas muestras se midió el contenido total de Fe expresado en ng/mg de proteína (Figura 22C), observándose un aumento significativo de los niveles del metal en los ratones intoxicados.



(A) Aguda (20 mg/kg x 4 dosis cada 2 hr)

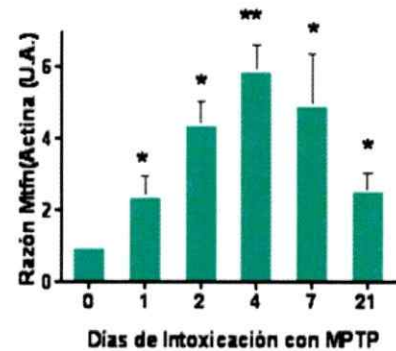


(B)

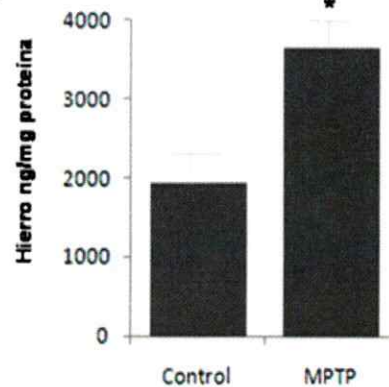


C: Animal Control

(D)



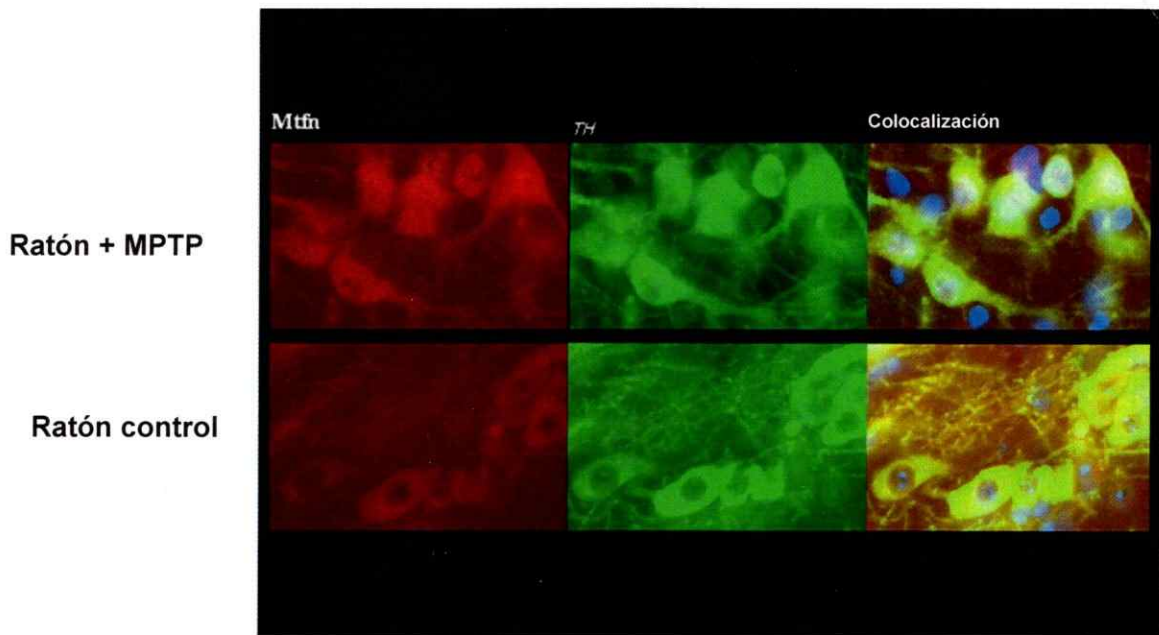
(C)



**Figura 22. MPTP produce un aumento en la expresión del transportador mito ferrina en mesencéfalo de ratones intoxicados.** (A) Ratones son inyectados con 20 mg de MPTP por Kg, cuatro veces al día, en un protocolo de intoxicación aguda. Posteriormente, cada grupo (n=5) son sacrificados a los días 1, 2, 4, 7, 21. El mesencéfalo es diseccionado y se obtienen extractos de proteínas para realizar un western blot que fue revelado con un anticuerpo anti-Mtfn. (B) Análisis de inmunoblot de la expresión de Mtfn en homogenizados de mesencéfalo ventral, de ratones intoxicados con MPTP y controles. Porina y actina son usados como control de carga. (C) Cuantificación de B. \* p<0,05, \*\* p<0,01, n=3. (D) Medición del contenido mitocondrial de Fe total de los ratones sacrificados al día 4. El análisis fue realizado mediante espectroscopia de absorción atómica.

**15. Determinar la expresión de mitoferrina en neuronas dopaminérgicas de ratones intoxicados con MPTP**

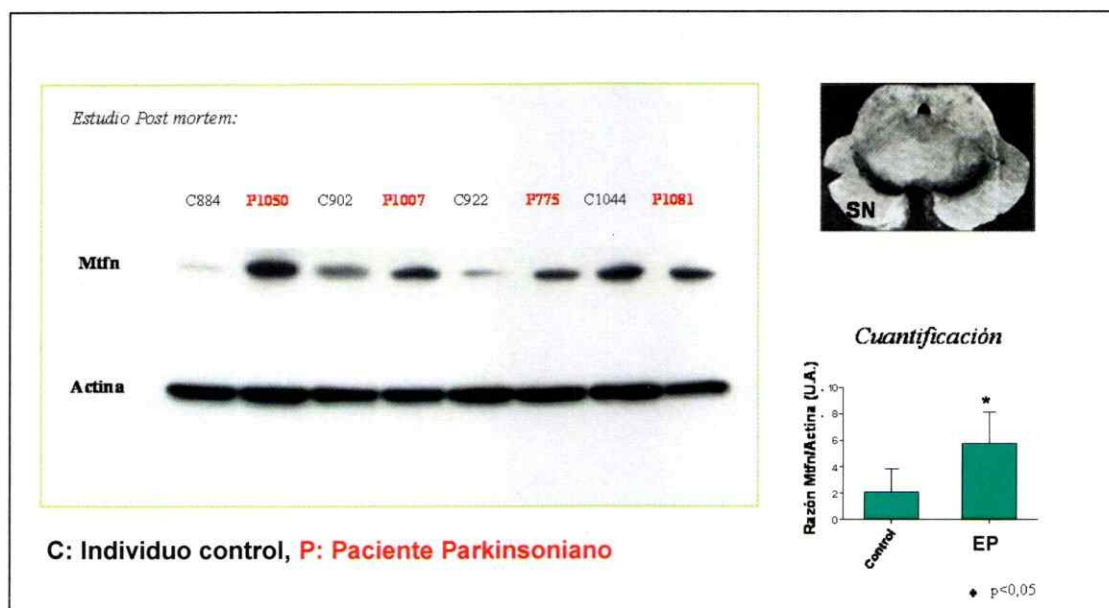
Con el objetivo de verificar si el aumento de Mtfn observado se produce en las neuronas dopaminérgicas de la SN, se realizó una Inmuno-histoquímica para la proteína, utilizando cerebros de ratones intoxicados con MPTP. Se observó un aumento en la expresión de Mtfn en las neuronas dopaminérgicas de la SN de los ratones intoxicados, comparado con los ratones controles inyectados con suero (Figura 23).



**Figura 23. MPTP produce un aumento en la expresión del transportador mitoferrina en neuronas dopaminérgicas de ratones intoxicados.** Ratones son inyectados con 20 mg de MPTP por Kg, cuatro veces al día, en un protocolo de intoxicación aguda (n=5 por día). Luego se obtiene el cerebro y se realizan cortes mesencefálicos de 20  $\mu$ m para el análisis mediante inmunohistoquímica de Mtfn. Rojo: Mtfn, verde: TH. (A) SNpc de ratones controles, (B) SNpc de ratones tratados con MPTP.

## 16. Determinar la expresión de mitoferrina en pacientes con la enfermedad de Parkinson

El siguiente objetivo fue estudiar la expresión de Mtfn en pacientes con la EP. Para esto, se utilizaron cortes mesencefálicos humanos fijados sobre porta objetos congelados. Los cortes fueron raspados, obteniéndose así la SNpc, luego se realizó una extracción proteica y un inmunoblot. Los pacientes de EP mostraron un aumento significativo en la expresión de Mtfn en comparación con los sujetos controles, (Figura 24). De esta forma, en este trabajo hemos demostrado que tanto en modelos de la EP como en pacientes con la EP, el transportador mitocondrial de Fe se encuentra significativamente aumentado.



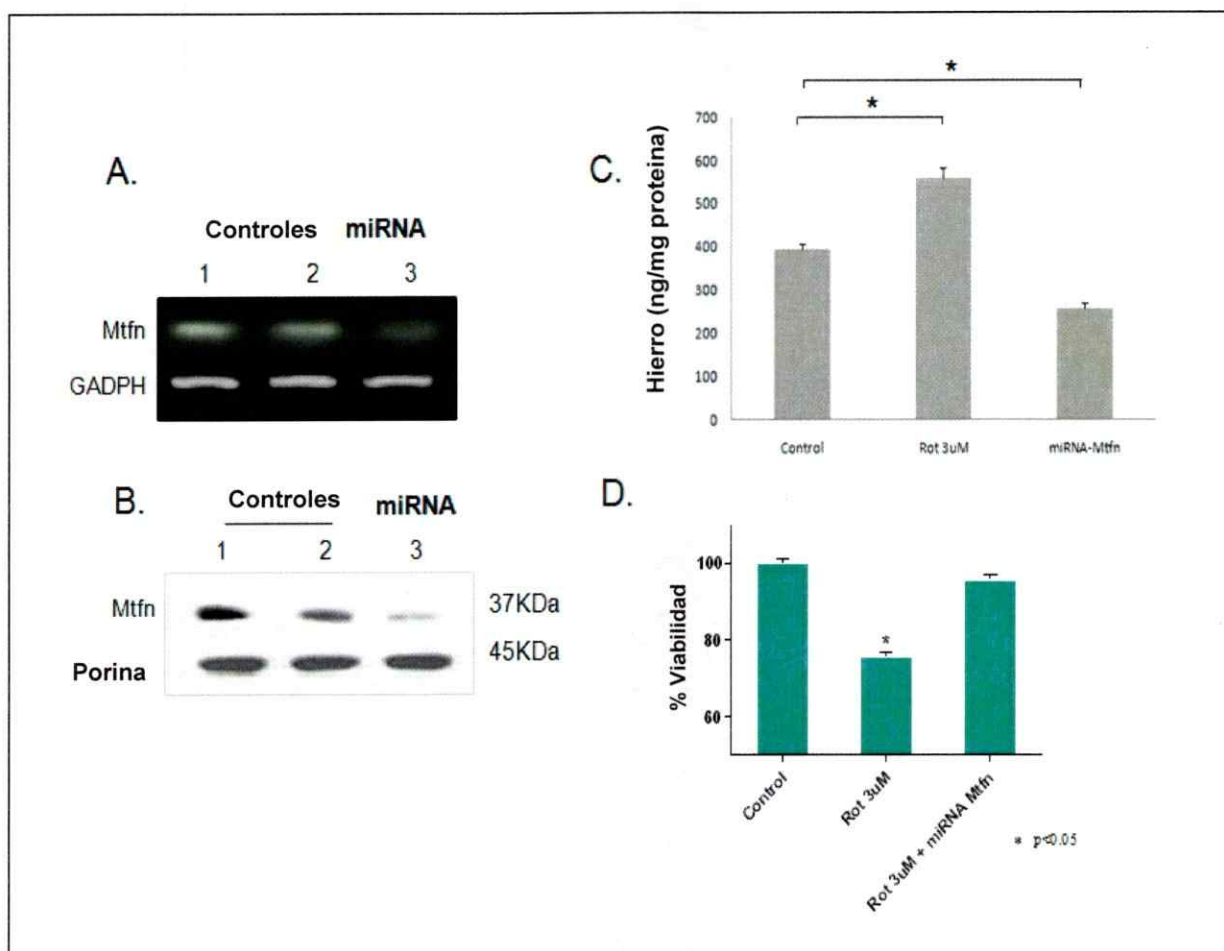
**Figura 24. Mitoferrina se encuentra sobre expresada en sustancia negra de pacientes con la enfermedad de Parkinson.** (A) Inmunoblot para Mtfn usando extractos de SNpc de individuos controles y pacientes con la EP. Actina fue usada como control de carga. Rojo: Pacientes con la EP, negro: individuos controles. (B) Cuantificación de A, \* p<0,05, n=3.

**17. Determinar el efecto knock down de la expresión de mitoferrina en la viabilidad y contenido de hierro en células SH-SY5Y**

El objetivo fue determinar la importancia de Mtfn en la viabilidad celular y su efecto sobre los niveles de Fe, posterior a una inhibición del complejo I.

Mediante análisis de mensajero (PCR) y proteína (western blot) se determinó la efectividad de un micro-ARN para Mtfn (miARN-Mtfn). De esta forma, el uso de un interferente que disminuya su expresión podría tener un papel protector, ya que evitaría el aumento del Fe mitocondrial. Así, se evaluó el efecto del interferente sobre la viabilidad y el contenido de Fe en células tratadas con rotenona, (Figura 25), siendo posible observar que al disminuir la expresión de Mtfn, el contenido de Fe disminuye y la viabilidad celular aumenta, provocando protección neuronal.

De esta forma, se puede plantear que el aumento observado en Mtfn, posterior a una inhibición del complejo I, produce un aumento en los niveles del Fe mitocondrial, afectando la viabilidad celular.



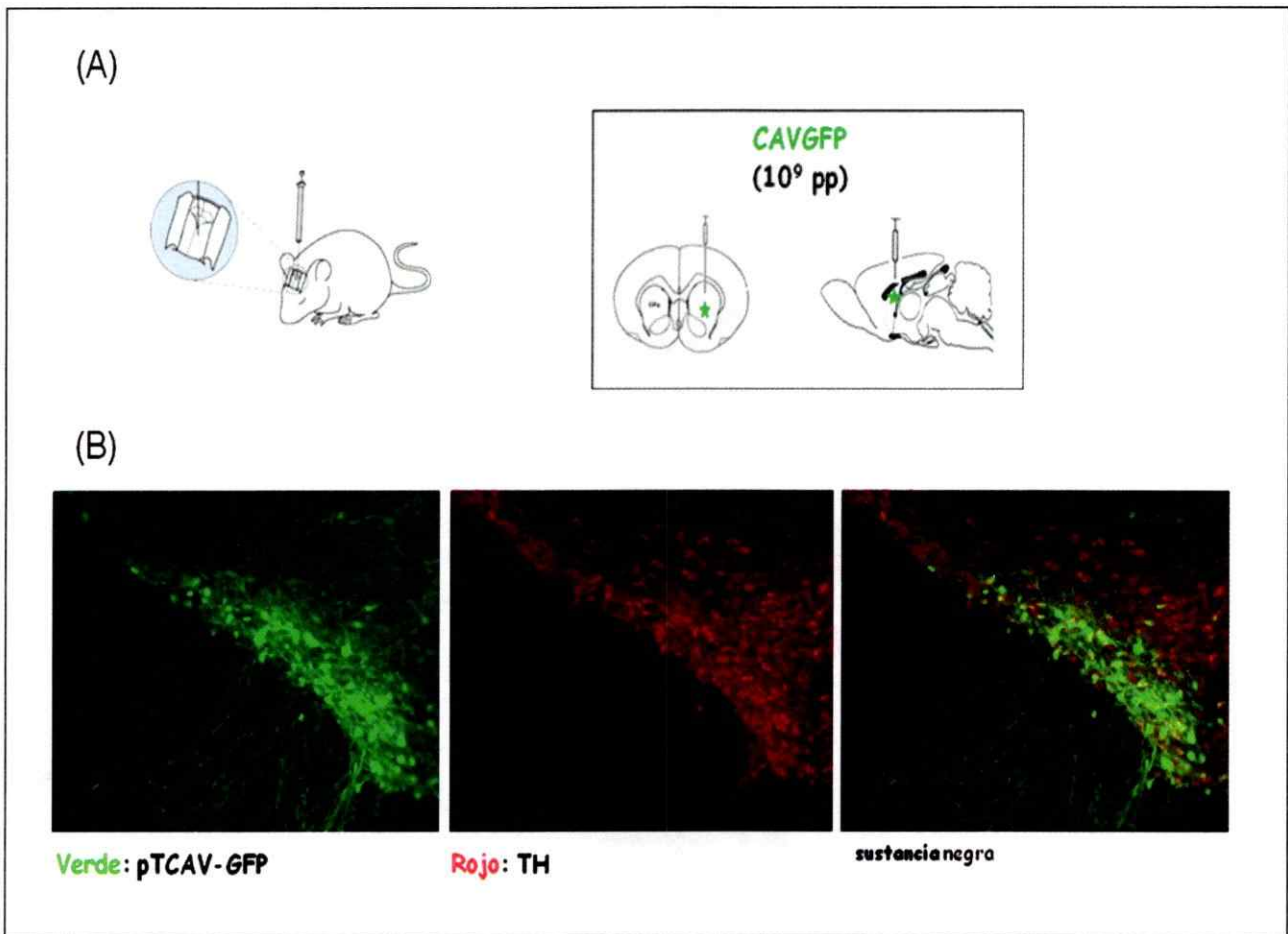
**Figura 25. Efecto de un miARN interferente para mitoferrina sobre la viabilidad celular y el contenido de hierro mitocondrial.** (A) Células SH-SY5Y fueron transfectadas, por 48 h, con un miARN para Mtfn (miARN-Mtfn). La expresión de Mtfn fue medida por RT-PCR. Carril 1: células sin transfectar, carril 2: células transfectadas con un vector control negativo, carril 3: células transfectadas con el miARN-Mtfn. GAPDH fue usado como control de carga. (B) Las células fueron tratadas como se menciona en A y luego de 48 h la expresión de Mtfn fue analizada por inmunoblot. Porina es usada como control de carga. (C) Efecto del miARN-Mtfn sobre el contenido de Fe mitocondrial. Células fueron tratadas con el miARN-Mtfn por 48 h o con rotenona, luego se realiza una extracción mitocondrial, y el contenido de Fe es determinado por espectrometría de masa. (D) Efecto del miARN-Mtfn sobre la viabilidad celular. Las células fueron tratadas con el miARN-Mtfn por 48 h y posteriormente con rotenona durante 24 h. la viabilidad fue determinada por el ensayo de MTT. \*  $p < 0,05$ ,  $n=3$ .

### **18. Producción de un virus con una secuencia interferente para mitoferrina**

Debido a los resultados obtenidos en cultivo celular e in vivo, se planteó como objetivo construir un virus que codifique una secuencia interferente para Mtfn. De esta forma, una disminución en la expresión del transportador produciría una baja en el contenido de Fe en las neuronas dopaminérgicas de la SN, lo que generaría protección.

Para esto se escogió un virus canino con una alta eficiencia de transducción neuronal. El virus fue inyectado estereotáxicamente en el estriado de los ratones y evaluado en animales intoxicados con MPTP, en relación a animales controles.

El primer objetivo, fue determinar la especificidad y el nivel de transducción del virus. Para esto se realizó una inmuno-histoquímica de SN, para Mtfn y tiroxina hidroxilasa (TH), marcador de neuronas dopaminérgicas. Los resultados mostraron que el virus tiene alta especificidad neuronal, transduciendo aproximadamente el 80% de la SNpc (Figura 26).

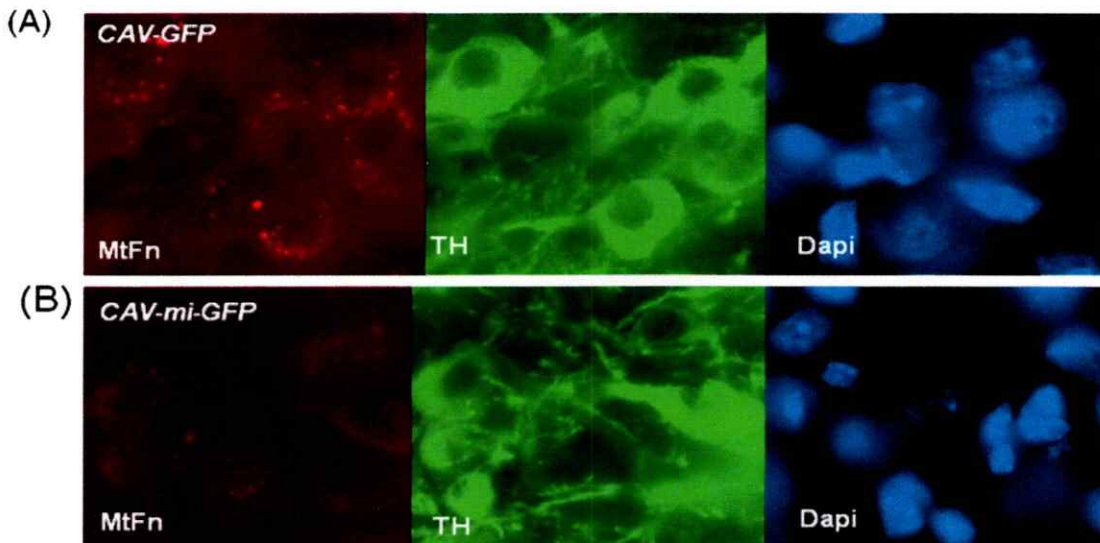


**Figura 26. Transducción del virus que lleva la secuencia de un miARN interferente para mito ferrina (CAV-GFP-mi) en sustancia negra de ratones.** (A) Ratones son inyectados estereotáxicamente en el estriado con  $10^9$  partículas virales. Las coordenadas utilizadas fueron antero posterior (AP): 1,0, lateral (L): 1,5, dorso ventral (DV): -3,5, fijadas desde el bregma. Diez días posterior a la inyección, los ratones son sacrificados, perfundidos en 4% PFA, crío preservados en 30% sacarosa y el cerebro es cortado en series de  $20\ \mu\text{m}$  en un micrótopo. (B) Luego se realiza una inmunohistoquímica de SN de los ratones. Verde: expresión de GFP, Rojo: expresión de TH.

### 19. Medición de la efectividad del virus producido

El segundo objetivo fue evaluar si el virus lograba disminuir significativamente la expresión de Mtn en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Para esto, posterior a la inyección viral, se realizó una inmuo histoquímica (como fue descrito previamente en la Figura 26). En este caso se evaluó la expresión de Mtn (color rojo) y de TH (color verde), siendo posible observar que en los ratones

inyectados con el virus que lleva el interferente, Mtn disminuye su expresión (Figura 27).



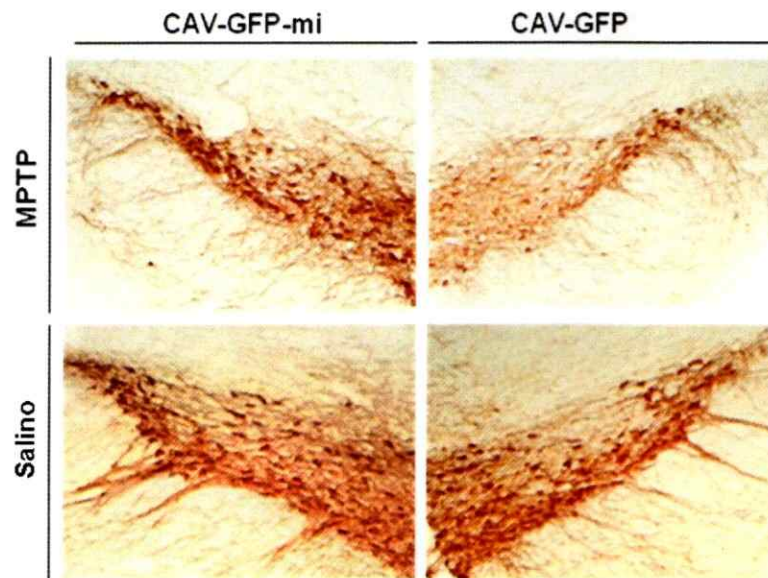
**Figura 27. Mitoferrina disminuye significativamente su expresión en ratones inyectados con el virus CAV-GFP-mi.** Ratones fueron inyectados estereotáxicamente con el virus que lleva un interferente para Mtn (CAV-GFP-mi). Diez días después se realizó una inmunohistoquímica para TH de la SNpc. En rojo: la expresión de Mtn, en verde la expresión de TH, en azul: tinción nuclear (Dapi). (A) Ratones inyectados con el virus CAV-GFP (control). (B) Ratones inyectados con el virus CAV-GFP-miRNA (interferente para Mtn).

Posteriormente, mediante técnicas estereológicas se realizó el conteo de neuronas dopaminérgicas presentes en la SNpc completa. Los resultados fueron expresados en un gráfico de número neuronal versus condición (MPTP o salino), (Figura 28), observándose que la disminución en la expresión de Mtn tiene un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra,

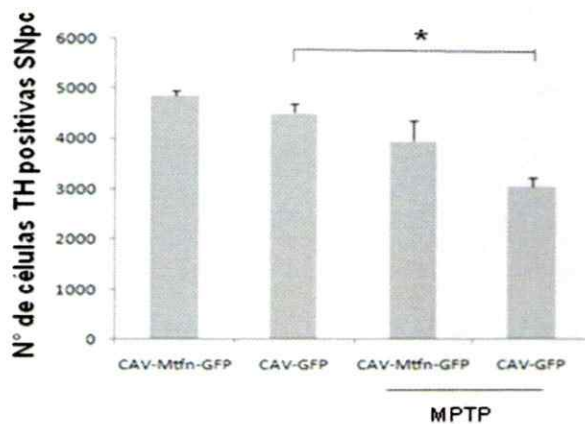


obteniéndose un mayor número de neuronas en los ratones tratados con el virus que lleva el interferente, respecto a los ratones inyectados con el virus control.

(A)



(B)



**Figura 28. Disminución de la expresión de mitoferina protege de la muerte neuronal en ratones intoxicados con MPTP.** Ratones fueron inyectados según la metodología descrita en la Figura 27. El número total de células TH positivas fue calculado por métodos estereológicos, usando el software de Explora Nova (La Rochelle, Francia), según el trabajo de German y colaboradores. (A) Inmuno Histoquímica anti TH para ratones inyectados con el virus (CAV-GFP o CAV-GFP-miMtn), intoxicados con MPTP o salino (controles). (B) Cuantificación del conteo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, \*  $p < 0,05$ .

De esta forma, según los datos obtenidos en nuestro sistema in vivo, es posible postular que Mfn tiene un papel fundamental, en la regulación de la sobrevivencia neuronal en la EP.

## Discusión

### **1. Disfunción mitocondrial y enfermedad de Parkinson**

Entre los signos patognomónicos de la EP se encuentran la disminución en la actividad del complejo I mitocondrial, una excesiva acumulación de Fe y un aumento en los niveles de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Przedborski y col., 2003).

En particular, una serie de evidencias clínicas y experimentales apoyan una conexión entre la disfunción mitocondrial y la patología en la EP. Estudios en tejido *post mortem* han reportado una disminución en la actividad del complejo I en SN de pacientes con la EP (Schapira y col., 1990). Estos estudios siguieron al descubrimiento de que la exposición en humanos a MPTP, un potente inhibidor del complejo I mitocondrial, produjo en días la pérdida de neuronas de la SNpc y del control del movimiento, similares a los observados en la EP (Langston y col., 1983). La administración a roedores del pesticida rotenona y 6-OHDA, ambos inhibidores del complejo I, produjeron eventos similares a los observados con MPTP (Betarbet y col., 2000).

Del mismo modo, existen variadas evidencias experimentales que relacionan el aumento en los niveles de Fe y la patología. Estudios en tejido *post-mortem* mostraron un incremento en los niveles de Fe en la SNpc de pacientes enfermos comparados con sujetos controles (Sofic y col., 1988; Dexter y col., 1989; Hirsch y

col., 1991). Este resultado fue posteriormente confirmado por estudios de ultrasonido, NMR (Gorell y col., 1995; Berg y col., 1999) y en animales inyectados con MPTP (He y col., 2003).

Sobre estas bases y la observación preliminar que la inhibición del complejo I resulta en el aumento de la actividad del regulador de la homeostasis del Fe IRP-1, en esta tesis postulamos que los eventos de inhibición del complejo I mitocondrial y de acumulación de Fe están relacionados.

## ***2. Efectos de la inhibición del complejo I mediada por rotenona, en la homeostasis del Fe***

La inhibición del complejo I mitocondrial por rotenona en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y produjo las siguientes modificaciones en la homeostasis del Fe: i) aumento en la expresión del transportador mitocondrial de Fe Mtfn, ii) aumento en la expresión de FTX, la chaperona mitocondrial del Fe iii) aumento de HSP-70 y Grx2, chaperonas mitocondriales participantes en la síntesis de núcleos Fe-S, iv) aumento en los niveles del LIP citosólico y mitocondrial, v) aumento en la expresión de DMT-1 y disminución en la expresión de FP.

A continuación se discuten los posibles efectos de los cambios observados.

Mtfn es una proteína descubierta en el año 2006 (Shaw y col., 2006) de la cual se desconoce su mecanismo de regulación. Por esta razón, inicialmente determinamos su posible regulación por los niveles celulares de Fe, encontrando que el Fe regula negativamente su expresión. Este fue un resultado esperado,

aunque no previamente descrito, puesto que la disminución en la expresión del transportador es una estrategia lógica para evitar que los niveles mitocondriales del metal lleguen a ser tóxicos.

Posteriormente, determinamos que la inhibición del complejo I resultó en un notable aumento en la expresión de Mtfn, respuesta que podría tener consecuencias nocivas para la integridad mitocondrial, debido a un putativo aumento del daño oxidativo asociado a la química redox del Fe.

El efectivo aumento del Fe redox-activo mitocondrial bajo estas condiciones, fue evaluado mediante la determinación del LIP. Los resultados mostraron un aumento significativo de este, posterior al tratamiento. Este resultado es el primero en indicar que la inhibición del complejo I induce una desregulación en el metabolismo del Fe, aumentando conjuntamente la expresión de Mtfn y el LIP mitocondrial. El aumento de este LIP muy probablemente, induce una carga oxidativa extra a la mitocondria, que se sumaría a la producción aumentada de ROS debido a la inhibición del complejo I.

FTX es la proteína encargada de traspasar el Fe que ingresa por Mtfn a la proteína andamio Isu1 (Yoon y col., 2003; Bou y col., 2004). Encontramos que Ftx aumentó su expresión posterior a los tratamientos con rotenona. El hecho que ocurra un aumento en la expresión de FTX es concordante con lo observado con Mtfn, puesto que si aumenta el transportador, y con este los niveles de Fe, la chaperona FTX también debería aumentar, para así ser capaz de unir los niveles adecuados de Fe que ingresan a la mitocondria y entregarlos para su utilización.

Grx2 y HSP-70 participan en la síntesis de los núcleos Fe-S, traspasando el núcleo armado desde Isu1 a la apo-proteína receptora (Rouhier y col; 2010; Wiedemann y col., 2006; Adam y col., 2006). Los resultados indicaron que ambas proteínas aumentan su expresión posterior al tratamiento con rotenona. Así, siguiendo el mismo razonamiento anterior, un aumento en Mtfn, LIP mitocondrial y FTX hacen consecuente un aumento en Grx2 y HSP70.

Como anteriormente ha sido reportado, en modelos de la EP existe una desregulación de los transportadores de Fe presentes en la membrana plasmática. Así, se ha observado un aumento en la expresión del transportador de entrada de Fe a la célula DMT-1 (Salazar y col., 2008) y una disminución del transportador de salida FP (Song y col., 2010), eventos que conjuntamente conducen a un aumento en los niveles de Fe celular.

Para determinar si la desregulación de estos transportadores es consecuencia de una inhibición del complejo I mitocondrial, se evaluó su expresión posterior al tratamiento con rotenona. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de DMT-1 y una disminución en la expresión de FP. Adicionalmente, medimos el nivel de LIP citosólico encontrando un aumento de este. Estos resultados tienen gran relevancia, puesto que muestran que la inhibición del complejo I produce una desregulación general, tanto en la mitocondria como en el citosol, de la homeostasis del Fe, lo que resulta en el aumento del pool de Fe redox-activo en ambos compartimentos.

### **3. ¿Evento primario: mitocondria o citosol?**

Si analizamos el conjunto de los cambios mitocondriales y citosólicos, los resultados obtenidos indican dos posibles escenarios. En el primero, la inhibición del complejo I produciría inicialmente una disminución de ATP y aumento de estrés oxidativo, lo que llevaría a una desregulación de las proteínas mitocondriales del metabolismo del Fe, aumento del LIP mitocondrial y el posterior aumento en la expresión de los transportadores citosólicos (alteración del metabolismo celular). Y la segunda, la desregulación primaria de un factor citosólico, como por ejemplo la sobre-expresión de DMT-1, que aumente los niveles de Fe, estrés oxidativo y esto afecte la actividad del complejo I.

#### **3.1. La mitocondria como el lugar inicial de la desregulación**

La mitocondria es el lugar por excelencia de utilización del Fe. En ella se llevan a cabo mecanismos fundamentales para su utilización biológica, como son la síntesis de los núcleos Fe-S y del grupo hemo (Rouault y col., 2005).

Como los resultados indican, varias proteínas del metabolismo de los núcleos Fe-S aumentan su expresión posterior a la inhibición del complejo I. En esta tesis, postulamos como hipótesis que probablemente este aumento sea una respuesta fisiológica coordinada para suplir una baja en la síntesis de los núcleos Fe-S, siendo estos núcleos la señal que le indica a la célula los niveles adecuados de su síntesis, y con esto, las concentraciones de Fe que la mitocondria y el citosol deben adquirir.



Postulamos, que la baja observada en los niveles de ATP, debidos a la inhibición del complejo I producen una menor actividad de ABC-B7, el transportador dependiente de ATP que transporta núcleos Fe-S desde la mitocondria al citosol, además de una baja en la actividad de la chaperona HSP-70, la que también necesita ATP para su función. Esto se traduciría en una disminución de núcleos Fe-S en el citosol y en la mitocondria, señal que le indicaría a la célula aumentar la concentración citosólica y mitocondrial de Fe, a través de un aumento de expresión de transportadores y otras proteínas con en fin de aumentar la síntesis de los núcleos. A nivel celular se modificarían los transportadores citosólicos (DMT-1 y FP) para así aumentar la disponibilidad de Fe a ser transportado a la mitocondria

Adicionalmente, si consideramos que el complejo I contiene 8 núcleos Fe-S (Sheftel y col., 2009), una alteración en el metabolismo de los núcleos, producida por rotenona, podría generar un círculo vicioso de mayor inhibición del complejo I.

### ***3. 2. El citosol como el lugar inicial de la desregulación***

Ahora bien, si pensamos que la inhibición del complejo I se relaciona con un evento inicial ocurrido en el citosol, podemos pensar en DMT-1. La literatura (Salazar y col., 2006) indica que el transportador se encuentra sobre-expresado en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que podría producir un aumento considerable de la concentración de Fe en estas neuronas. De esta forma, el aumento de Fe traería como consecuencia un aumento en los niveles de estrés oxidativo, lo que finalmente se podría traducir en una inhibición del complejo I,

desencadenando la alteración en el metabolismo de los núcleos Fe-S anteriormente descrita.

En esta tesis, se escogió la primera de las dos hipótesis planteadas, postulando una relación causal entre la inhibición del complejo I, la posterior alteración en el metabolismo de los núcleos Fe-S y, finalmente, la desregulación de la homeostasis celular del Fe.

Subsecuentemente, se planteo como objetivo analizar la actividad de diferentes enzimas, tanto citosólicas como mitocondriales que contienen núcleos Fe-S en su estructura. Esto bajo la lógica que si la síntesis de los núcleos Fe-S se encuentra alterada, entonces la actividad de enzimas que contienen estos núcleos debieran presentar una disminución en su actividad. Las actividades enzimáticas analizadas fueron: aconitasa citosólica/IRP-1, aconitasa mitocondrial, xantina oxidasa y glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa.

La enzima aconitasa citosólica es una enzima involucrada en la conversión de citrato en isocitrato, participando adicionalmente en la síntesis de ácidos grasos en el ciclo del glioxilato (Wang y col., 2008). Cuando la enzima pierde su núcleo Fe-S, esta sufre una interconversión a su isoforma IRP-1, la cual regula positivamente la expresión de proteínas involucradas en la incorporación de Fe a la célula (DMT-1, RTf) y negativamente la expresión de las proteínas de salida (FP) y de almacenamiento (ferritina) de Fe (Eisenstein y Blemings, 1998). Los resultados

indicaron que posterior a los tratamientos con rotenona, la actividad aconitasa disminuyó con un aumento consecuente en su actividad IRP-1.

El aumento en la actividad IRP-1 tendrá como consecuencia directa un aumento en la expresión de DMT1 y una disminución en la expresión de FP, resultado que concuerda con lo descrito anteriormente sobre la expresión de ambas proteínas, en respuesta a rotenona. La observación de que la actividad IRP-1 aumentó, relaciona directamente la inhibición del complejo I con las proteínas destinadas a aumentar la concentración de Fe intracelular. Adicionalmente, el aumento en la actividad IRP-1 podría producir una disminución en la expresión de ferritina, de ALAs (primera enzima del metabolismo del hemo), de la aconitasa mitocondrial, y el aumento del RTf (Henderson y col., 1996).

De esta forma, la alteración producida por la inhibición del complejo I mitocondrial modifica profundamente la homeostasis del Fe y otras funciones celulares, provocando directamente un aumento en los niveles de Fe celular, disminución en la síntesis de núcleos Fe-S, en la síntesis de los grupos hemo y una disminución mayor en la actividad del complejo I mitocondrial.

La medición de actividad de la aconitasa mitocondrial dio cuenta de una disminución de esta, posterior al tratamiento con rotenona, resultado que apoya las conclusiones anteriores. De manera complementaria, la determinación del punto isoeléctrico de la proteína indicó la pérdida de la integridad de los núcleos Fe-S. Esta observación apoya la conclusión que la inhibición del complejo I resulta

en la disminución de la síntesis de núcleos Fe-S. Una pérdida de actividad de la aconitasa mitocondrial podría traer como consecuencia la disminución en la actividad del ciclo de Krebs y la disminución adicional de la producción de ATP lo que, como fue planteado anteriormente, podría afectar mayormente la síntesis de los núcleos Fe-S y así transformarse en un círculo vicioso de mayor inhibición del complejo I.

Evidencias en la literatura indican que la integridad de los núcleos Fe-S puede ser afectada por dos eventos (1) problemas en su síntesis y (2) daño del núcleo debido a estrés oxidativo (Bulteau y col; 2005, 2006, Martelli y col; 2007). Un efecto inhibitorio debido al aumento en los niveles de estrés oxidativo no puede ser descartado, por lo que adicionalmente se determinó la actividad de otras dos enzimas que contienen núcleos Fe-S, XO y GPAT. Los resultados indicaron que el tratamiento con rotenona produjo una baja en la actividad de XO una disminución de la concentración de GPAT madura, debido probablemente a una síntesis disminuida de sus núcleos Fe-S.

De esta forma, los resultados obtenidos para las aconitasas, XO y GPAT dan cuenta que, posterior a la inhibición del complejo I, ocurre una alteración en la actividad de enzimas citosólicas y mitocondriales que contiene núcleos Fe-S.

Adicionalmente, es importante considerar el posible efecto sobre otras proteínas que contienen núcleos Fe-S en su estructura. Un ejemplo importante corresponde a la proteína NTH1, una endonucleasa III, involucrada en la reparación de bases

oxidadas del ADN. De esta forma, la disminución en la síntesis de núcleos Fe-S probablemente afecte su actividad, aumentando el daño oxidativo al ADN.

Otro posible efecto que podría producir la alteración del metabolismo de los núcleos Fe-S, es la disminución de la síntesis de grupos hemo. Ha sido descrito que una mutación en la proteína Grx5, esencial en el metabolismo de los núcleos Fe-S, produce una severa anemia en peces. Las investigaciones indicaron que mutaciones en la proteína afectaba la síntesis de los núcleos y disminuía la síntesis del grupo hemo (Wingert y col., 2005). Muy probablemente, esto se debe a que la síntesis de los núcleos Fe-S y de hemo se encuentra interconectada por la enzima ferroquelatasa, que cataliza la asociación de Fe con protoporfirina IX para formar el hemo. La enzima presenta un núcleo Fe-S en su estructura, el cual es esencial para su función (Dailey y col., 1994). De este modo, se ha visto que cuando los niveles de núcleos bajan, la actividad de esta enzima también lo hace afectando directamente la síntesis del hemo, produciendo finalmente anemia (Ye y col., 2010).

Interesantemente, el aumento en la expresión de FTX observada en esta tesis, es una evidencia adicional que apunta a una disminución en la síntesis del grupo hemo. Datos de literatura indican que a mayor expresión de FTX, menor es la expresión de proteínas del metabolismo del hemo. Esto debido a que el sistema se regularía para dar preferencia a la síntesis de los núcleos Fe-S, aumentando la expresión de las proteínas relacionadas a su metabolismo (entre ellas FTX) y disminuyendo la expresión de las relacionadas al metabolismo del hemo, y con

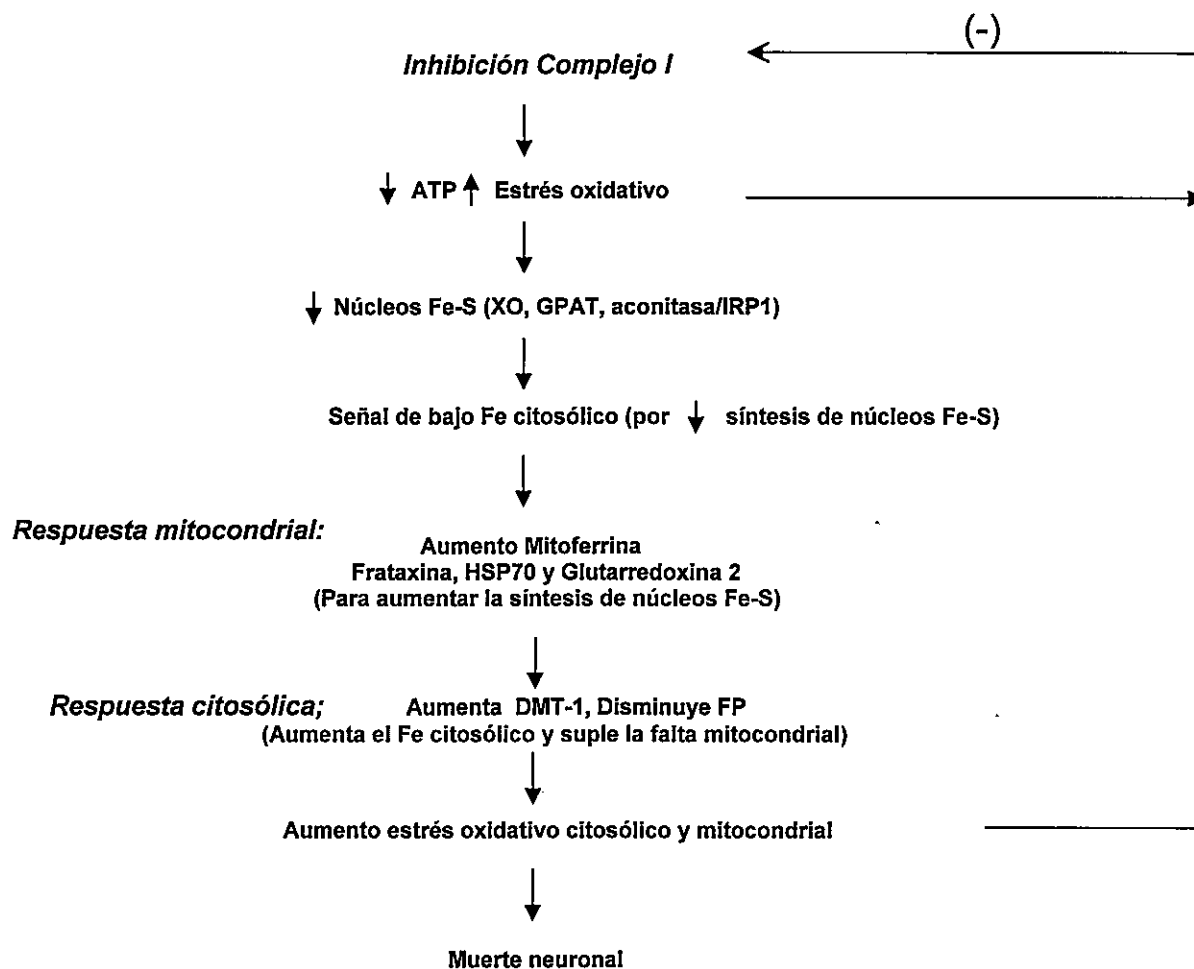
esto la disminución de los niveles de Fe destinado a su síntesis (Seguin y col., 2009)

#### ***4. Inhibición del complejo I mitocondrial y estrés oxidativo***

Debido a que la toxicidad del Fe redox-activo es directamente proporcional a su concentración (Borquez y col., 2008), los aumentos de LIP observados tanto a nivel mitocondrial como citoplasmático y la inhibición del complejo I, tras tratamientos con rotenona predijeron un aumento en los niveles de estrés oxidativo. La producción del radical superóxido, la carbonilación de proteínas y la actividad de la enzima SOD como respuesta celular, indicaron que este fue el caso.

Adicionalmente, el aumento de ROS podría generar un ciclo de retroalimentación positivo entre la inhibición del complejo I y los niveles de estrés oxidativo. Experimentos en sinaptosomas mitocondriales indican que concentraciones bajas de  $H_2O_2$  disminuyen un 10 % la actividad del complejo I mitocondrial. Este efecto del  $H_2O_2$  se demostró ser aditivo a una inhibición parcial del complejo I inducido por pequeñas concentraciones de rotenona ( $5\text{ nM}$ - $1\text{ }\mu\text{M}$ ) (Chinopoulos y Adan-Visi, 2001). Similarmente, partículas sub-mitocondriales expuestas a  $O_2\cdot-$ ,  $H_2O_2$  u  $OH$  presentan una baja en la actividad de la NADH deshidrogenasa, un marcador de la actividad del complejo I (Zhang y col., 1990).

De esta forma, resumiendo los datos obtenidos en cultivo celular, proponemos el siguiente modelo:



En este modelo, la inhibición del complejo I mitocondrial induce un círculo vicioso en el que una disminución en los niveles de ATP producen una baja en la síntesis

de los núcleos Fe-S, aumento en la actividad IRP-1, generando así una falsa señal de carencia de Fe. En la mitocondria, esto trae como consecuencia un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con el transporte de Fe (Mtfn) y la síntesis de núcleos Fe-S (FTX, Grx2 y HSP-70). A nivel citosólico, el aumento en la actividad IRP1 resulta en un aumento en los niveles de DMT-1 y una baja en los de FP. Ambas respuestas llevan a un aumento en los niveles de Fe citosólico y mitocondrial, lo que resulta en un aumento del daño oxidativo y finalmente en la muerte neuronal.

##### ***5. Análisis del rol de mitoferrina en la enfermedad de Parkinson***

Debido al rol de Mtfn en el transporte de Fe a la mitocondria y a los datos obtenidos en esta tesis sobre su desregulación en el modelo celular de inhibición del complejo I, nos planteamos como objetivo estudiar en el modelo animal de la EP, su relevancia en la neurodegeneración producida por MPTP. Encontramos que tanto el tejido de los pacientes con la EP como la SN de ratones intoxicados con MPTP, presentaron un aumento en la expresión de Mtfn. Debido a que este aumento podría resultar en el aumento de los niveles de Fe mitocondrial, su desregulación podría ser un elemento clave en la patogénesis de la enfermedad. De este modo, estudiamos los efectos de su acallamiento en SNpc, mediante la inyección estereotáxica de un virus con alta capacidad de transducción neuronal, que contiene una secuencia interferente para Mtfn. Los resultados mostraron que el acallamiento de Mtfn resultó en la protección de las neuronas de la SNpc de la muerte inducida por MPTP. Este resultado indica que posiblemente el aumento en los niveles de Fe mitocondrial es central en la muerte neuronal observada en la EP



y señalan a Mtn como un posible blanco terapéutico para lograr un enlentecimiento del proceso neurodegenerativo.

## Conclusiones

A través del modelo celular de la EP de inhibición del complejo I mitocondrial, rotenona, fue posible obtener las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con rotenona de células dopaminérgicas en cultivo produjo:
  - (a) Desregulación de la expresión de proteínas mitocondriales: aumento en la expresión de Mtfn, FTX, Grx2 y HSP70.
  - (b) Aumento en los niveles de LIP mitocondrial
  - (c) Desregulación de transportadores celulares de Fe: aumento en la expresión de DMT-1 y disminución en la expresión de FP.
  - (d) Aumento en los niveles de LIP citosólico
  - (e) Desregulación de la actividad de proteínas que contiene núcleos Fe-S: disminución de la actividad de aconitasa citosólica y mitocondrial, de XO y de GPAT.
  - (f) Aumento de los niveles de estrés oxidativo
  
2. El modelo animal de la EP inducida por intoxicación con MPTP, indicó:
  - (a) Aumento en la expresión del transportador Mtfn
  - (b) Aumento en los niveles del LIP mitocondrial

3. La inyección estereotáxica de un virus que lleva un interferente para la secuencia de Mtn indicó que el acallamiento de la expresión del transportador produce protección neuronal en el modelo de MPTP de la EP, postulando a Mtn como un posible blanco terapéutico para la enfermedad.

Así, podemos concluir que esta tesis aporta al conocimiento básico sobre la desregulación del metabolismo del Fe derivado de la inhibición del complejo I mitocondrial y con conocimiento aplicado, presentando a Mtn como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

## Proyecciones a futuro

Entre las posibles proyecciones a futuro del trabajo realizado se encuentran:

(i) Lograr determinar en un estudio temporal el orden de los eventos descritos en esta tesis, para así discernir cuales son los eventos primarios y secundarios, posteriores a la inhibición del complejo I.

(ii) Determinar lo que ocurre con el metabolismo del hemo en modelos de la EP y evaluar su posible relación con el proceso neurodegenerativo.

(iii) Realizar un estudio de la actividad del transportador de núcleos Fe-S de la mitocondria, la proteína ABC-B7, para lograr entender a mayor cabalidad cómo en un modelo de la EP se altera este sistema, probablemente sería asertivo estudiar lo que sucede con la sobre-expresión del transportador en modelos de la EP, para así lograr saber si su aumento logra producir un efecto de aumento de núcleos en el citosol, y esto contrarrestar los resultados encontrados.

Del mismo modo, sería importante estudiar qué sucede luego de una disminución en la expresión del transportador y ver si esto logra recapitular los eventos descritos, para así determinar si este es o no un evento clave en la desregulación del metabolismo del Fe mitocondrial.

## Bibliografia

- Adam, A.C., Bornhovd, C., Prokisch, H., Neupert, W., and Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J* 25, 174-183.
- Alvarez, B., and Radi, R. (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25, 295-311.
- Ammer, H., and Schulz, R. (1994). Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with changes in the abundance of G proteins. *J Neurochem* 62, 1310-1318.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Hilliker, A.J., and Phillips, J.P. (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14, 3397-3405.
- Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (1998). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7659-7663.
- Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C., and De Menezes, S.L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32, 841-859.
- Babcock, G.T. (1999). How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12971-12973.
- Banerjee, R., Starkov, A.A., Beal, M.F., and Thomas, B. (2009). Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1792, 651-663.
- Berg, D., Grote, C., Rausch, W.D., Maurer, M., Wesemann, W., Riederer, P., and Becker, G. (1999). Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 25, 901-904.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20, 415-455.
- Bertrand, E., Lechowicz, W., Szpak, G.M., and Dymecki, J. (1997). [Current views on the mechanisms of dopaminergic neuron death of the nigrostriatal system in Parkinson's disease]. *Neurol Neurochir Pol* 31, 295-302.
- 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.
- Bezard, E., Crossman, A.R., Gross, C.E., and Brotchie, J.M. (2001). Structures outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *FASEB J* 15, 1092-1094.
- Blackinton, J., Ahmad, R., Miller, D.W., van der Brug, M.P., Canet-Aviles, R.M., Hague, S.M., Kaleem, M., and Cookson, M.R. (2005). Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 76-83.

Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., van Duijn, C.M., Oostra, B., Meco, G., *et al.* (2003a). DJ-1 ( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24, 159-160.

Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joesse, M., *et al.* (2003b). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259.

Borquez D., Valdes P. Núñez M. (2008). Iron toxicity: a critical review on its Rol in Parkinson's Disease. Department of biology, Faculty of science, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Santiago Chile. Book: Neurodegenerative Disease. From molecular concepts to therapeutic targets

Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., and Dennis Chasteen, N. (2004). Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of Escherichia coli. *J Mol Biol* 341, 605-615.

Britton, R.S., Leicester, K.L., and Bacon, B.R. (2002). Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol* 76, 219-228.

Bulteau, A.L., Ikeda-Saito, M., and Szewda, L.I. (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42, 14846-14855.

Bulteau, A.L., Lundberg, K.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szewda, L.I. (2005). Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5987-5991.

Burkitt, M.J. (2003) Chemical, biological, and medical controversies surrounding the Fenton reaction. *Prog. React. Kinet. Mech.* 28,75.

Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.

Camaschella, C. (2009). Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Semin Hematol* 46, 371-377.

Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Levi, S., Verardi, R., Zanella, I., Derosas, M., Ingrassia, R., Corrado, M., and Arosio, P. (2007). RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* 109, 3552-3559.

Cicchetti, F., Brownell, A.L., Williams, K., Chen, Y.I., Livni, E., and Isacson, O. (2002). Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15, 991-998.

Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., and Moncada, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7631-7636.

Conn, K.J., Ullman, M.D., Larned, M.J., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E., and Wells, J.M. (2003). cDNA microarray analysis of changes in gene expression associated with MPP+ toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* 28, 1873-1881.

Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T., Jr. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563.

Csere, P., Lill, R., and Kispal, G. (1998). Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p. *FEBS Lett* 441, 266-270.

Chen, O.S., Hemenway, S., and Kaplan, J. (2002). Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12321-12326.

Chinopoulos, C., and Adam-Vizi, V. (2001). Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 76, 302-306.

Dailey, H.A., Finnegan, M.G., and Johnson, M.K. (1994). Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. *Biochemistry* 33, 403-407.

de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., *et al.* (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, S21-23.

de Rijk, M.C., Rocca, W.A., Anderson, D.W., Melcon, M.O., Breteler, M.M., and Maraganore, D.M. (1997a). A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology* 48, 1277-1281.

de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., and Rocca, W.A. (1997b). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 10-15.

Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52, 1830-1836.

Drapier, J.C., and Hibbs, J.B., Jr. (1988). Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 140, 2829-2838.

Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002). A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11, 2635-2643.

Eisenstein, R.S., and Blemings, K.P. (1998). Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr* 128, 2295-2298.

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991, 1-14.

Ferraro, T.N., Golden, G.T., DeMattei, M., Hare, T.A., and Fariello, R.G. (1986). Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology* 25, 1071-1074.

Foury, F., and Roganti, T. (2002). Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 277, 24475-24483.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112.

Gao, H.M., Hong, J.S., Zhang, W., and Liu, B. (2003). Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23, 1228-1236.

Gardner, P.R., Costantino, G., Szabo, C., and Salzman, A.L. (1997). Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J Biol Chem* 272, 25071-25076.

Garrick, M.D., and Garrick, L.M. (2009). Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta* 1790, 309-325.

German, D.C., Nelson, E.L., Liang, C.L., Speciale, S.G., Sinton, C.M., and Sonsalla, P.K. (1996). The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* 5, 299-312.

Ghio, A.J., Turi, J.L., Yang, F., Garrick, L.M., and Garrick, M.D. (2006). Iron homeostasis in the lung. *Biol Res* 39, 67-77.

Goetz, C.G., Lutge, W., and Tanner, C.M. (1986a). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology* 36, 73-75.

Goetz, C.G., Tanner, C.M., Levy, M., Wilson, R.S., and Garron, D.C. (1986b). Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1, 45-49.

Gorell, J.M., Ordidge, R.J., Brown, G.G., Deniau, J.C., Buderer, N.M., and Helpert, J.A. (1995). Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology* 45, 1138-1143.

Greenacre, S.A., and Ischiropoulos, H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34, 541-581.

Gu, M., Owen, A.D., Tofta, S.E., Cooper, J.M., Dexter, D.T., Jenner, P., Marsden, C.D., and Schapira, A.H. (1998). Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci* 158, 24-29.

Guillon, B., Bulteau, A.L., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J.C., and Bouton, C. (2009). Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J* 276, 1036-1047.

Halliwel, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634-1658.

Halliwel, B., and Gutteridge, J.M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307, 108-112.

Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minakami, S., and Takeshige, K. (1997). A Dual Effect of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-Analogues on the Respiratory Chain of Bovine Heart Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 337, 69-74.

Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y., and Minakami, S. (1990). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 1049-1055.

He, Y., Thong, P.S., Lee, T., Leong, S.K., Mao, B.Y., Dong, F., and Watt, F. (2003). Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys. *Free Radic Biol Med* 35, 540-547.



- Henderson, B.R., Menotti, E., and Kuhn, L.C. (1996). Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences. *J Biol Chem* 271, 4900-4908.
- Hirsch, E.C., Brandel, J.P., Galle, P., Javoy-Agid, F., and Agid, Y. (1991). Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 56, 446-451.
- Hoglinger, G.U., Oertel, W.H., and Hirsch, E.C. (2006). The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection. *J Neural Transm Suppl*, 269-272.
- Hunot, S., and Hirsch, E.C. (2003). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S49-58; discussion S58-60.
- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., and Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 162, 1-10.
- Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111, 163-169.
- Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2, 141-151.
- Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenberg-Hogenkamp, B.J., and Rodenburg, R.J. (2007). Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem* 53, 729-734.
- Kakhlon, O., Breuer, W., Munnich, A., and Cabantchik, Z.I. (2010). Iron redistribution as a therapeutic strategy for treating diseases of localized iron accumulation. *Can J Physiol Pharmacol* 88, 187-196.
- Kakhlon, O., and Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* 33, 1037-1046.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J.Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M.F., *et al.* (2003). Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37, 899-909.
- Kim, W.G., Mohny, R.P., Wilson, B., Jeohn, G.H., Liu, B., and Hong, J.S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20, 6309-6316.
- Lancaster, J.R., Jr., and Hibbs, J.B., Jr. (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1223-1227.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Li, L., and Kaplan, J. (2004). A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J Biol Chem* 279, 33653-33661.
- Liang, L.P., and Patel, M. (2004). Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J Neurochem* 90, 1076-1084.
- Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5, 1403-1409.

- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831-838.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., and Muhlenhoff, U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1763, 652-667.
- Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30, 133-141.
- Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77, 669-700.
- Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet* 16, 2651-2658.
- Mazariegos, D.I., Cabantchik, Z.I., Cassels, B.K., and Nunez, M.T. (2006). Characterization of mitochondrial iron uptake in HepG2 cells. *Biol Res* 39, 199-201.
- McNaught, K.S., and Olanow, C.W. (2006). Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 60, 243-247.
- Meister, A. (1995). Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1271, 35-42.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saille, C., and Ceballos-Picot, I. (1998). Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 56, 645-655.
- Mizuno, Y., Sone, N., and Saitoh, T. (1987). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48, 1787-1793.
- Mochizuki, H., Imai, H., Endo, K., Yokomizo, K., Murata, Y., Hattori, N., and Mizuno, Y. (1994). Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys. *Neurosci Lett* 168, 251-253.
- Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjorringe, T., and Morgan, E.H. (2007). Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 103, 1730-1740.
- Napier, I., Ponka, P., and Richardson, D.R. (2005). Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 105, 1867-1874.
- Nunez-Millacura, C., Tapia, V., Munoz, P., Maccioni, R.B., and Nunez, M.T. (2002). An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *J Neurochem* 82, 240-248.
- Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348, 1356-1364.
- Perier, C., Bove, J., Vila, M., and Przedborski, S. (2003). The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 26, 345-346.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

Pondarre, C., Antiochos, B.B., Campagna, D.R., Clarke, S.L., Greer, E.L., Deck, K.M., McDonald, A., Han, A.P., Medlock, A., Kutok, J.L., *et al.* (2006). The mitochondrial ATP-binding cassette transporter *Abcb7* is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* 15, 953-964.

Pondarre, C., Campagna, D.R., Antiochos, B., Sikorski, L., Mulhern, H., and Fleming, M.D. (2007). *Abcb7*, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood* 109, 3567-3569.

Przedborski, S., and Jackson-Lewis, V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord* 13 Suppl 1, 35-38.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1996). Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4565-4571.

Radunovic, A., Porto, W.G., Zeman, S., and Leigh, P.N. (1997). Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Neurosci Lett* 239, 105-108.

Rascol, O., Brefel-Courbon, C., Payoux, P., and Ferreira, J. (2003). The management of patients with early Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91, 203-211.

Rascol, O., Brooks, D.J., Korczyn, A.D., De Deyn, P.P., Clarke, C.E., Lang, A.E., and Abdalla, M. (2006). Development of dyskinesias in a 5-year trial of ropinirole and L-dopa. *Mov Disord* 21, 1844-1850.

Rascol, O., Ferreira, J.J., Payoux, P., Brefel-Courbon, C., and Montastruc, J.L. (2002). [Management of levodopa-induced dyskinesia]. *Rev Neurol (Paris)* 158 Spec no 1, S117-124.

Richardson, D.R., Lane, D.J., Becker, E.M., Huang, M.L., Whitnall, M., Rahmanto, Y.S., Sheftel, A.D., and Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10775-10782.

Robinson, B.H. (1998). The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inher Metab Dis* 21, 598-603.

Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2, 406-414.

Rouault, T.A., and Tong, W.H. (2005). Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 345-351.

Rouault, T.A., and Tong, W.H. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* 24, 398-407.

Rouault, T.A., and Tong, W.H. (2009). Tangled up in red: intertwining of the heme and iron-sulfur cluster biogenesis pathways. *Cell Metab* 10, 80-81.

Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* 35, 43-52.

Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L.M., *et al.* (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1)

contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18578-18583.

Salazar, J., Mena, N., and Nunez, M.T. (2006). Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 205-213.

Scotcher, K.P., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, J.W., and 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, 1295-1301.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54, 823-827.

Schilke, B., Williams, B., Knieszner, H., Puksza, S., D'Silva, P., Craig, E.A., and Marszalek, J. (2006). Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr Biol* 16, 1660-1665.

Schuff, N. (2009). Potential role of high-field MRI for studies in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24 *Suppl 2*, S684-690.

Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P.O., Botstein, D., and Philpott, C.C. (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15, 1233-1243.

Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E., Gwynn, B., Lambert, A.J., Wingert, R.A., Traver, D., *et al.* (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440, 96-100.

Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J., Kerscher, S., Elsasser, H.P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., and Lill, R. (2009). Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 29, 6059-6073.

Sheftel, A., Stehling, O., and Lill, R. (2010). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 21, 302-314.

Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., and Greenamyre, J.T. (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23, 10756-10764.

Shimada, Y., Okuno, S., Kawai, A., Shinomiya, H., Saito, A., Suzuki, M., Omori, Y., Nishino, N., Kanemoto, N., Fujiwara, T., *et al.* (1998). Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet* 43, 115-122.

Simola, N., Morelli, M., and Carta, A.R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11, 151-167.

Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., and Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* 277, 26944-26949.

Skibba, J.L., Stadnicka, A., Kalbfleisch, J.H., and Powers, R.H. (1989). Effects of hyperthermia on xanthine oxidase activity and glutathione levels in the perfused rat liver. *J Biochem Toxicol* 4, 119-125.

Smeyne, R.J., and Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 57-66.

- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., and Youdim, M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 74, 199-205.
- Song, N., Wang, J., Jiang, H., and Xie, J. (2010). Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 48, 332-341.
- Soudais, C., Skander, N., and Kremer, E.J. (2004). Long-term in vivo transduction of neurons throughout the rat CNS using novel helper-dependent CAV-2 vectors. *FASEB J* 18, 391-393.
- Thanvi, B., Lo, N., and Robinson, T. (2007). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. *Postgrad Med J* 83, 384-388.
- Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., *et al.* (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158-1160.
- Vila, M., Levy, R., Herrero, M.T., Ruberg, M., Faucheux, B., Obeso, J.A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1997). Consequences of nigrostriatal denervation on the functioning of the basal ganglia in human and nonhuman primates: an in situ hybridization study of cytochrome oxidase subunit I mRNA. *J Neurosci* 17, 765-773.
- Walling, C. (1998). Intermediates in the reactions of Fenton type reagents. *Acc. Chem. Res.* 31, 155
- Wang, J., Chen, G., Filebeen, C., and Pantopoulos, K. (2008). Insights on regulation and function of the iron regulatory protein 1 (IRP1). *Hemoglobin* 32, 109-115.
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Muhlenhoff, U., Lill, R., *et al.* (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J* 25, 184-195.
- Wilson, R.B. (2006). Iron dysregulation in Friedreich ataxia. *Semin Pediatr Neurol* 13, 166-175.
- Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., *et al.* (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035-1039.
- Wong, S.S., Li, R.H., and Stadlin, A. (1999). Oxidative stress induced by MPTP and MPP(+): selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. *Brain Res* 836, 237-244.
- Wu, D.C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6145-6150.
- Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Erythropoiesis and iron sulfur cluster biogenesis. *Adv Hematol* 2010.
- Yoon, T., and Cowan, J.A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* 125, 6078-6084.

Yoritaka, A., Hattori, N., Mori, H., Kato, K., and Mizuno, Y. (1997). An immunohistochemical study on manganese superoxide dismutase in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 148, 181-186.

Youdim, M.B., Stephenson, G., and Ben Shachar, D. (2004). Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 306-325.

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., and Davies, K.J. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265, 16330-16336.