

UCH-FC  
Biotecnología  
E163  
c.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR  $\kappa$ B Y DE  
ÓXIDO NÍTRICO EN LA ACTIVACIÓN POR ESTRÉS OXIDATIVO  
DE IRP1**

Memoria de Título entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular.



Viviana Elizabeth Gallardo Mendieta

Abril, 2006  
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marco T. Núñez.



## “PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR κB Y DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA ACTIVACIÓN POR ESTRÉS OXIDATIVO DE IRP1”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**VIVIANA ELIZABETH GALLARDO MENDIETA**

Dr. Marco Tulio Nuñez González  
**Director Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación del Seminario de Título**

Dr. Christian González-Billault  
**Presidente Comisión**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dra. Victoria Guixé Leguía  
**Corrector**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.





A mis padres Jaime y Gaby



Desde niña me intereso el mundo de la ciencia. Ya en el colegio supe que el campo de la Biología era mi área, por lo que decidí estudiar la novedosa carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Apoyada por mis padres y por mi familia, empecé entonces a involucrarme en el mundo científico.

Fueron años llenos de vivencias, algunas difíciles, otras peculiares, y otras que hicieron que todo este tiempo en la vida universitaria valiera la pena. En todo este tiempo conocí a muchas personas, diversas en personalidades, sueños, ideales, dentro de las cuales encontré a grandes compañeros y principalmente amigos que sé que conservaré para siempre.

Gracias a todos ustedes por apoyarme y creer en mí, ahora sé que todos estos años me enseñaron mucho y me dejaron más preparada para afrontar los nuevos desafíos que vendrán, tanto en mi vida personal como profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, Dr. Marco T. Núñez por recibirme en su laboratorio, por su confianza, apoyo, paciencia, dedicación y amistad.

A mi grupo de laboratorio, especialmente Vicky, Paty, Claudia y Nati, por su apoyo, compañía y amistad durante todo el desarrollo de mi tesis. También a mis compañeros Raúl, Pablo, Andrés, Pabla, Dora, Miguel y Carlos por la compañía, ayuda y complicidad en momentos complejos y por la alegría y fuerza necesarias para enfrentar cada día.

A mis amigas Maca y Pochi por seguir siendo parte importante de mi vida después de tantos años.

A Daniela, Andrea y Rossana por su amistad, complicidad y apoyo durante este tiempo. Gracias por los días de ocio y esparcimiento, carretes, peleas y por siempre estar cuando las necesito.

A mis amigos de la U, Rodrigo, Eduardo, Tomás, Loreto, Carlos, Andrés, Rafael, Marcos, Cristián, Pollo, Felipe, Feña F, Feña U, Matías y Emilio, porque sin su apoyo y compañía nada habría sido igual. Por todas aquellas horas compartidas en clases, estudiando, carreteando o simplemente conversando.

A todo el laboratorio de Biología del Desarrollo, especialmente Miguel, Pedro Andrés, Carmen, Cata, Vivi y Undu por haberme acogido, por su apoyo y amistad en este nuevo camino que estoy comenzando.

A mi familia, papá, mamá, Meli, Iris, Acklla, Rodrigo, Ximena, abuelos, tíos, primos y sobrinos, por el cariño, entusiasmo, compañía de todos estos años y por intentar aprenderse el nombre de la carrera.

A todos Ustedes... muchas gracias.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE GENERAL	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	17
III. OBJETIVOS	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V. RESULTADOS	31
VI. DISCUSIÓN	59
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. REFERENCIAS	73



## ÍNDICE DE FIGURAS



		Página
Figura 1	Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.	2
Figura 2	Regulación celular de los niveles de Fe.	7
Figura 3	A) Viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	32
	B) Papel del antioxidante NAC en la mortalidad celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	32
Figura 4	A) Viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a Fe.	33
	B) Papel del antioxidante DMTU en la mortalidad celular inducida por Fe.	33
Figura 5	Incorporación de <sup>55</sup> Fe en células SH-SY5Y.	34
Figura 6	Contenido intracelular de Fe en células SH-SY5Y.	35
Figura 7	Daño oxidativo en células SH-SY5Y inducido por Fe.	
	A) Determinación de la intensidad de fluorescencia de DCF.	37
	B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF.	37
	C) Papel del antioxidante DMTU sobre el daño oxidativo.	37
	D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF.	37
Figura 8	Daño oxidativo en células SH-SY5Y inducido por Fe.	
	Inmunodetección de la formación de aductos de HNE.	38
Figura 9	Estudio de las proteínas reguladoras de Fe: Actividad de unión a IRE de las proteínas IRP.	
	A) Gel de ensayo de actividad.	40
	B) Densitometría	40

Figura 10	Estudio de las proteínas reguladoras de Fe: Inmunodetección de la proteína IRP1.	
	A) Ensayo de Western blot.	41
	B) Densitometría.	41
Figura 11	Estudio de las proteínas reguladoras de Fe: Niveles de nitración de IRP1.	
	A) Inmunodetección de los niveles de nitración de los residuos de tirosina en IRP1.	43
	B) Densitometría.	43
Figura 12	Efecto de NO sobre la actividad de IRP1.	
	A) Gel de ensayo de actividad de IRP1 en función de diferentes concentraciones de L-NNA.	45
	B) Cuantificación de la actividad de IRP1.	45
	C) Gel de ensayo de actividad de IRP1 en función del tiempo de exposición a L-NNA.	45
	D) Cuantificación de la actividad de IRP1.	45
Figura 13	Efecto de NO sobre la actividad de IRP1.	
	A) Gel de ensayo de actividad de IRP1 en células SH-SY5Y incubadas con SNAP y con L-NNA.	46
	B) Cuantificación de la actividad de IRP1.	46
Figura 14	Determinación de los niveles de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en función de L-NNA y de SNAP.	46
Figura 15	Papel del factor de transcripción NF-κB sobre la actividad de IRP1.	
	A) Gel de ensayo de actividad de IRP1 en función de diferentes concentraciones de NaSal.	48
	B) Cuantificación de la actividad de IRP1.	48
	C) Gel de ensayo de actividad de IRP1 en función del tiempo de exposición a NaSal.	48

	D) Cuantificación de la actividad de IRP1.	48
Figura 16	Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP).	50
Figura 17	Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH).	51
Figura 18	Papel del NO sobre el daño oxidativo inducido por Fe.	
	A) Determinación de la intensidad de fluorescencia de DCF en células incubadas con 80 $\mu$ M de Fe en presencia de SNAP.	53
	B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF.	53
	C) Inmunodetección de la formación de aductos de HNE en células incubadas con 80 $\mu$ M de Fe en presencia de SNAP.	53
Figura 19	Determinación de los niveles de expresión de las óxido nítrico sintasas en función de Fe.	
	A) Inmunodetección de nNOS en células SH-SY5Y.	55
	B) Inmunodetección de iNOS en células SH-SY5Y.	55
	C) Densitometría.	55
Figura 20	Niveles de NO en células SH-SY5Y.	
	A) Determinación de $\text{NO}_2^-$ en el medio de cultivo.	56
	B) Producción de NO en función del tiempo de tratamiento con Fe.	56
Figura 21	Activación de NF- $\kappa$ B inducida por Fe.	
	A) Inmunodetección de la subunidad p65 en extractos nucleares de células SH-SY5Y.	57
	B) Cuantificación de los niveles de expresión de p65	57
Figura 22	Activación de NF- $\kappa$ B inducida por Fe.	
	Inmunocitoquímica de la subunidad p65.	58
Figura 23	Modelo propuesto para la activación de IRP1 por estrés oxidativo inducido por Fe	71

## ABREVIATURAS

BCA	Ácido Bicincoanílico
BSA	Albúmina sérica de bovino
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de sodio
DCF	2', 7' diclorofluoresceína
DCDHF	2', 7'-diclorodihidrofluorescina
DCDHFDA	5-(γ-6)-carboxi-2', 7'-diclorofluorescina diacetato
DMTU	Dimetilurea
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
Fe	Hierro
GSH	Glutación reducido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IRE	Elemento que responde a Fe
IRP	Proteína reguladora de Fe
KCl	Cloruro de potasio
KDa	KiloDalton
LIP	Contenido de Fe reactivo
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mRNA	RNA mensajero
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NAC	N-acetil-L-cisteína
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaSal	Salicilato de Sodio
NFκB	Factor de transcripción nuclear κB
nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
NO	Oxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NP-40	Targitol NP40 (nonifenoxi polietoxi etanol)
NTA	N,N-bis [carboximetil] glicina, ácido triglicolámico
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PSA	Persulfato de amonio
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTf	Receptor para transferrina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino

SIH	Salicilaldehído isonicotinil hidrazona
SN	Sistema nervioso
SNAP	S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
Tween 20	Polioxietilensorbitan monolaurato

## RESUMEN

La homeostasis del Fe es controlada por el sistema IRE/IRP. Como respuesta a una sobrecarga de Fe, este sistema disminuye la síntesis del RTf y activa la síntesis de ferritina. Resultados en nuestro laboratorio han demostrado que las células neuronales no disminuyen la incorporación de Fe en condiciones de sobrecarga de este metal, por lo que acumulan Fe en el tiempo. Este comportamiento se debe a la actividad sostenida de IRP1 en respuesta a la acumulación de Fe. Por otra parte, la actividad de IRP1 es inhibida por antioxidantes, sugiriendo que esta activación es mediada por estrés oxidativo inducido por Fe. En este trabajo estudiamos el papel del NO y de NFκB en la activación de IRP1 y en la generación de estrés oxidativo inducido por Fe en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Nuestros resultados demuestran que los niveles de NO y la actividad tanto de NFκB como de IRP1 fueron inducidos por Fe. La activación de IRP1 a su vez, fue acompañada por una disminución en los niveles de proteína de IRP1 y por un aumento en la nitración de tirosinas de IRP1. El tratamiento de estas células con el inhibidor de las NOS, L-NNA y con el inhibidor de NFκB, NaSal disminuyen la activación de IRP1 mediada por Fe; mientras que el tratamiento con el dador de NO, SNAP aumenta esta respuesta. Al mismo tiempo, observamos que el NO ejerce efectos antioxidantes disminuyendo el LIP y aumentando la concentración intracelular de GSH. Sobre la base de estos resultados, concluimos que el NO tiene un papel pro y antioxidante en la respuesta a estrés oxidativo inducido por Fe en las células SH-SY5Y. Finalmente, concluimos que el Fe induce la producción de NO a través de la activación de NFκB. Por su parte, el NO induce la actividad de IRP1, favoreciendo un círculo vicioso de más Fe y más estrés oxidativo, mientras que al

mismo tiempo aumenta la respuesta antioxidante mediante la disminución del LIP y el aumento de los niveles celulares de GSH.

## ABSTRACT

The Iron regulatory protein / Iron Responsive element (IRE/IRP) system maintains cellular iron homeostasis down-regulating the synthesis of transferrin receptor (TfR) and up regulating the synthesis the iron-storage protein ferritin in response to iron accumulation. We recently reported that neuronal cells do not turn off iron incorporation under iron sufficiency so these cells accumulate iron in time. This behavior was traced to the sustained activity of IRP1 in response to iron accumulation. This unregulated activity was abolished by antioxidants, suggesting that IRP1 activation is mediated by iron-induced oxidative stress. In this work, we characterized in SHSY5Y neuroblastoma cells the involvement of nitric oxide and the nuclear factor  $\kappa$ B in the phenomena of iron-induced IRP1 activation and oxidative stress. Nitric oxide levels, NF- $\kappa$ B and IRP1 activity were induced by iron. Iron-induced IRP1 activation was accompanied by decreased levels of IRP1 protein and increased IRP1 tyrosine nitration. Treatment of cells with the nitric oxide synthase inhibitor L-NNA and the NF- $\kappa$ B inhibitor NaSaI abolished iron-mediated IRP1 activation while treatment with the nitric oxide donor SNAP enhanced this response. Simultaneously, SNAP also elicited anti-oxidant effects, decreasing the reactive iron pool and increasing the intracellular concentration of GSH. We conclude that in neuroblastoma cells nitric oxide is involved in both pro-oxidant and anti-oxidant responses to iron-induced oxidative stress. Thus, iron induces NF- $\kappa$ B, which induces nitric oxide production. Next, nitric oxide induces IRP1 activity, eliciting a vicious cycle of more iron and more oxidative stress, while at the same time it increases the antioxidant response by decreasing the labile iron pool and increasing cellular GSH levels.

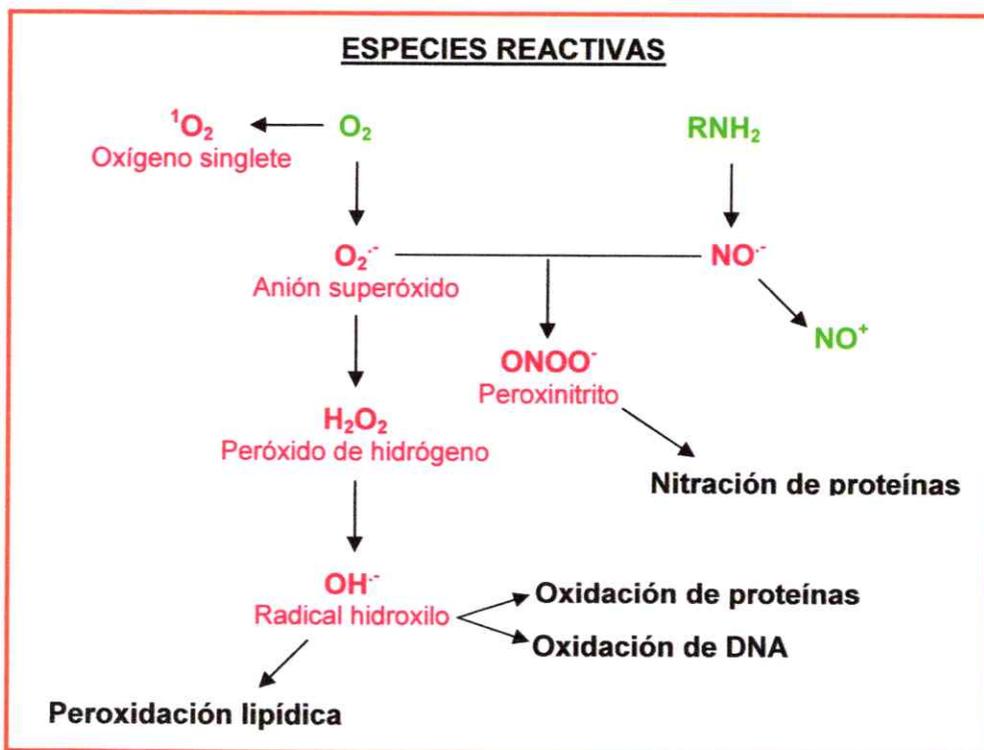
## I. INTRODUCCIÓN

Las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante producto de que especies reactivas de oxígeno (ROS) son continuamente generadas por el metabolismo celular. Cuando los niveles de ROS no son controlados adecuadamente se produce un ambiente de estrés oxidativo, el cual se debe básicamente a la producción de elementos pro-oxidantes por una parte y a las debilidades de la defensa antioxidante por otra, llegando a afectar el estado redox celular (Dröge, 2002).

En los sistemas biológicos los elementos pro-oxidantes provienen en su mayoría del oxígeno ( $O_2$ ) y del nitrógeno ( $N_2$ ); e incluye a radicales libres tales como: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ); y a otros compuestos de  $O_2$  que, si bien no pueden catalogarse químicamente como radicales libres, son altamente pro-oxidantes y capaces de generar radicales libres durante su metabolismo, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Dröge, 2002). El estrés oxidativo, además, es capaz de causar daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos afectando su función (Reddy y Clark, 2004) (Figura 1). Por otra parte, la respuesta de un organismo a estrés oxidativo incluye tanto adaptaciones físicas como ambientales. Una vez terminada la respuesta al estrés, el organismo vuelve a su equilibrio original. Sin embargo, un estrés oxidativo intenso o de larga duración, resulta en un nuevo equilibrio biológico, el cual puede ser perjudicial para las células.

El sistema nervioso (SN) es particularmente vulnerable al daño por ROS y por especies reactivas de nitrógeno (RNS). Un gran número de factores contribuye a la alta sensibilidad del SN hacia el daño oxidativo, entre los que se encuentran bajos niveles del antioxidante natural glutatión en neuronas, alto porcentaje de ácidos grasos poli-

insaturados en las membranas y alto requerimiento de  $O_2$  en el cerebro debido a su alta tasa de actividades metabólicas (Thompson y col., 2001). El estrés oxidativo además, es considerado uno de los mecanismos principales envuelto en la iniciación y progresión de daño celular en neuronas y por lo tanto, juega un rol en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas (Dringen y col., 2000). Una correcta respuesta a estrés oxidativo es entonces, fundamental para la sobrevivencia y para el normal funcionamiento de los organismos. Las respuestas adaptadoras al estrés oxidativo incluyen la inducción de los niveles de glutatión reducido (GSH) y de enzimas antioxidantes tales como catalasa y superóxido dismutasa, entre otras; inducción de nueva expresión génica, modificación proteica y degradación proteolítica de proteínas dañadas oxidativamente (Marshall y col., 2000).

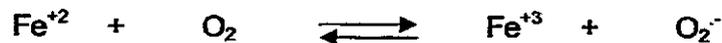


**Figura 1: Especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) y su rol sobre las modificaciones oxidativas a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.**

Por otra parte, el hierro (Fe) es un elemento esencial para la vida, puesto que participa en una gran cantidad de procesos de oxidación-reducción. Forma parte esencial de las enzimas del ciclo de Krebs, en la respiración celular y como transportador de electrones en los citocromos. Además, está presente en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, tales como las catalasas, peroxidasas y oxigenasas (Forrellat y col., 2000).

El elevado potencial de oxidación del Fe, junto a su facilidad para promover la formación de compuestos tóxicos altamente reactivos (ROS) determina que el metabolismo de Fe sea controlado por un potente sistema regulador (Forrellat y col., 2000). Sin embargo, estudios han demostrado que los sistemas reguladores funcionan adecuadamente en condiciones de carencia de este metal y no así en condiciones de exceso (Núñez-Millacura y col., 2002).

En presencia de  $O_2$ , Fe cataliza la generación de  $O_2^{\cdot -}$  mediante la reacción de Haber-Weiss:



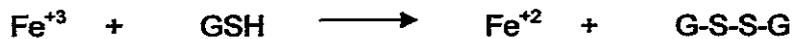
Por su parte,  $O_2^{\cdot -}$  dismuta espontáneamente o catalizado por la Superóxido Dismutasa (SOD) a  $H_2O_2$ .



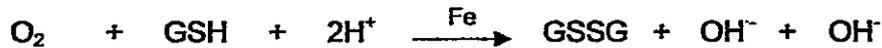
En presencia de  $H_2O_2$ , Fe cataliza mediante la reacción de Fenton la generación del radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el cual es altamente reactivo:



$\text{Fe}^{+3}$  es reducido a  $\text{Fe}^{+2}$  por reductores celulares:



Finalmente, el balance de las reacciones anteriores es:



Por lo tanto, el Fe en presencia de  $\text{O}_2$  y en un ambiente reductor intracelular es un catalizador de la producción de  $\text{OH}^-$ .

Múltiples líneas de investigación evidencian que un factor común en enfermedades neurodegenerativas es un exceso de Fe en el cerebro, producido por una pérdida en la regulación de los mecanismos homeostáticos que mantienen adecuados niveles de este metal en la célula (Thompson y col., 2001). La formación de ROS inducido por Fe produce daño a tejidos y contribuye a la toxicidad del Fe en desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y en Esclerosis amiotrófica lateral (Shoham y Youdim, 2000; Berg y col., 2001; Thompson y col., 2001; Perry y col., 2002; Carri y col., 2003), entre otras.

### **1.1 Regulación de los niveles de Fe celular.**

En vertebrados, los niveles celulares de Fe son controlados post-transcripcionalmente por la actividad de proteínas reguladoras de hierro (IRP1 e IRP2), proteínas citosólicas que se unen a elementos estructurales llamados elementos en respuesta de Fe, IREs (Eisenstein, 2000). IREs se encuentran en regiones no traducidas de los mRNAs de las proteínas más importantes en la regulación de la

homeostasis celular de hierro: RTf, envuelto en el transporte de Fe del plasma a la célula y en el mRNA de ferritina, la proteína encargada de almacenar Fe (Bouton, 1999; Kim y Ponka, 2002). El primer IRE identificado fue localizado en la región 5' no traducida del mRNA de las cadenas pesada y liviana (H y L, respectivamente) de la ferritina humana (Leibold y Munro, 1988). La interacción IRP1/IRE en la región 5' terminal inhibe su traducción. Un segundo tipo de regulación post-transcripcional del metabolismo del Fe mediado por IRPs es la regulación del RTf. El mRNA del RTf contiene cinco IREs, todos localizados en la región 3' terminal; la interacción entre IRPs e IREs incrementa la estabilidad del mRNA de este receptor (Bouton, 1999; Kim y Ponka, 2002).

Por otra parte, las proteínas IRP1 e IRP2 se expresan diferencialmente en distintos tejidos, se regulan por diferentes mecanismos, presentan diferente sensibilidad a los cambios celulares de Fe y responden a diferentes estímulos (Eisenstein, 2000). Actualmente se sabe que IRP2 comanda la homeostasis normal de Fe para administrar niveles de Fe adecuados. Estudios han demostrado que ratones knock-out para IRP1 presentan niveles celulares de Fe normales y por ende tienen una vida normal mientras que ratones knock-out para IRP2 muestran acumulación de Fe en ferritina y severos problemas de neurodegeneración (LaVaute y col., 2001; Meyron-Holtz y col., 2004).

IRP1 es una proteína citosólica de 98 KDa y fue la primera proteína identificada en células de mamíferos con la capacidad de mantener la homeostasis del Fe. IRP1 es una proteína bifuncional con dos actividades mutuamente excluyentes: por una parte es una holoproteína con un centro 4Fe-4S actuando como aconitasa citosólica, mientras que en ausencia del centro Fe-S es una apoproteína que se une con gran afinidad a secuencias IREs. El centro 4Fe-4S que presenta esta proteína está ligado

por tres cisteínas (437, 503 y 506), donde la presencia de este sitio catalítico contribuye a la estabilización de la estructura de la proteína (Bouton, 1999; Kim y Ponka, 2002). IRP2 en cambio, tiene un peso molecular de 105 KDa debido a un dominio adicional de 73 aminoácidos cerca de la parte N-terminal (Bouton, 1999; Kim y Ponka, 2002). La secuencia aminoacídica de IRP2 humana exhibe 57% de identidad y 75% de similitud referente a IRP1 humana, lo que explica la capacidad de IRP2 de unirse a secuencias consensos de IREs con la misma afinidad de IRP1.

Las actividades de IRP1 e IRP2 responden a cambios en los niveles de Fe celular a través de diferentes mecanismos. IRP2 es controlada a niveles de estabilidad de la proteína y es rápidamente degradada en respuesta a la inducción de daño oxidativo mediado por altos niveles de Fe (Guo y col., 1995; Bouton, 1999). Estudios han establecido que la presencia de la secuencia de 73 aminoácidos única en IRP2, es responsable de la degradación proteolítica de la proteína mediada por Fe (Kim y Ponka, 2002). IRP1, en cambio, que es más abundante en células de mamíferos que IRP2, es considerada como una proteína de vida media estable, que no es afectada por cambios en los niveles de Fe. En condiciones de abundancia de hierro, IRP1 tiene el centro [4Fe-4S], manteniendo a la proteína activa como una enzima aconitasa convirtiendo citrato en isocitrato e inactiva para unir IREs. Bajos niveles de Fe intracelular inducen un desensamblaje del centro [4Fe-4S], lo que causa que IRP1 se una y estabilice al mRNA de RTf; así como también se una al mRNA de ferritina, disminuyendo su traducción (Eisenstein, 2000) (Figura 2). Por lo tanto, la conversión de IRP1 desde actividad aconitasa a capacidad de unión a RNA procede a través de un mecanismo post-transcripcional (Oliveira y Drapier, 2000; Kim y Ponka, 2002).

Otros mecanismos responsables en la conversión entre holoproteína (aconitasa) y apoproteína (proteína de unión a RNA) de IRP1 han sido largamente

investigados y, en adición al Fe, diferentes señales como NO (Bouton y col., 1997; Kim y Ponka, 2002), estrés oxidativo (Martins y col., 1995; Pantopoulos y col., 1997; Núñez-Millacura y col., 2002), fosforilación e hipoxia/reoxigenación han sido vinculados en la modulación post-traducciona de IRP1. Esta proteína es entonces, un link regulatorio entre estrés oxidativo y metabolismo del hierro y además, es una molécula sensible a procesos redox que responde a una variedad de señales químicas emitidas por la célula (Bouton, 1999).

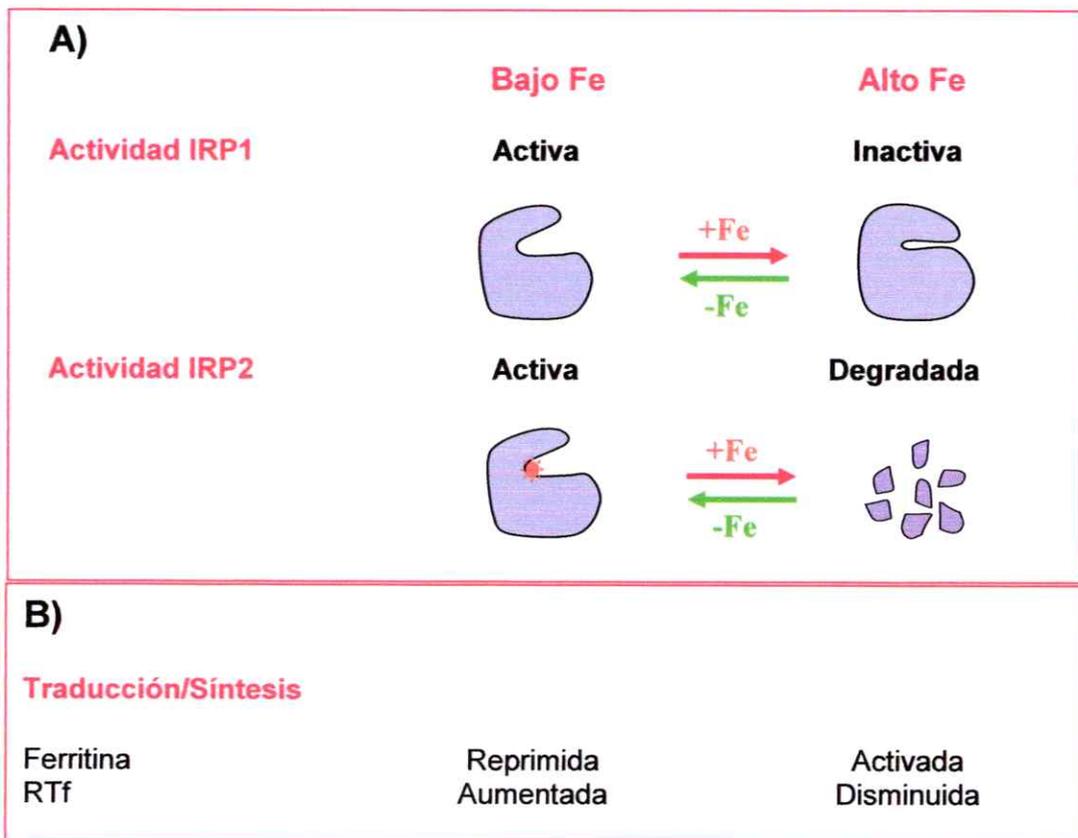


Figura 2. A) Regulación de la actividad de las proteínas IRP1 e IRP2 en función de los niveles celulares de Fe. B) Niveles de expresión de las proteínas que regulan la homeostasis celular de Fe, ferritina y el receptor para transferrina.

## 1.2 Óxido nítrico y metabolismo del Fe.

Óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula diatómica generada por las óxido nítrico sintasas (NOS). El NO es producido por la mayoría de las células de vertebrados, reaccionando entre otros con oxígeno molecular, metales de transición, radicales libres, grupos tiol y con hierro heme y no-heme en metaloproteínas (Pantopoulos y col., 1994). Debido a sus múltiples interacciones, NO juega un rol en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo vasodilatación, inhibición de agregación plaquetaria, relajación del músculo liso, neurotransmisión (Bogdan, 2001; Chiueh, 2002), diferenciación y plasticidad neuronal (Peunova y col., 1995), transcripción genética, traducción y estabilización de mRNA, metabolismo del hierro y apoptosis, entre otros (Bogdan, 2001; Chiueh, 2002).

Las NOS forman un grupo de conservadas isoenzimas homodiméricas citosólicas o membranosas que convierten el amino ácido L-arginina en citrulina y NO tanto en vertebrados, invertebrados (incluyendo protozoo e insectos) y plantas. Todas las isoformas de las NOS son proteínas que contienen un grupo heme y requieren los mismos co-substratos (oxígeno molecular, NADPH) y cofactores (FMN, FAD, entre otros) (Stuehr, 1997). Además estas isoformas están estructuralmente relacionadas, pero difieren en su origen genético, dependencia iónica para su actividad ( $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina), funciones fisiopatológicas y distribución anatómica (Hall y col., 1994; Qu y col., 2001).

Existen tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS). Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS II), independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , es encontrada primeramente en macrófagos, donde su expresión es aumentada por estímulos inflamatorios. El NO producido por iNOS ha sido caracterizado en numerosos tipos celulares como consecuencia de procesos inflamatorios que siguen procesos de infección, enfermedad

o daño a tejidos (Heneka y col., 2001). En cerebro, la expresión de iNOS ha sido bien caracterizada en astrocitos, microglías y en menor porcentaje en células endoteliales (Heneka y col., 2001). La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, NOS III) es encontrada en células endoteliales, y el NO generado actúa disminuyendo la presión sanguínea, inhibiendo la agregación plaquetaria resultando en vasodilatación, entre otros (Grant y col., 2002). Finalmente, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, NOS I) es expresada en neuronas, mientras que el NO producido actúa como neurotransmisor regulando la transmisión neuronal (Grant y col., 2002). Tanto eNOS como nNOS son enzimas expresadas en forma constitutiva y son dependiente de  $Ca^{+2}$ /Calmodulina (Stuehr, 1997).

Las tres isoformas de NOS son expresadas en el sistema nervioso central (SNC). La producción endógena de NO en el SNC puede mediar importantes procesos biológicos como potenciación a largo plazo (LTP) (Robb y col., 1999). En cambio cuando es producido en exceso esta implicado en citotoxicidad y patogénesis en enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer (Heneka y col., 2001; Luth y col., 2001).

Con relación a la homeostasis celular del Fe, NO puede modificar a la proteína IRP1 por S-nitrosilación de cisteínas en particular Cys 437, 503 y 506 quienes forman el cluster Fe-S y a través de la nitración de tirosinas, especialmente Tyr 501, quien esta localizada en la vecindad del dominio de unión a IREs (Bouton, 1999). Estudios han demostrado que la biosíntesis de NO induce paralelamente una disminución de la actividad aconitasa e incremento en la actividad de unión a RNA de IRP1 en líneas celulares de macrófagos de ratón J774 (Weiss y col., 1994) y RAW 264.7 (Bouton, 1998). La habilidad de NO para incrementar la actividad de unión a RNA de IRP1 es atribuida tanto a la interacción directa del ligando con el centro Fe-S como también a la

perturbación de NO al pool de Fe celular (Wardrop y col., 2000). El incremento de la actividad de unión a RNA de IRP1 resulta en un incremento de la expresión del mRNA del RTf y en un incremento en la captación de Fe por parte de la proteína transferrina (Tf) en macrófagos (Wardrop y col., 2002). El aumento de la afinidad de IRP1 modificada por NO hacia IREs en el mRNA de ferritina reprime su traducción y por lo tanto el almacenaje de Fe, lo cual puede resultar en un incremento de los niveles de Fe libre intracelular. Además ha sido reportado que el NO por si solo es capaz de remover el Fe de los depósitos de ferritina (Shoham y col., 2000). Lo anterior, puede resultar muy peligroso para las células ya que un exceso de Fe reactivo libre puede catalizar la formación de radicales hidroxilo nocivos mediante la reacción de Fenton.

En determinadas situaciones en las que aumenta la formación de  $O_2^-$  y de NO, la reacción entre ellos es espontánea, formándose peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Bogdan, 2001; Radi y col., 2001).  $ONOO^-$  es una especie reactiva, de vida media corta y permeable a membranas celulares que promueve estrés oxidativo y daño a tejidos ya que reacciona rápidamente con grupos sulfidrilos, especialmente con cisternas, inactivando enzimas que contienen centros Fe-S (Bouton, 1997). A su vez promueve peroxidación lipídica, fragmentación de DNA, nitración de anillos fenólicos luego de reaccionar con metales y nitración de residuos tirosinas en proteínas (Radi y col., 2001). La formación y reacción de  $ONOO^-$  han sido propuestas en la contribución de esta molécula en la patogénesis de una variedad de enfermedades tales como procesos de inflamación crónicos y en desórdenes neurodegenerativos (Radi y col., 2001; Sarchielli y col., 2003).

Con relación a la homeostasis de Fe,  $ONOO^-$  reacciona con el cluster 4Fe-4S tanto de las enzimas aconitasa mitocondrial como citosólica, modulando las dos funciones de IRP1 recíprocamente. La reacción entre  $OONO^-$  y el cluster resulta en

una disminución de la actividad aconitasa de IRP1 y en la formación de un centro 3Fe-4S, el cual es catalíticamente inactivo debido a la oxidación de las cisteínas que forman el cluster y sólo exhibe actividad de unión a RNA en condiciones reductoras. Lo anterior queda reflejado en que substratos de aconitasa al unirse al centro Fe-S protegen a IRP1 contra los efectos del ONOO<sup>-</sup>, demostrando que este centro es blanco del ONOO<sup>-</sup> (Bouton y col., 1997; Soum y col., 2003).

Aparte de los efectos citotóxicos de las ROS alterando estructuralmente y funcionalmente cualquier molécula biológica, actualmente se le está prestando una atención especial a la relación entre estrés oxidativo y control de la expresión génica. El balance intracelular entre pro-oxidantes y antioxidantes influye en la homeostasis celular; y la alteración de este balance hacia estrés oxidativo puede modular la activación de quinasas y la inactivación de fosfatasa que inducen cambios en la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción. Al menos tres factores de transcripción parecen sensibles al estado redox celular: el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), el activador de proteínas (AP-1) y el receptor activado de proliferación de peroxisoma (PPAR) (Marshall y col., 2000).

### **1.3 Factor de transcripción nuclear $\kappa$ B.**

La familia de NF $\kappa$ B está compuesta por proteínas estructuralmente relacionadas que pueden formar homo o heterodímeros de unión a DNA. Todas las proteínas Rel contienen un dominio altamente conservado de aproximadamente 300 aminoácidos, llamado dominio homólogo Rel (RHD), que contiene secuencias necesarias para la formación de dímeros, localización nuclear, unión a DNA y unión a

I $\kappa$ B (Baeuerle y Baltimore, 1996). Esta familia puede ser dividida en dos grupos basados en su estructura y función. El primer grupo involucra a p65 (Rel A), c-Rel y Rel B, que contienen dominios de activación transcripcional necesarios para la inducción genética. El segundo grupo contiene a p105 y p100, las que por procesos proteolíticos conllevan a la formación de p50 (NF $\kappa$ B1) y p52 (NF $\kappa$ B2), respectivamente (Peng y col., 1995; Grilli y Memo, 1999). La región carboxilo terminal de p105 y p100 comparte características estructurales con el inhibidor de NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, y por ende funcionan para retener a NF $\kappa$ B en el citoplasma (Peng y col., 1995). Las proteínas maduras de p50 y p52 pueden formar dímeros funcionales con los miembros de ambos grupos. Con la excepción de Rel B, quien no puede formar homodímeros, miembros de ambos grupos pueden unirse como homo o heterodímeros de manera tejido específico para inducir la activación de genes (Peng y col., 1995).

En la mayoría de las células, NF $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma a través de la asociación con una familia de proteínas inhibitorias, las I $\kappa$ Bs (I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$ , I- $\kappa$ B $\gamma$  o I- $\kappa$ B $\epsilon$ ), quienes enmascaran la señal de translocación nuclear (NLS) presente en la subunidad p65 de NF $\kappa$ B (Baeuerle, 1998). Las proteínas I $\kappa$ Bs contienen múltiples copias de repetidos de ankirina, quienes interactúan con el RHD de proteínas Rel/NF $\kappa$ B (Baeuerle, 1998). Cuando el NF $\kappa$ B es activado por señales externas, entre ellas estimulación por citoquinas (Duh y col., 1989), virus (Leung y Nabel, 1988; Sambucetti y col., 1989), NO (Simpson y Morris, 1999) y estrés oxidativo (Li y col., 1999), las I $\kappa$ Bs son rápidamente fosforiladas en dos residuos específicos de serinas localizados en la región N<sub>2</sub>-terminal de estas proteínas, permitiendo su ubiquitinación y blanco de degradación proteosomal (Baeuerle, 1998). La desenmascaramiento de NLS de NF $\kappa$ B, permite su translocación al núcleo e inicia la transcripción de muchos genes

envueltos en la respuesta inflamatoria e inmune (Piette y col., 1997, Li y col., 1999). Entre los genes regulados por NF $\kappa$ B, se encuentran moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, E-selectina), enzimas de respuesta a inflamación (iNOS, ciclooxigenasa-2, lipooxigenasa, fosfolipasa citosólica A2) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-2) (Marshall y col., 2000). A su vez, NF $\kappa$ B está implicado en reacciones de inflamación, control del crecimiento y apoptosis, y es el primer factor de transcripción eucariótico que responde directamente al estrés oxidativo en algunos tipos celulares.

Está establecido que condiciones reductoras son requeridas en el núcleo para la actividad de NF $\kappa$ B de unión a DNA, mientras que condiciones oxidativas en el citoplasma promueven la activación de NF $\kappa$ B (Marshall y col., 2000). Cabe recalcar que para la unión de NF $\kappa$ B a DNA, un residuo de cisteína en la región de unión a DNA en la subunidad p50 (cisteína 62) debe estar en estado reducido, participando en la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Además la glutationilación o nitrosilación de este residuo ha sido demostrada para inhibir la unión de NF $\kappa$ B *in vivo* (Marshall y col., 2001).

En el citosol, estrés oxidativo inducido por la generación de ROS ha sido implicado en la activación de NF $\kappa$ B. La activación NF $\kappa$ B inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es altamente dependiente del tipo celular y al parecer de los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH), que difiere de un tipo celular a otro, puede ser crucial para la respuesta de NF $\kappa$ B inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Li y col., 1999). Además, el rol de ROS como segundos mensajeros en la activación de NF $\kappa$ B ha sido demostrado con el uso de antioxidantes tales como N-acetil cisteína (NAC), vitamina E, ácido acetil salicílico, quelantes de hierro y con la sobreexpresión de enzimas antioxidantes inhibiendo la actividad de este factor. Por lo tanto, la respuesta a estrés oxidativo en algunos tipos

celulares involucra la inducción de la actividad de NFκB (Levites y col., 2002). Además, estudios previos han demostrado un efecto estimulador directo de Fe<sup>+2</sup> en la activación de NFκB en células de Kupffer (She y col., 2002), en hígado de macrófagos y en microglías de cerebro de rata (Levites y col., 2002). La explicación más aceptada para los efectos del Fe sobre NFκB es mediante la generación de OH<sup>-</sup> y por ende de estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton (She y col., 2002).

Las acciones atribuidas al factor de transcripción NFκB son contradictorias. Por una parte, este factor participa en la activación de genes esenciales envueltos en la función inmune e inflamatoria, así como también en mecanismos de protección y supervivencia celular actuando como modulador en la regulación de sistemas antioxidantes (Grilli y Memo, 1999). Por el contrario, la inducción de este factor también ha sido relacionada con el inicio o aceleración de procesos de disfunción y degeneración en algunos desórdenes neurodegenerativos, incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer e infecciones virales en el sistema nervioso central, entre otros (Atwood y col., 1994; Behl y col., 1994; Yan y col., 1995; Boissiere y col., 1997; Hunot y col., 1997; Kaltschmidt y col., 1997).

Finalmente, es probable que el factor de transcripción NFκB juegue un papel importante en determinar el balance final entre muerte y supervivencia de la célula, el que es fundamental en la vida de un organismo en algunos tipos celulares. El punto que discrimina entre respuesta fisiológica o patológica mediada por NFκB debe ser entonces célula-específica, estar influenciado por la naturaleza y la intensidad de estímulos extracelulares y ser viable para ser modificado continuamente por la maquinaria transcripcional (Grillo y Memo, 1999).

#### **1.4 Estrés oxidativo inducido por Fe.**

Al ser la división celular una de las pocas ocasiones en donde los niveles celulares de hierro son efectivamente reducidos, las células guardan este metal cuidadosamente. Debido a su condición post-mitótica, las neuronas no pueden reducir el hierro intracelular a través de la división celular, así que va a depender de estrictos mecanismos en la homeostasis del Fe para manejar sus niveles celulares. Descubrimientos recientes de nuestro laboratorio indican que ciertos tipos celulares expresan el transportador de salida de Fe, Ireg1, que aminora la acumulación de este metal (Aguirre y col., 2005).

Las neuronas tienen un activo sistema IRE/IRP y expresan ferritina, TfR y transportador de membrana de Fe, DMT1. Ante un aumento en el contenido de Fe, las células neuronales manejan su estabilidad y el control de los niveles de daño oxidativo hacia proteínas y DNA a través de la activación de mecanismos antioxidantes (Núñez y col., 2004). Estudios han demostrado que la captación de Fe por células de neuroblastoma de ratón N2A y por neuronas de hipocampo desde el medio extracelular aumenta los niveles de Fe intracelular total y los niveles de pool de Fe reactivo. Este aumento en los niveles de Fe intracelular podría inhibir la activación de IRP1, terminado el proceso de captación de Fe. Sin embargo, un fuerte incremento en la concentración de Fe en el medio de cultivo suprime la actividad de IRP2 pero re-activa a IRP1 aumentando así la captación de Fe (Núñez-Millacura y col., 2002; Núñez y col., 2003). La hipótesis es que la inducción de la actividad de IRP1 es mediada por estrés oxidativo, ya que cuando estas células fueron cultivadas con sobrecarga de Fe y con variadas concentraciones del antioxidante NAC, se observó una disminución de la actividad de IRP1 y ésta además fue dosis dependiente (Núñez-Millacura y col., 2002; Núñez y col., 2003).

Muchas de las características específicas de la homeostasis neuronal de hierro y su relación con respuestas pro o antioxidantes son desconocidas. Es importante entonces lograr un mejor conocimiento de la homeostasis de Fe neuronal y de los mecanismos por los cuales las neuronas regulan los niveles de hierro y las respuestas adaptativas celulares para así aclarar la importancia y la relevancia de éste en la inducción de daño oxidativo.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y es un sistema bien establecido para el estudio en células neuronales. Estas células salen del ciclo celular, expresan muchos marcadores típicos neuronales y son dependientes de factores neurotróficos para vivir y diferenciarse. Estas características hacen que estas células obtenidas con protocolos específicos sean muy similares a neuronas primarias (Encinas y col., 2000). Las características antes mencionadas hacen de este modelo un buen sistema para el estudio de rutas de transducción de señales presente en las neuronas.

## II. HIPÓTESIS

El estrés oxidativo intracelular inducido por hierro activa a IRP1 por una vía de señalización mediada por el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B y el óxido nítrico. Esta activación resulta en un círculo vicioso de mayor incorporación de Fe y muerte celular.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Determinar el papel del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B y de NO en la activación del regulador de la homeostasis celular de hierro, IRP1, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo inducido por hierro.

#### Objetivos específicos

1. Determinación de daño oxidativo y de muerte celular mediado por Fe.
2. Medición de los niveles de expresión y actividad de IRP1 en función de diferentes concentraciones de Fe.
3. Determinación de la actividad de NF $\kappa$ B mediada por Fe.
4. Medición de los niveles de expresión de las óxido nítrico sintasas en función a Fe.
5. Determinar el efecto de Fe en los niveles de óxido nítrico y en la nitrosilación de IRP1.
6. Efecto de inhibidores de la actividad de NF $\kappa$ B y NOS en la activación de IRP1 mediada por hierro.
7. Efecto de dadores de NO en la activación de IRP1 mediada por Fe.
8. Efecto de inhibidores y dadores de NO en los niveles de pool de Fe reactivo.
9. Efecto de inhibidores y dadores de NO en los niveles de glutatión reducido.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Material Biológico

La línea celular SH-SY5Y (American Type Culture Collection # CRL-2266, Rockville, MD) es un tercer subclon sucesivo de la línea SK-N-SH, la cual fue originalmente establecida de un cáncer de médula ósea (Encinas y col., 2000). La línea parental SK-N-SH compromete al menos dos fenotipos distintos morfológica y bioquímicamente: neuroblástico (tipo N) y substrato adherente (tipo S), quienes pueden caer en transdiferenciación. Al ser derivada de un subclon neuroblástico, esta línea celular retiene una pequeña proporción de células de tipo S (Encinas y col., 2000). Células SH-SY5Y pueden ser morfológicamente diferenciadas en células neuronales, dependiendo su fenotipo del agente inductor. Otra de las características de estas células es que exhiben moderados niveles de actividad dopamina beta hidroxilasa y crecen como centros de células neuroblásticas con múltiples, cortas y finas proyecciones celulares (neuritas).

#### 4.1.2 Reactivos

Generales: Ácido bórico, acrilamida, azul de bromofenol, azul Tripán,  $\beta$ -Mercaptoetanol, bis- acrilamida, BSA, buffer fosfato salino (PBS),  $\text{CaCl}_2$ , cóctel de inhibidores de proteasa, desferal, DTT, EDTA, estándar de peso molecular, etanol, glicerol, HCl, heparina, Hepes,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KCl, marcador de peso molecular, metanol,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgOAc}$ , NaCl, NADPH, NaOH, NP-40, paraformaldehído, PMSF, PSA,

sacarosa, SDS, TBS, Temed, Tris base, Tritón X-100, Tween 20, xilencianol (Sigma, St Louis, EEUU). L-NNA y SNAP (Calbiochem, EEUU).

Anticuerpos: Anti-IRP humano; anti IRP1 humano, dirigido contra la secuencia FNRRAD(fosfo)SLQKNQDLC específica para IRP1 (Dr. Richard Eisenstein, Departamento de Ciencias, Universidad de Wisconsin-Madison); anti IRP2, anticuerpo contra un dominio exclusivo de IRP2 (Dr. E. Leibold, Programa Eccles en Biología y Genética Molecular Humana, Universidad de UTA) (Guo y col., 1995); anti nitrotirosinas (Molecular Probes, Eugene, EEUU); anti-NF $\kappa$ B subunidad p65 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU); anti-nNOS (BD Biosciences Pharmingen, EEUU); anti-iNOS (Sigma, St Louis, EEUU); anti 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Calbiochem, EEUU); anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano; anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano, anti IgG-Rodamina.

Cultivo Celular: Suero fetal bovino, medio MEM, medio F12, tripsina, fungizona, penicilina, estreptomycin, aminoácidos no esenciales, NaHCO<sub>3</sub>.

Radioisótopos:  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-CTP,  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-UTP (Perkin Elmer, Boston, EEUU), <sup>55</sup>Fe (New England Nuclear, Boston, EEUU).

Otros: Kit de quimioluminiscencia para análisis de Western blot Super Signal (Pierce Chem. Co., Rockford, IL), kit de detección de producción de óxido nítrico Griess Reagent (Promega, EEUU).

## **4.2 METODOS**

**4.2.1 Cultivo Celular:** Células SH-SY5Y fueron cultivadas en medio MEM-F12 suplementado con 10 % SFB, 100.000 UI de penicilina/estreptomina, 25 mg/ml de fungizona, aminoácidos no esenciales, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  y 20 mM de Hepes. Se sembraron 30.0000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en botellas de 25 ml. SH-SY5Y fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 7-8 días con cambio de medio cada 2 a 3 días. Durante este periodo las células alcanzan confluencia, obteniéndose 3-4 x 10<sup>6</sup> células por botella. Las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

**4.2.2 Obtención de células SH-SY5Y con distintas concentraciones de hierro:** Para obtener extractos celulares bajo diferentes condiciones, se sembraron 5 x 10<sup>5</sup> células en placas p60 y se cultivaron durante 8 días en condiciones normales. Al octavo día, los cultivos se sometieron a tratamientos con medio MEM/F12 10% FBS suplementado con 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  Fe como complejo  $\text{FeCl}_3$ -nitrilotriacetato de sodio (NTA, 1:2.2, mol:mol) por 48 horas.

**4.2.3 Extractos de proteína celular:** Las células tratadas se lavaron con 2 mL de PBS y luego se desprendieron del plástico con TRIS-EDTA. A continuación se centrifugaron y el pellet celular se lavó con 0.5 mL de PBS. Las células se resuspendieron en buffer de lisis (25  $\mu\text{l}$  por 1 x 10<sup>6</sup> células de NP40 0.5%, Hepes 10 mM pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, KCl 40 mM, PMSF 1 mM, Glicerol 5%, DTT 1 mM, Leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Aprotinina 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Pepstatina A 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La mezcla se agitó en vortex por 30 segundos y luego se incubó en hielo por 15 minutos. Finalmente la mezcla se centrifugó por 15 minutos a 12.000 x g y el pellet celular contenido en el sobrenadante se guardó en alícuotas a –

80°C. La concentración de proteínas fue determinada por el método del BCA utilizando BSA como estándar.

**4.2.4 Extractos de proteína nuclear:** Las células cultivadas fueron lavadas con 2 mL de PBS y luego resuspendidas en 1 mL de PBS. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a 2.500 r.p.m. a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 50 µL de buffer sacarosa (0.32 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgOAc, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF e inhibidores de proteasas) y centrifugado a 2.500 r.p.m. a 4°C. La fracción citosólica contenida en el sobrenadante se guardó en alícuotas a -80°C. El pellet nuclear fue lavado y resuspendido con 0.5 mL de buffer sacarosa sin NP-40 y luego centrifugado en las mismas condiciones. El siguiente paso fue aspirar el sobrenadante y resuspender por vortex el volumen celular en 15 µL de buffer Low Salt (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glicerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF e inhibidores de proteasas) y a continuación se agregó lentamente un volumen equivalente de buffer High Salt (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 800 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glicerol, 1% NP-40, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF e inhibidores de proteasas). La mezcla a continuación se agitó por 30 minutos a 4°C y luego se centrifugan a 14.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante que contiene el extracto nuclear fue guardado en alícuotas a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada por el método del BCA utilizando BSA como estándar.

**4.2.5 Viabilidad Celular:** La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de actividad de la deshidrogenasa mitocondrial (enzima de todas las células vivas) o ensayo de MTT (Mossman, 1983). Este ensayo se basa en la determinación de la

actividad mitocondrial a través de la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Este compuesto es una sal de tetrazolio soluble, de color amarillo, que se transforma en un formazán insoluble por acción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial generando una coloración azul de diferentes intensidades de acuerdo con el grado de viabilidad de la célula. Se considera que la cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Se sembraron SH-SY5Y en placas de 96 pocillos (3500 células por pocillo) y se cultivaron durante ocho días en condiciones normales. Al finalizar los tiempos de tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o Fe respectivamente, se añadió MTT en un volumen del 10% respecto al volumen total del medio presente en el pocillo y las células se incubaron durante 2-4 horas a 37°C y en 5% CO<sub>2</sub>. La reacción se detuvo al agregar la solución de detección de MTT (n', n-dimetilformamida al 50% pH 7.4, SDS 20%), adicionándose un volumen del 50% con respecto del volumen total del medio presente y se incubó toda la noche a 37°C y en 5% CO<sub>2</sub>. Las absorbancias fueron medidas a 540 y 650 nm. Los resultados fueron determinados al restar los valores obtenidos a 650 nm de los obtenidos a 540 nm.

**4.2.6 Incorporación de Fe:** La capacidad de incorporar Fe por las células SH-SY5Y fue determinada mediante la incorporación del isótopo radioactivo <sup>55</sup>Fe. Células fueron crecidas durante 8 días en medio regular y luego incubadas por 48 horas con 8 y 80 µM de Fe. Luego de los dos días de tratamiento, las células fueron lavadas y la radioactividad del contenido de <sup>55</sup>Fe fue determinada en un contador beta. La incorporación de Fe fue expresada como nmoles <sup>55</sup>Fe/mg de proteína de extracto celular.

**4.2.7 Acumulación de Fe:** Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en condiciones de cultivo normales y luego incubadas por 48 horas con concentraciones crecientes de Fe. Después las células fueron desprendidas del plástico con Tris-EDTA y los niveles de Fe fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica como se describe en (Aguirre y col., 2005). Los niveles de Fe intracelular fueron expresados como nmoles Fe/mg de proteína.

#### **4.2.8 Determinación de daño oxidativo:**

**A) DCFDA:** La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue determinada mediante el uso de la sonda fluorescente 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCDHFDA) como se describe en (Núñez-Millacura y col., 2002). DCDHF-DA es una molécula permeable que en el interior de las células se hidroliza a un compuesto no fluorescente 2' 7' diclorodihidrofluorescina (DCDHF). En un ambiente de estrés oxidativo esta molécula emite fluorescencia producto de su oxidación a 2' 7' diclorofluoresceína (DCF). Por lo tanto, en células vivas la fluorescencia de DCF refleja directamente el estado oxidativo de la célula. Células SH-SY5Y fueron crecidas en cubreobjetos durante ocho días en condiciones normales y luego sometidas por 48 horas a concentraciones crecientes de hierro. Luego, las células fueron lavadas e incubadas por 45 minutos en DCDHF-DA 10  $\mu$ M. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces en PBS salino y la fluorescencia fue determinada en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200M, equipado con controladores de temperatura y de CO<sub>2</sub>. La temperatura fue mantenida a 37 °C y el CO<sub>2</sub> a 5%, respectivamente. La intensidad de fluorescencia de un promedio de células de las imágenes capturadas fue determinada utilizando el programa de análisis molecular Quantity One de Biorad. Los

valores de fluorescencia fueron expresados como unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia.

**B) Aductos de HNE:** El daño oxidativo fue determinado a través del estudio de modificaciones a proteínas por la formación de aductos de HNE. HNE es un aldehído $\alpha,\beta$ -no saturado producto de la peroxidación de ácidos grasos  $\omega 6$ -no saturados que forman aductos con residuos de aminoácidos como histidina, lisina y cisteína. Células SH-SY5Y fueron cultivadas durante ocho días en condiciones normales y luego sometidas a concentraciones crecientes de hierro durante 48 horas. Treinta  $\mu\text{g}$  de proteína de extractos celulares fueron cargados en geles de 10% SDS/poliacrilamida y transferidos a membranas de nitrocelulosa, respectivamente. Luego las membranas fueron bloqueadas en 5% leche descremada disuelta en buffer TBS buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM y 0.05% Tween 20, pH 7.6) por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de bloqueo, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal HNEJ-2, que reconoce aductos HNE-histidina (Núñez-Millacura y col., 2002). Luego las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1/10.000). El segundo anticuerpo fue visualizado mediante el kit quimioluminiscencia Super Signal (Pierce, N° de catalogo 34084), siguiendo el protocolo que indica este producto.

#### **4.2.9 Estudios de la proteína IRP1:**

**A) Actividad de IRP: Ensayo de cambio de banda:** La actividad de IRP fue determinada en células SH-SY5Y expuestas previamente a concentraciones crecientes de Fe por 48 horas en un ensayo de retardo en gel como se describe en (Núñez-

Millacura y col., 2002). En breve, se mezcló 2  $\mu$ L de solución de transcrito (IRE de la región 5' no codificante del mRNA de la cadena H de la ferritina humana) con 5  $\mu$ g de proteínas del extracto celular en ausencia o presencia de  $\beta$ -Mercaptoetanol 2 % (control de actividad máxima de IRP1) e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó 1 unidad de RNAasa T1 para degradar partes no protegidas del transcrito de RNA e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó heparina (2 mg/ml) para desplazar las uniones no específicas de proteínas al RNA, e incubó por otros 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue cargada con tampón de carga 4x (Tris-HCl 30 mM pH 7.5, sacarosa 40%, bromofenol 0.2% y xilencianol 0.2%) en un gel nativo de poliacrilamida al 6% (archilamida:bisacrilamida, 60:1) en tampón TBE 1x (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) y se corrió a 200 volts por 2 horas. Luego, el gel se adhirió a papel 3MM y fue secado por 1 hora a 80 °C al vacío, finalmente fue expuesto a una película para autoradiografía (XAR-OMAT Kodak) durante toda la noche.

Por su parte, se realizaron ensayos de super shift (super-retardo en gel) para determinar específicamente la actividad de IRP1; para esto, los extractos celulares fueron incubados por 30 minutos antes de realizar la electroforesis con un anticuerpo que reconoce específicamente el dominio exclusivo de 73 aminoácidos de IRP2. Finalmente, la radioactividad en las bandas fue cuantificada en un aparato Phosphoimager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y analizadas con el programa de análisis molecular Quantity One. La cuantificación de la actividad de IRP1 fue determinada del radio entre la actividad en ausencia de  $\beta$ -Mercaptoetanol y de la actividad en presencia de 2 % de  $\beta$ -Mercaptoetanol. El tratamiento de IRP1 con  $\beta$ -Mercaptoetanol permite la conversión de cualquier estado de IRP1 a la forma reducida

de apoproteína (actividad de unión a secuencias IREs), por lo que corresponde a la actividad de unión total a RNA de esta proteína.

**B) Inmunodetección de nitrotirosinas y de IRP1:** Los niveles de proteína y de nitración de IRP1 bajo exposición a Fe fueron determinados por análisis de Western blot previamente descrito. Células SH-SY5Y fueron crecidas por 8 días en medio regular y luego tratadas por 48 horas con concentraciones crecientes de Fe. Para este objetivo se utilizaron los anticuerpos anti-nitrotirosinas (1:1.000) y anti-IRP1 (1:200), respectivamente.

**4.2.10 Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP):** El pool de hierro lábil fue determinado mediante espectrofluorimetría como se describe en (Núñez-Millacura y col., 2002). Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en condiciones normales y luego tratadas con Fe por 48 horas. El papel del NO sobre los niveles de LIP en presencia de Fe fue evaluado mediante el uso del inhibidor competitivo de las NOS, L-NNA y del dador de NO, SNAP. Una vez finalizado los respectivos tratamientos, las células fueron lavadas con buffer MOPS salino (20 mM MOPS-OH, 150 mM NaCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM glucosa pH 7.4) y luego incubadas con 0.5  $\mu\text{M}$  Calceína-AM por 5 minutos a 37°C. Estas condiciones generan concentraciones internas de calceína no-limitantes para la determinación de un amplio rango de concentraciones internas de hierro (Epsztejn y col., 1997). Después de lavar la calceína no internalizada, las células fueron desprendidas del plástico e incubadas con MOPS salino durante los tiempos de medición. Luego de determinar la fluorescencia basal de la calceína (excitación 488 nm, emisión 517 nm), la fluorescencia del complejo calceína-Fe fue desapagada por la adición del quelante de Fe, SIH. El aumento en la fluorescencia obtenido es directamente proporcional al contenido de Fe reactivo (Epsztejn y col., 1997).

#### **4.2.11 Estudio de las proteínas NOS:**

**A) Inmunodetección de nNOS e iNOS:** Los niveles de proteína nNOS e iNOS en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones crecientes de Fe fueron determinados por análisis de Western blot previamente descrito. Estas células fueron crecidas por 8 días y luego tratadas por 48 horas con concentraciones crecientes de Fe. La dilución de los anticuerpos nNOS e iNOS utilizada fue de 1:1.000 para ambos ensayos.

**B) Producción de óxido nítrico:** La formación de nitrito, uno de los productos finales en el metabolismo del óxido nítrico, fue determinado en el medio de cultivo. Células SH-SY5Y fueron cultivadas por 48 horas en presencia de concentraciones crecientes de Fe. Los niveles de nitrito fueron determinados espectrofotométricamente a 543 nm utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Bredt y Snyder, 1994). En breve, este ensayo se basa en una reacción química donde ácido sulfanílico reacciona con nitrito en condiciones acídicas para formar una sal de diazonio. A continuación, esta sal de diazonio es acoplada a N-(1-naftil) etilendiamina formando una sonda azocolorante violeta, la que puede ser cuantificada espectrofotométricamente. Finalmente, los resultados se expresan en base a una curva de referencia estándar de nitrito (0 – 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ ), la que se prepara para cada ensayo independiente, para así obtener una cuantificación exacta de  $\text{NO}_2^-$  en las muestras experimentales.

**4.2.12 Niveles de GSH:** Los niveles de glutatión reducido (GSH) fueron determinados como esta descrito en (Núñez y col., 2004). Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días y luego sometidas a tratamientos con concentraciones crecientes de Fe por 48 horas. Los niveles intracelulares de GSH fueron expresados como nmoles/mg de proteína.

#### **4.2.13 Estudio del factor de transcripción NF $\kappa$ B:**

**A) Inmunodetección de NF $\kappa$ B:** La actividad del factor de transcripción NF $\kappa$ B fue determinada a través de la detección de la subunidad p65 en extractos de proteína nuclear. Células SH-SY5Y fueron crecidas por 8 días y luego expuestas a diferentes concentraciones de Fe por 48 horas de Fe. Los niveles de estas proteínas fueron determinadas por análisis de Western blot previamente descrito. La dilución del anticuerpo contra p65 fue de 1:1.000.

**B) Inmunocitoquímica de NF $\kappa$ B:** La actividad de este factor de transcripción también fue estudiada mediante ensayos de inmunocitoquímica. Células SH-SY5Y fueron crecidas en cubreobjetos durante ocho días y luego tratadas por 48 horas con 80  $\mu$ M de Fe. A continuación las células fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído-4% sacarosa por 10 minutos a 37°C. Luego estas células fueron permeabilizadas por 5 minutos con PBS-Tritón X-100 0.2% y después bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente con PBS-5% BSA. Una vez finalizado el bloqueo, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti p65 (1:100) durante la noche en una cámara húmeda y luego incubadas por 1 hora con anti IgG-Rodamina a temperatura ambiente. Finalmente, con el fin de observar los núcleos de estas células se utilizó el marcador nuclear H $\ddot{o}$ chst (color azul).

**4.2.14 Análisis estadístico:** Las variables fueron medidas en triplicado y los experimentos fueron repetidos al menos dos veces. La variabilidad entre los experimentos fue menor al 20%. Anova fue el test estadístico utilizado para determinar las diferencias en promedios y t-student (test de comparación múltiple Bonferroni y

Dunnet) fue usado para comparar estos valores. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $p < 0.05$ .

## V. RESULTADOS

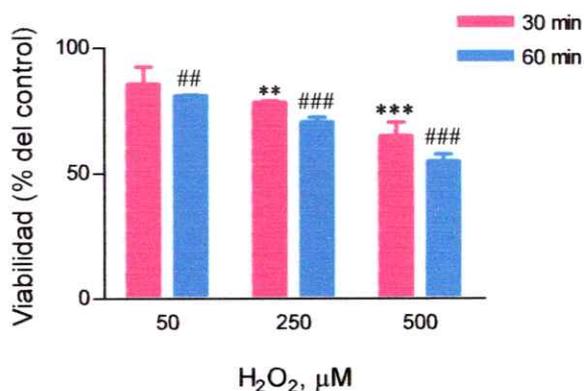
### 5.1 Fe y estrés oxidativo.

#### 5.1.1 Viabilidad celular en células SH-SY5Y sometidas a peróxido de hidrógeno.

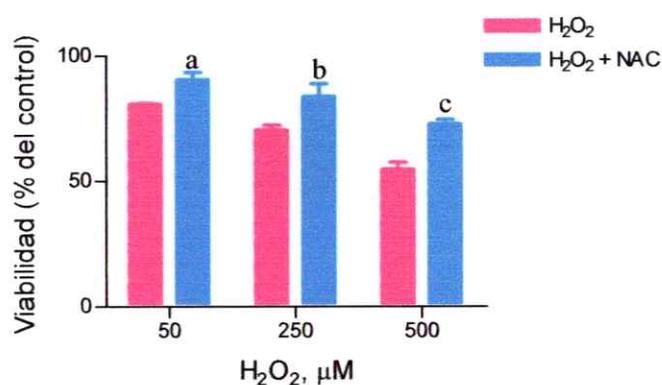
Inicialmente células SH-SY5Y fueron expuestas a  $H_2O_2$  para determinar su sensibilidad a estrés oxidativo. Las células fueron crecidas por 8 días en condiciones normales y luego fueron tratadas con 50, 250 y 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por 30 y 60 minutos respectivamente (Figura 3A). Los resultados obtenidos demuestran que estas células son sensibles a estrés oxidativo ya que se observa un aumento significativo en la muerte celular inducido por  $H_2O_2$  tanto en función de la concentración ( $p < 0.01$ ) como del tiempo de exposición.

Por otra parte quisimos determinar si la muerte celular en presencia de  $H_2O_2$  efectivamente era mediada por estrés oxidativo; para esto las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  por 60 minutos en presencia del antioxidante NAC. Los resultados obtenidos (Figura 3B) confirman que la muerte celular de las células SH-SY5Y fue mediada por estrés oxidativo ya que el uso del antioxidante NAC contrarrestó la disminución en la sobrevivencia de estas células sometidas a estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ .

A)



B)



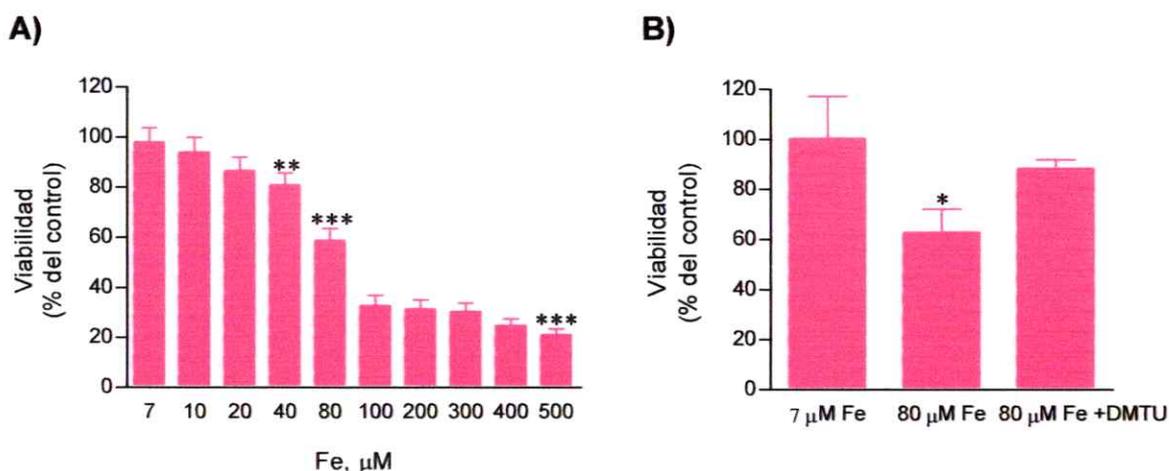
**Figura 3: Viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** A) Células SH-SY5Y fueron cultivadas con 50, 250 y 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 y 60 minutos. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos de MTT. \*\*: p < 0.01 en referencia al control (sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), \*\*\*: p < 0.001 en referencia al control. ##: p < 0.01 en referencia al control, ###: p < 0.001 en referencia al control. B) N-acetil cisteína, NAC, 10 mM fue utilizado como antioxidante para contrarrestar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la viabilidad de estas células. a: 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NAC en relación a 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p < 0.05; b: 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NAC en relación a 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p < 0.01; c: 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NAC en relación a 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p < 0.001.

### 5.1.2 Viabilidad celular en células SH-SY5Y sometidas Fe

A continuación quisimos determinar muerte celular inducida por Fe. Para esto células SH-SY5Y fueron sometidas por 48 horas a diferentes concentraciones de Fe y luego la viabilidad celular fue determinada como se describe en materiales y métodos. De acuerdo a los datos presentados en la Figura 4A podemos observar una disminución en la viabilidad de estas células en función de la concentración de Fe; sin

embargo no se observa cambios significativos en la pérdida de viabilidad celular cuando las células fueron cultivadas por 2 días entre 5 y 20  $\mu\text{M}$  Fe. En cambio, cuando las células son incubadas sobre 40  $\mu\text{M}$  de Fe se observa un aumento significativo de la muerte celular ( $p < 0.01$ ). Cabe recalcar que una fracción de estas células se mantiene viables con altas concentraciones de Fe en el medio de cultivo.

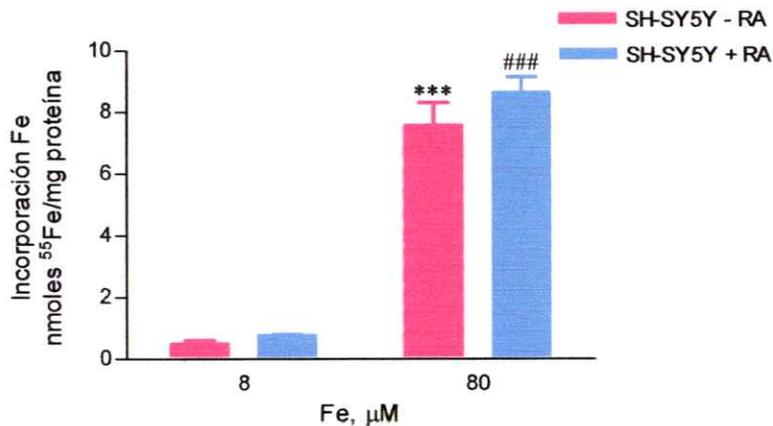
A continuación quisimos observar si la muerte celular provocada por Fe era mediante la formación de estrés oxidativo. Para esto incubamos células en 80  $\mu\text{M}$  de Fe más un antioxidante, DMTU, en el medio de cultivo (Figura 4B). Los resultados muestran un aumento en la sobrevivencia cuando DMTU fue utilizado, indicando así que el efecto de Fe en la muerte celular de SH-SY5Y fue a través de un aumento del estrés oxidativo.



**Figura 4: Viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a Fe.** A) Células SH-SY5Y fueron cultivadas con 7, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$  de Fe:NTA (1:2.2 mol:mol) por 48 horas. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos de MTT. \*\*:  $p < 0.01$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe, \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe. B) Para determinar si el efecto del Fe sobre la muerte celular es producto de una alteración oxidativa en el ambiente de estas células, 0.5 mM de DMTU fue agregado al medio de cultivo por 48 horas en presencia de 80  $\mu\text{M}$  Fe. \*:  $p < 0.05$  en referencia al control (7  $\mu\text{M}$  Fe).

### 5.1.3 Incorporación de Fe por células SH-SY5Y.

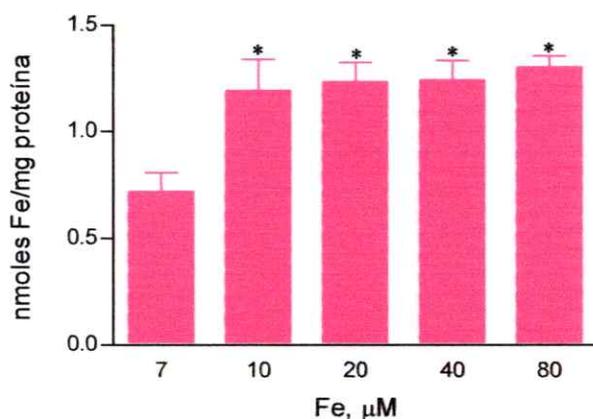
A continuación quisimos determinar la incorporación de Fe en células de neuroblastoma SH-SY5Y y en células de neuroblastoma diferenciadas con 10  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico a un fenotipo neuronal (Encinas y col., 2000). Ambos tipos celulares fueron cultivados por 48 horas en medio regular (8  $\mu\text{M}$  de Fe) y en medio con sobrecarga de Fe (80  $\mu\text{M}$ ), realizándose luego el ensayo de incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  descrito previamente en materiales y métodos. Los resultados obtenidos en la Figura 5 muestran un significativo aumento en la incorporación de Fe en células expuestas a sobrecarga de este metal en ambos tipos celulares. Por otra parte, no se observaron cambios significativos en la incorporación de Fe entre ambos tipos de cultivos celulares, postulando a estas células como un buen modelo de estudio neuronal.



**Figura 5: Incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  en células SH-SY5Y.** Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y células diferenciadas a un fenotipo neuronal con ácido retinoico (10 $\mu\text{M}$ ) fueron cultivadas por 48 horas en medio regular y en presencia de 80  $\mu\text{M}$  de Fe. Luego la radioactividad del  $^{55}\text{Fe}$  fue determinada en un contador beta. El gráfico muestra los niveles de  $^{55}\text{Fe}$  intracelulares como función de las diferentes concentraciones de  $^{55}\text{Fe}$  en el medio de cultivo. La incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  fue expresada como nmoles de  $^{55}\text{Fe}$ / mg de proteína. \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 8  $\mu\text{M}$  Fe. ###:  $p < 0.001$  en referencia a 8  $\mu\text{M}$  Fe.

#### 5.1.4 Contenido de Fe en células SH-SY5Y.

Al observar un aumento en la incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  por parte de las células SH-SY5Y, a continuación quisimos medir los niveles de Fe total en estas células mediante espectrometría de absorción atómica. Al aumentar la concentración de 7 a 10  $\mu\text{M}$  de Fe en el medio de cultivo se observa un aumento en los niveles de Fe intracelular (Figura 6). Este incremento a su vez, se mantiene cuando las células son expuestas a concentraciones de sobrecarga de Fe (20 – 80  $\mu\text{M}$ ).



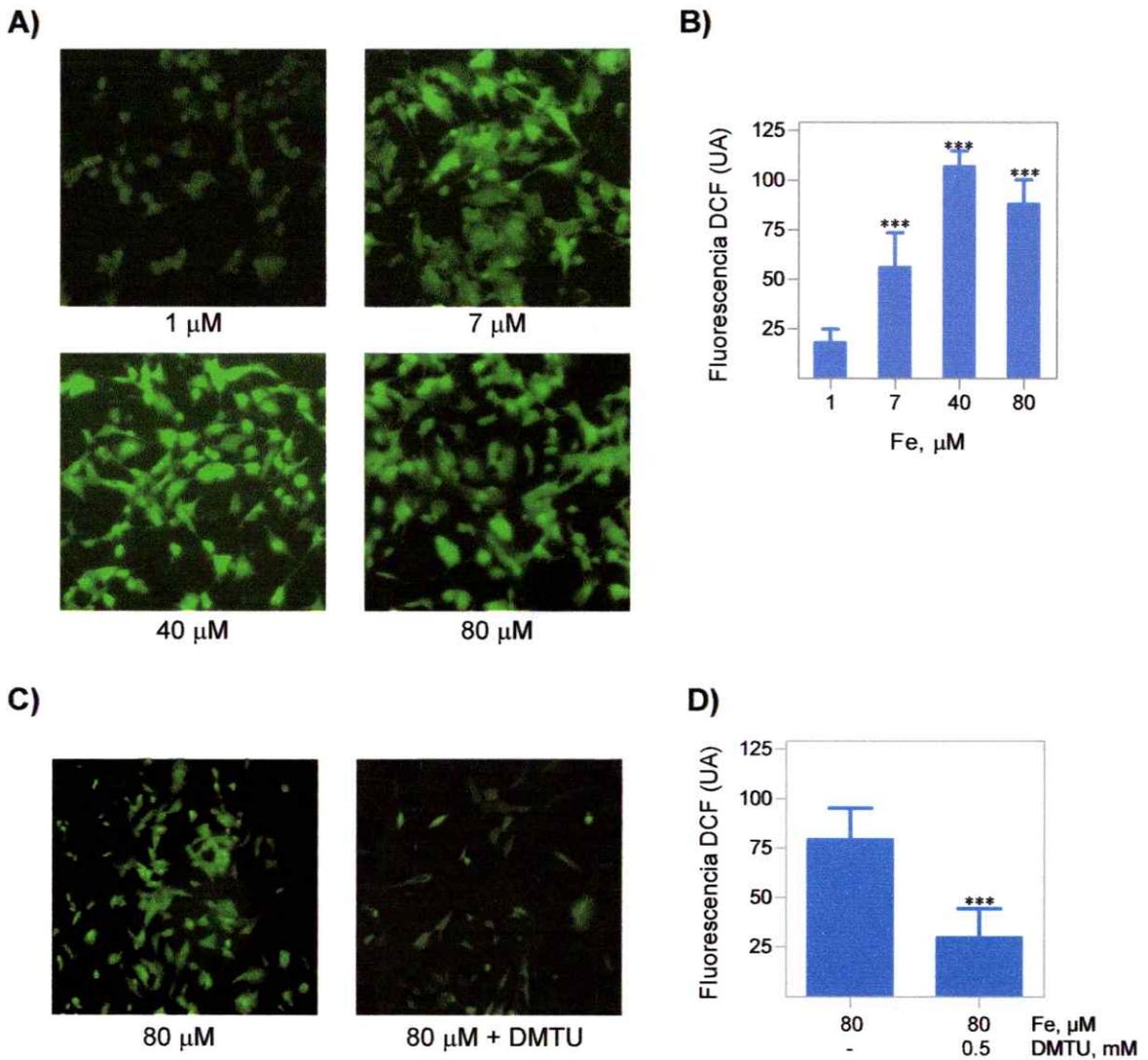
**Figura 6: Contenido intracelular de Fe en células SH-SY5Y.** Células SH-SY5Y fueron incubadas por dos días con 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe. Luego estas células fueron desprendidas del plástico y resuspendidas en buffer salino. Los niveles totales de Fe intracelulares fueron determinados en un espectrómetro de absorción atómica. El gráfico muestra los niveles de totales de Fe intracelular como función de las diferentes concentraciones de Fe presentes en el medio de cultivo. Los niveles de Fe fueron expresados como nmoles de Fe/ mg de proteína. \*:  $p < 0.05$  en referencia al control (7  $\mu\text{M}$  Fe).

#### 5.1.5 Determinación de daño oxidativo inducido por Fe en células SH-SY5Y.

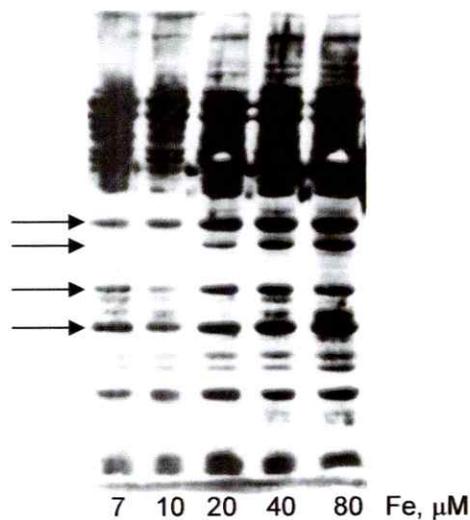
La habilidad del Fe para inducir daño oxidativo en células SH-SY5Y fue evaluado mediante la producción de ROS y por la formación de aductos de HNE en proteínas.

La producción de ROS mediada por Fe se observó mediante fluorescencia de DCF. Se encontró una relación directa entre sobrecarga de Fe y fluorescencia de DCF, con la fluorescencia distribuida uniformemente a través de las células (Figura 7A). La cuantificación de sobrecarga de Fe en estas células muestra que la producción de ROS aumenta significativamente cuando las células son incubadas en 7, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe en comparación con células deficientes de este metal. La intensidad de fluorescencia observada en células expuestas a 80  $\mu\text{M}$  de Fe puede deberse a un proceso adaptativo de las células sobrevivientes, ya que en estas condiciones existe una marcada muerte celular (aproximadamente 50%, Figura 4A). Sobre la base de estos resultados podemos establecer una relación directa entre sobrecarga de Fe y producción de especies reactivas de oxígeno en células SH-SY5Y. A su vez quisimos observar el efecto del antioxidante DMTU sobre la producción de ROS inducida por Fe. Como muestra la figura 7C, células incubadas con 80  $\mu\text{M}$  de Fe más DMTU presentan una disminución en los niveles de fluorescencia de DCF.

Otra manera de determinar daño oxidativo es mediante la formación de aductos de HNE en proteínas modificadas por estrés oxidativo (materiales y métodos). Para probar este daño en proteínas inducido por Fe, determinamos la formación de aductos de HNE como función de Fe en el medio de cultivo. Inmunoreactividad contra el anticuerpo monoclonal HNEJ-2 revela un aumento en aductos de HNE en algunas proteínas cuando el Fe en el medio de cultivo aumentó de 10  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$  (Figura 8). Estos resultados indican que el Fe produce modificaciones oxidativas a proteínas.



**Figura 7: Daño oxidativo en células SH-SY5Y inducido por Fe. A)** Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en medio de cultivo regular y luego incubadas por 48 horas en medio suplementado con 7, 20 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe. Las células fueron cargadas con DCFH-DA y la fluorescencia de DCF fue determinada. Imágenes representativas de cultivos celulares son mostradas en A. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF en cultivos celulares sometidos a diferentes concentraciones de Fe. \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 1  $\mu\text{M}$  Fe. **C)** El antioxidante DMTU (0.5 mM) fue suministrado a células SHSY5Y en presencia de 80  $\mu\text{M}$  de Fe por 48 horas, con el fin de contrarrestar el efecto de Fe sobre la producción de ROS. **D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF en cultivos celulares sometidos a 80  $\mu\text{M}$  Fe en presencia de DMTU. \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 80  $\mu\text{M}$  Fe.



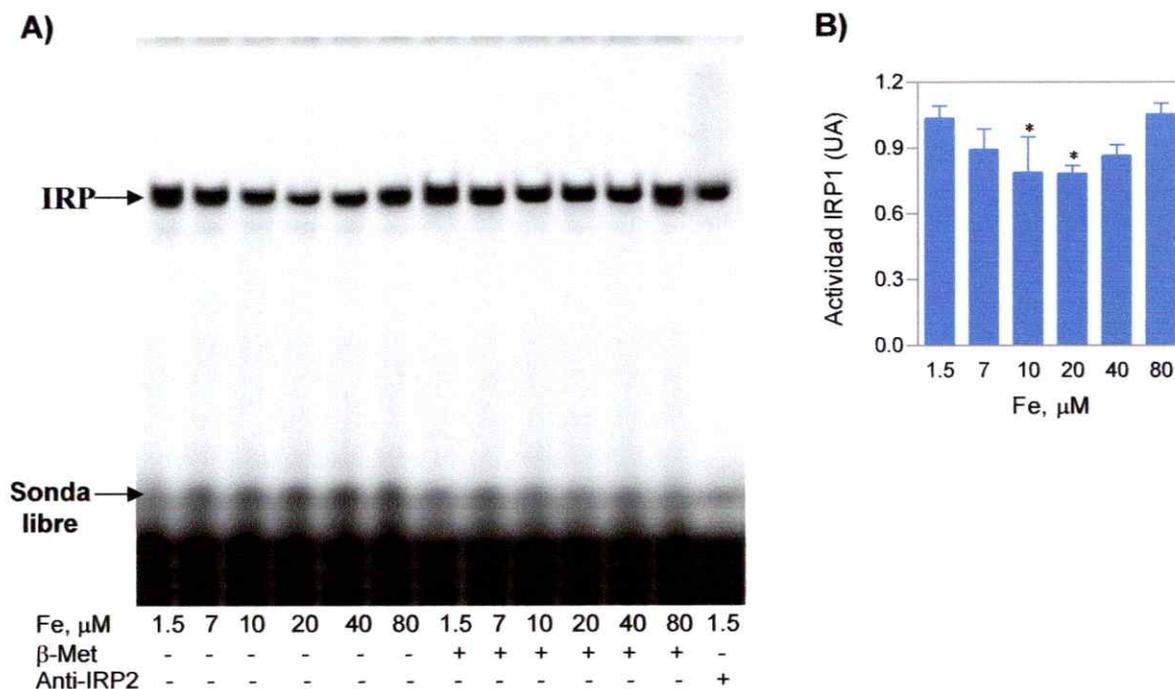
**Figura 8:** El daño oxidativo a proteínas fue determinado por la formación de aductos de HNE. Treinta  $\mu\text{g}$  de extractos de células SH-SY5Y cultivadas por dos días en medio MEM/F12 suplementado con 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe fueron sometidos a inmunodetección por Western blot usando el anticuerpo monoclonal HNEJ-2, el que detecta aductos de HNE en proteínas. Las flechas muestran las proteínas que fueron mayormente modificadas por el aumento de Fe.

## 5.2 IRP y Fe.

### 5.2.1 Estudios de actividad de IRP1 de unión a RNA mediada por Fe.

De acuerdo a los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos de control de la homeostasis celular de Fe, un aumento en los niveles de Fe intracelular debería inhibir la actividad IRP, finalizando así, el proceso de incorporación de Fe. En base a esto, quisimos determinar la actividad IRP en función de concentraciones crecientes de Fe mediante ensayos de band shift en células SHSY5Y expuestas durante 48 horas a este metal. La actividad tanto de IRP1 y de IRP2 fue diferenciada por el uso de  $\beta$ -Mercaptoetanol para la activación específica de IRP1 y por un ensayo de Super-Shift inducido por un anticuerpo específico contra el dominio exclusivo de 73 aminoácidos de IRP2.

La Figura 9 muestra que un aumento en las concentraciones de Fe en el medio de cultivo 1.5 a 20  $\mu\text{M}$  resulta en una disminución de la actividad de IRP. Sin embargo, un aumento en las concentraciones de Fe en el medio de 40 y 80  $\mu\text{M}$  incrementa la actividad de IRP. Esta reactivación de IRP mediada por Fe fue acompañada por un aumento en la incorporación de Fe (Figuras 5 y 6), sugiriendo que la actividad de IRP es funcional. Cabe recalcar que las condiciones en que se realizó este ensayo en las células SH-SY5Y no fue posible separar las bandas de IRP1 e IRP2. Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con los descritos para células de neuroblastoma de ratón N2A (Núñez-Millacura y col., 2002). En este trabajo se muestra que un aumento de Fe de 1.5 a 20  $\mu\text{M}$  resulta en una disminución de la actividad tanto de IRP1 como de IRP2. En cambio, un aumento en las concentraciones de Fe en el medio de 40 y 80  $\mu\text{M}$  elimina completamente la actividad de IRP2, pero la actividad de IRP1 aumenta en un ambiente de sobrecarga de Fe.



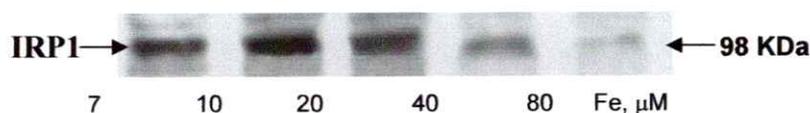
**Figura 9: Determinación de la actividad IRP en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones crecientes de Fe.** A) Células SH-SY5Y fueron incubadas por dos días en medio MEM/F12 suplementado con 1.5, 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe. La actividad de unión a IRE fue determinada en extractos celulares mediante ensayos de band shift. La actividad específica de IRP1 fue identificada por su activación con  $\beta$ -Mercaptoetanol y por su resistencia a los ensayos de super shift con un anticuerpo anti IRP2, mientras que la actividad de IRP2 fue identificada a través de ensayos de super shift con un anticuerpo específico para esta proteína. B) Cuantificación de la actividad de IRP1. La cuantificación de la actividad de IRP1 fue determinada de la razón entre la actividad en ausencia de  $\beta$ -Mercaptoetanol y de la actividad en presencia de  $\beta$ -Mercaptoetanol. \*:  $p < 0.05$  en referencia a 1.5 y 80  $\mu\text{M}$  Fe, respectivamente.

### 5.2.2 Estudios de niveles de expresión de IRP1 mediado por Fe.

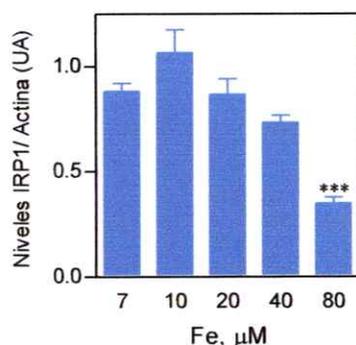
Producto de que el aumento observado en la actividad de IRP pudo deberse a un aumento en los niveles expresión de IRP1, a continuación determinamos los niveles de proteína en función de Fe. Extractos de células SH-SY5Y previamente tratadas con concentraciones crecientes de Fe fueron analizados por ensayos de Western blot (Figura 10). Los resultados obtenidos muestran una disminución en los niveles de la proteína en condiciones de sobrecarga de Fe (rango 20 a 80  $\mu\text{M}$ ). Sobre la base de

estos resultados podemos concluir que el aumento de la actividad de IRP1 no fue producto de un aumento en los niveles de proteína. Por lo tanto estos resultados sugieren que la pequeña cantidad de proteína presente en condiciones de sobrecarga de Fe (40-80  $\mu\text{M}$ ) se encuentra muy activa.

A)



B)



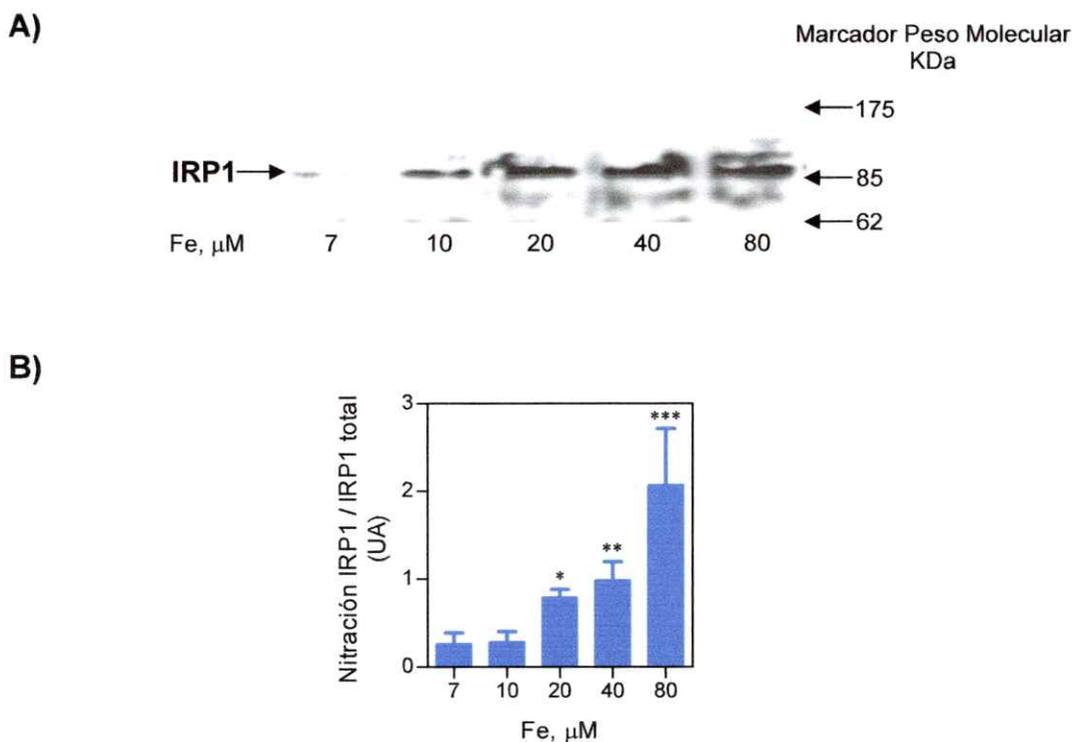
**Figura 10: Inmunodetección de IRP1 en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de Fe. A) Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en medio de cultivo regular y luego incubadas en medio MEM/F12 en presencia de 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe por 48 horas. Luego, los niveles de expresión de IRP1 en 30  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos de estas células fueron analizados por Western blot usando un anticuerpo específico contra IRP1. B) Cuantificación de los niveles de expresión de IRP1 por densitometría. La cuantificación de los niveles de IRP1 fue determinada de la razón entre los niveles de IRP1 y de los niveles de expresión de actina. \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe.**

### 5.2.3 Estudios de nitración de IRP1 inducido por Fe.

Una de las vías por la cual NO induce daño celular es mediante su reacción con  $\text{O}_2^-$  para formar peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), un potente oxidante que se une a residuos tirosina y sulfidrilos en proteínas. Además, esta demostrado que el  $\text{OONO}^-$  modula la actividad

aconitasa/unión a RNA de IRP1 por una interacción directa con grupos sulfidrilos en el núcleo Fe-S de IRP1 (Bouton y col., 1997).

La formación de  $\text{OONO}^-$  puede ser evaluada usando anticuerpos anti-nitrotirosinas, debido a que el  $\text{OONO}^-$  puede modificar residuos tirosina para formar 3-nitrotirosina. Además, nitrotirosinas son el mayor producto del ataque de  $\text{OONO}^-$  en proteínas; y por lo tanto, la nitración de tirosinas es el principal marcador de la formación de  $\text{OONO}^-$ . Para determinar el posible rol del Fe en la producción de  $\text{OONO}^-$ , células SH-SY5Y fueron expuestas a concentraciones crecientes de Fe y luego la formación de  $\text{OONO}^-$  fue analizada mediante ensayos de Western blot con un anticuerpo anti nitrotirosina. Los resultados obtenidos muestran que un aumento en los niveles de Fe en el medio de cultivo produce un incremento en la nitración de residuos tirosina en proteínas, sugiriendo un aumento en la producción de  $\text{OONO}^-$ . Una de las proteínas modificadas encontradas en este experimento fue IRP1 (Figura 11). Para verificar que los residuos de tirosina nitrados correspondían a los de la proteína IRP1, se realizó un lavado a las membranas incubadas previamente con anti nitrotirosinas y luego fueron re-incubadas con el anticuerpo anti IRP1. En ambos casos se detectó una proteína de 98 KDa. Sobre la base de estos resultados podemos establecer que el Fe fue capaz de inducir la nitración de residuos tirosina de IRP1, sugiriendo así un aumento en la producción de  $\text{OONO}^-$  en estas células.



**Figura 11. Nitrición de IRP1 inducida por Fe.** A) Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días y luego tratadas por 48 horas con concentraciones crecientes de Fe. Extractos celulares fueron preparados y los niveles de nitrición de tirosina en IRP1 fueron determinados en 30  $\mu\text{g}$  de proteínas mediante ensayos de Western blot usando un anticuerpo anti nitrotirosinas. B) Cuantificación de los niveles de nitrición de residuos tirosinas en IRP1. La cuantificación fue determinada de la razón entre los niveles de nitrición de IRP1 y de los niveles de proteína IRP1 total. \*:  $p < 0.05$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe, \*\*:  $p < 0.01$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe, \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe.

### 5.3 NO e IRP1.

#### 5.3.1 Efecto de NO sobre la actividad de IRP1 mediada por Fe.

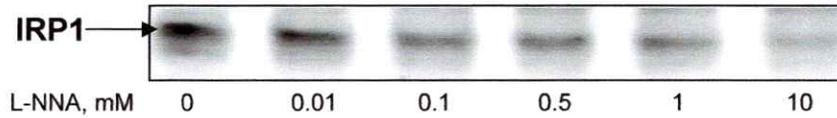
Múltiple evidencia concluye que uno de los factores que modula a IRP1 a nivel fisiológico es el óxido nítrico (Bouton, 1999). Es posible entonces, que el NO juegue un rol en el efecto de la acumulación de Fe sobre la actividad de IRP1 en células SH-SY5Y. Para esto, la actividad IRP1 fue determinada por ensayos de band shift en células expuestas a inhibidores de las NOS o dadores de NO respectivamente, en presencia de Fe. Cuando las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del

inhibidor competitivo de las NOS, N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina (L-NNA), se observó una progresiva disminución dosis dependiente en la actividad de IRP1 (Figura 12A-B). A su vez, cuando se evaluó el efecto de L-NNA en función del tiempo también se observó una disminución tiempo-dependiente (Figura 12C-D).

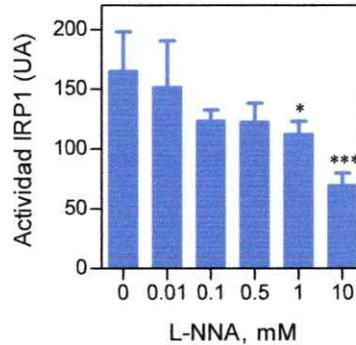
A continuación, quisimos observar si esta modulación sobre la actividad de IRP1 por NO se mantenía en un ambiente de estrés oxidativo inducido por Fe, para esto células SH-SY5Y fueron expuestas a una concentración alta de Fe (80  $\mu$ M) en presencia de L-NNA observándose una marcada disminución en la actividad de IRP1 (Figura 13). Por el contrario, cuando a células incubadas con 10  $\mu$ M de Fe se agregó un dador de NO, SNAP, a distintas concentraciones, se observó un progresivo aumento en la actividad de IRP1 (Figura 13). Estos resultados sugieren que el NO media la activación de IRP1 en un ambiente de estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Por otra parte, como experimento control evaluamos el rol del inhibidor competitivo de las NOS, L-NNA y del dador de NO, SNAP sobre los niveles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en estas células (Figura 14).

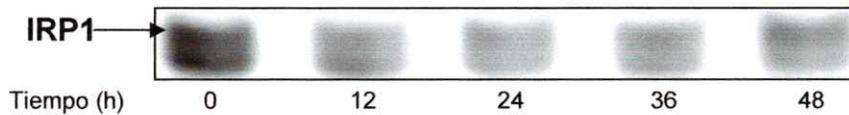
**A) Concentración dependiente**



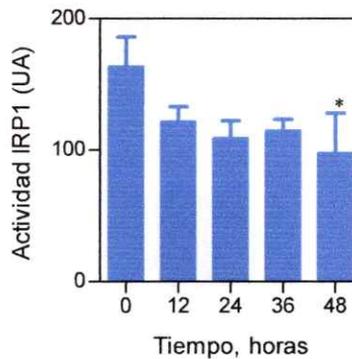
**B)**



**C) Tiempo dependiente**

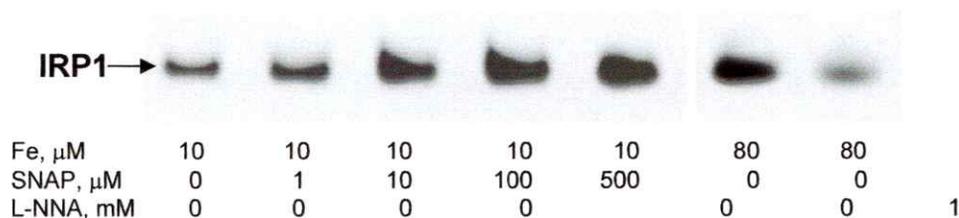


**D)**



**Figura 12: Papel del NO sobre la actividad de IRP1.** A) Para determinar el rol de NO sobre la actividad de IRP1, células SH-SY5Y fueron incubadas por 48 horas en medio MEM/F12 suplementado con 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 10 mM de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina, L-NNA. La actividad de IRP1 fue determinada mediante ensayos de band shift. B) Cuantificación de la actividad de IRP1 en función de diferentes concentraciones de L-NNA. \*: p < 0.05 en referencia al control (0 μM L-NNA), \*\*\*: p < 0.001 en referencia al control. C) Actividad de IRP1 en función del tiempo de tratamiento con L-NNA. Células SH-SY5Y fueron incubadas por 12, 24, 36 y 48 horas con 1 mM de L-NNA. D) Cuantificación de la actividad de IRP1 en función del tiempo de exposición a L-NNA. \*: p < 0.05 en referencia al control (0 μM L-NNA).

A)



B)

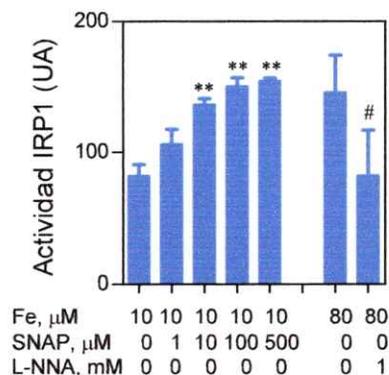


Figura 13: Papel del NO sobre la actividad de IRP1. A) Actividad de IRP1 en células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de Fe en presencia de 1, 10, 100 y 500  $\mu\text{M}$  del dador de NO, SNAP por 6 horas. A su vez, se muestra la actividad de IRP1 en extractos de células SH-SY5Y previamente cultivadas por 2 días con 80  $\mu\text{M}$  de Fe en presencia o ausencia de 1 mM de L-NNA. B) Cuantificación de la actividad de IRP1. \*\*:  $p < 0.01$  en referencia al control (0  $\mu\text{M}$  SNAP), #:  $p < 0.05$  en referencia a 80  $\mu\text{M}$  de Fe.

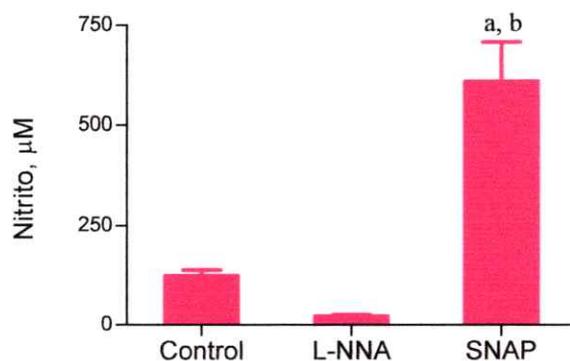
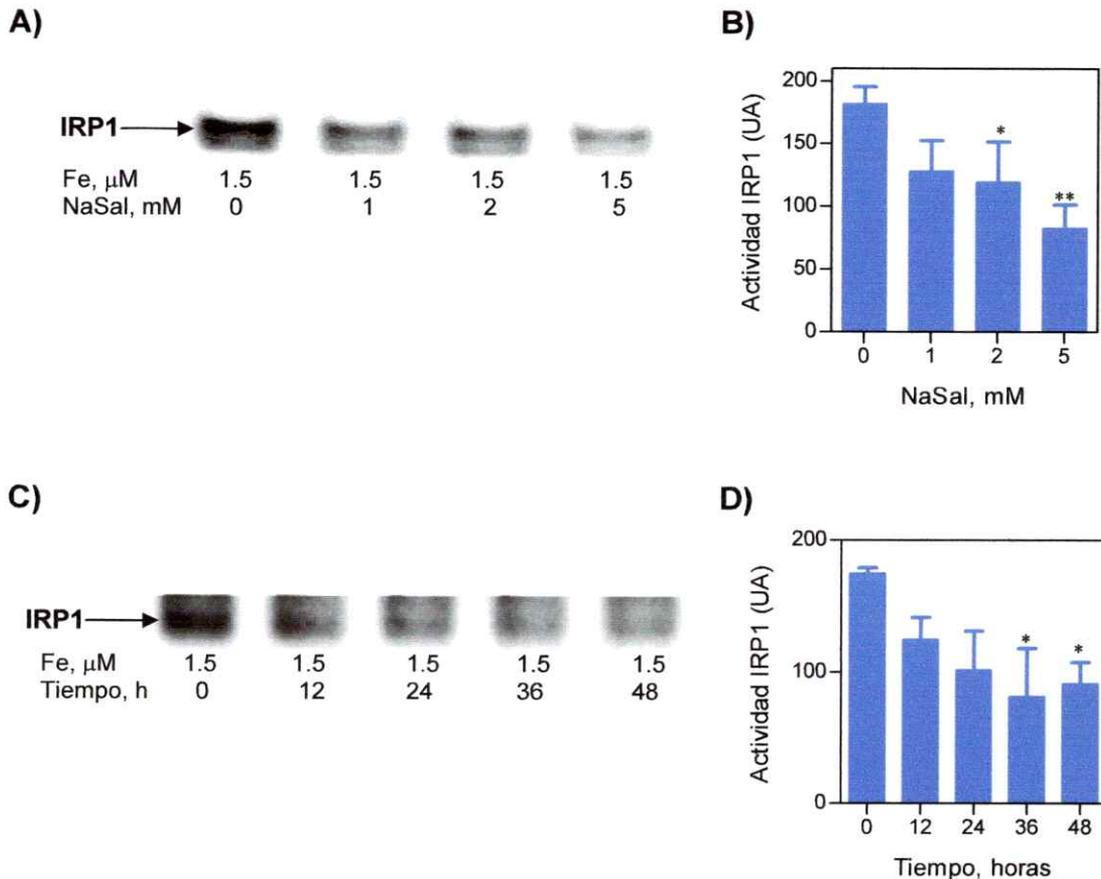


Figura 14: Los niveles de  $\text{NO}_2^-$  fueron determinados en células SH-SY5Y previamente tratadas con el inhibidor de las NOS, L-NNA y el dador de NO, SNAP, respectivamente. La producción de  $\text{NO}_2^-$  fue determinada en el medio de cultivo utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess. a:  $p < 0.01$  en referencia al control, b:  $p < 0.001$  en referencia a células tratadas con 1 mM de L-NNA.

## **5.4 Fe y NF $\kappa$ B.**

### **5.4.1 Efecto de NF $\kappa$ B en la activación de IRP1 mediada por Fe.**

A continuación quisimos observar si NF $\kappa$ B es parte de la vía de transducción de señales en la activación de IRP1. Para probar esta hipótesis, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de este factor Salicilato de Sodio, NaSal. La disminución en la actividad de IRP1 fue directamente proporcional a la concentración de NaSal, es decir, a medida que se aumentó la concentración de NaSal se observó una marcada disminución en la actividad de esta proteína con respecto al control (Figura 15A). Luego medimos la actividad de IRP1 en función del tiempo de tratamiento con NaSal. Los resultados mostraron que la inhibición de IRP1 también fue tiempo dependiente (Figura 15C). Por lo tanto, NF $\kappa$ B estaría en la vía de transducción de señales en la modulación de la actividad de IRP1.



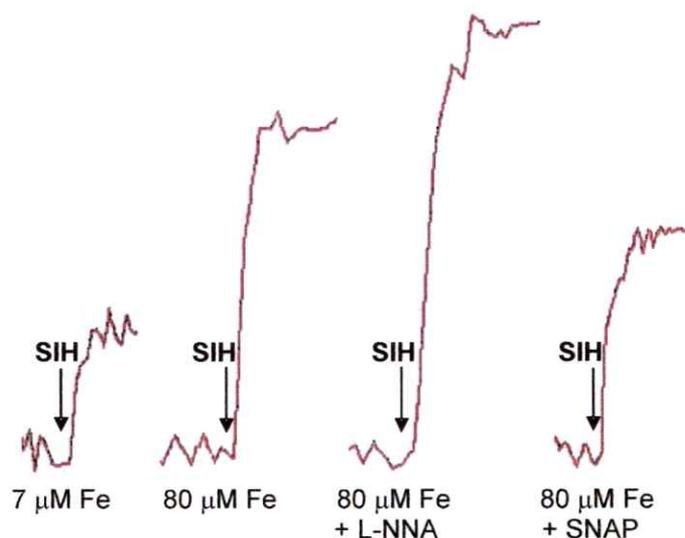
**Figura 15: Papel del factor de transcripción NF $\kappa$ B sobre la actividad de IRP1.** A) Células SH-SY5Y fueron tratadas por 48 horas con 1.5  $\mu\text{M}$  de Fe en presencia de 1, 2 y 5 mM del inhibidor de NF $\kappa$ B, NaSal. La actividad de IRP1 fue determinada mediante ensayos de band shift. B) Cuantificación de la actividad de IRP1 en función de la concentración de NaSal. \*:  $p < 0.05$  en referencia al control, \*\*:  $p < 0.01$  en referencia al control. C) Actividad de IRP1 en función del tiempo de tratamiento con NaSal. Células SH-SY5Y fueron incubadas por 12, 24, 36 y 48 horas con 1 mM de NaSal. D) Cuantificación de la actividad de IRP1 en función del tiempo de exposición a NaSal. \*:  $p < 0.05$  en referencia al control.

## 5.5 NO y estrés oxidativo.

### 5.5.1 Determinación del contenido del pool de hierro reactivo (LIP).

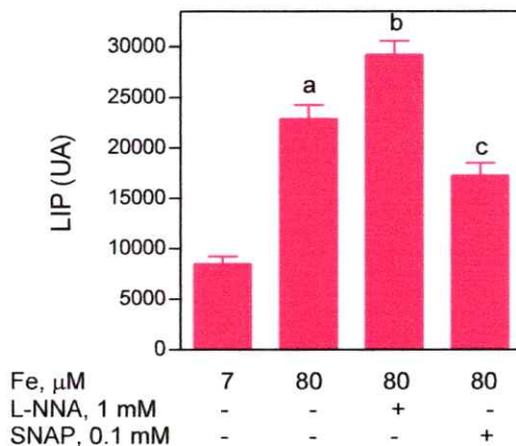
De acuerdo a lo observado en otros modelos celulares como Caco 2 (Núñez y col., 2001), N2A y neuronas de hipocampo (Núñez-Millacura y col., 2002), células SH-SY5Y sometidas a sobrecarga de Fe (80  $\mu\text{M}$ ) presentan un significativo incremento en los niveles de LIP comparados con células cultivadas en medio de cultivo estándar (a:

$p < 0.001$ ) (Figura 16). Estos resultados pueden deberse a que un aumento en la actividad de IRP1 resulta en un aumento de la incorporación de Fe y por ende un incremento en los niveles del LIP. A continuación investigamos el efecto del NO sobre el LIP. Cuando las células fueron incubadas en  $80 \mu\text{M}$  de Fe más L-NNA resulta en un aumento significativo en los niveles de LIP comparado con células tratadas solo con  $80 \mu\text{M}$  de Fe (b:  $p < 0.001$ ). Por el contrario, cuando se usó el dador de NO, SNAP se observó una marcada disminución en los niveles de LIP (c:  $p < 0.001$ ) (Figura 16). Los niveles del pool de hierro reactivo expresados en unidades de fluorescencia fueron  $8612 \pm 770$ ;  $23001 \pm 1405$ ;  $29345 \pm 1390$  y  $17436 \pm 1260$  para células control ( $7 \mu\text{M}$  Fe), células cultivadas en  $80 \mu\text{M}$  Fe,  $80 \mu\text{M}$  Fe + L-NNA y  $80 \mu\text{M}$  Fe + SNAP, respectivamente. Estos resultados sugieren que contrario a lo esperado, el NO regula negativamente los niveles de LIP y por ende la formación de ROS mediante la reacción de Fenton. Una posible explicación para estos resultados es que el NO estaría quelando el Fe intracelular libre mediante la formación de complejos NO-Fe (Wanat y col., 2002).



A)

B)

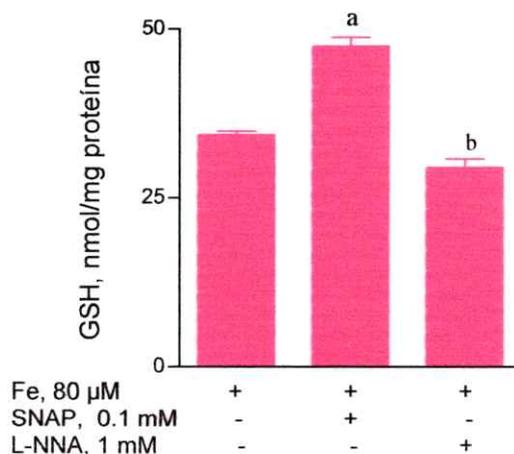


**Figura 16: Determinación del contenido de Fe reactivo. A)** Células SH-SY5Y fueron tratadas por 48 horas con 80  $\mu\text{M}$  Fe, 80  $\mu\text{M}$  Fe + 1 mM L-NNA y 80  $\mu\text{M}$  Fe + 0.1 mM SNAP, respectivamente. El LIP se determinó por medición del apagamiento de calceína. SIH es un quelante permeable que toma el Fe desde el complejo calceína-Fe aumentando así la fluorescencia de la calceína. El nivel del LIP es directamente proporcional al aumento de la fluorescencia de la calceína inducido por el SIH. La Figura muestra trazos representativos de los niveles de fluorescencia de calceína intracelular obtenidos en estas células. **B)** Cuantificación de los niveles de pool de hierro reactivo en células SH-SY5Y. a: 80  $\mu\text{M}$  en relación a 7  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , b: 80  $\mu\text{M}$  + L-NNA en relación a 7  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , 80  $\mu\text{M}$  + SNAP en relación a 7  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ .

### 5.5.2 Determinación de niveles intracelulares de GSH.

La propiedad protectora del NO fue también investigado en estas células en un ambiente de estrés oxidativo inducido por Fe. Para esto, determinamos el efecto del NO en los niveles de glutatión reducido (GSH), el cual es el principal antioxidante en neuronas, ya que las defensas reductoras neuronales están determinadas en gran parte, por los niveles de GSH (Cooper, 1997).

Cuando las células SH-SY5Y fueron cultivadas en 80  $\mu\text{M}$  de Fe en presencia de SNAP se observó un aumento significativo en los niveles de GSH con respecto a células cultivadas sólo en presencia de 80  $\mu\text{M}$  de Fe (a:  $p < 0.001$ ); mientras que en células expuestas a L-NNA se observa una disminución significativa con respecto a células tratadas con 80  $\mu\text{M}$  de Fe y SNAP (b:  $p < 0.001$ ) (Figura 17). De estos resultados podemos concluir que el NO a través de la unión a Fe lábil disminuye la carga oxidativa en células SH-SY5Y.

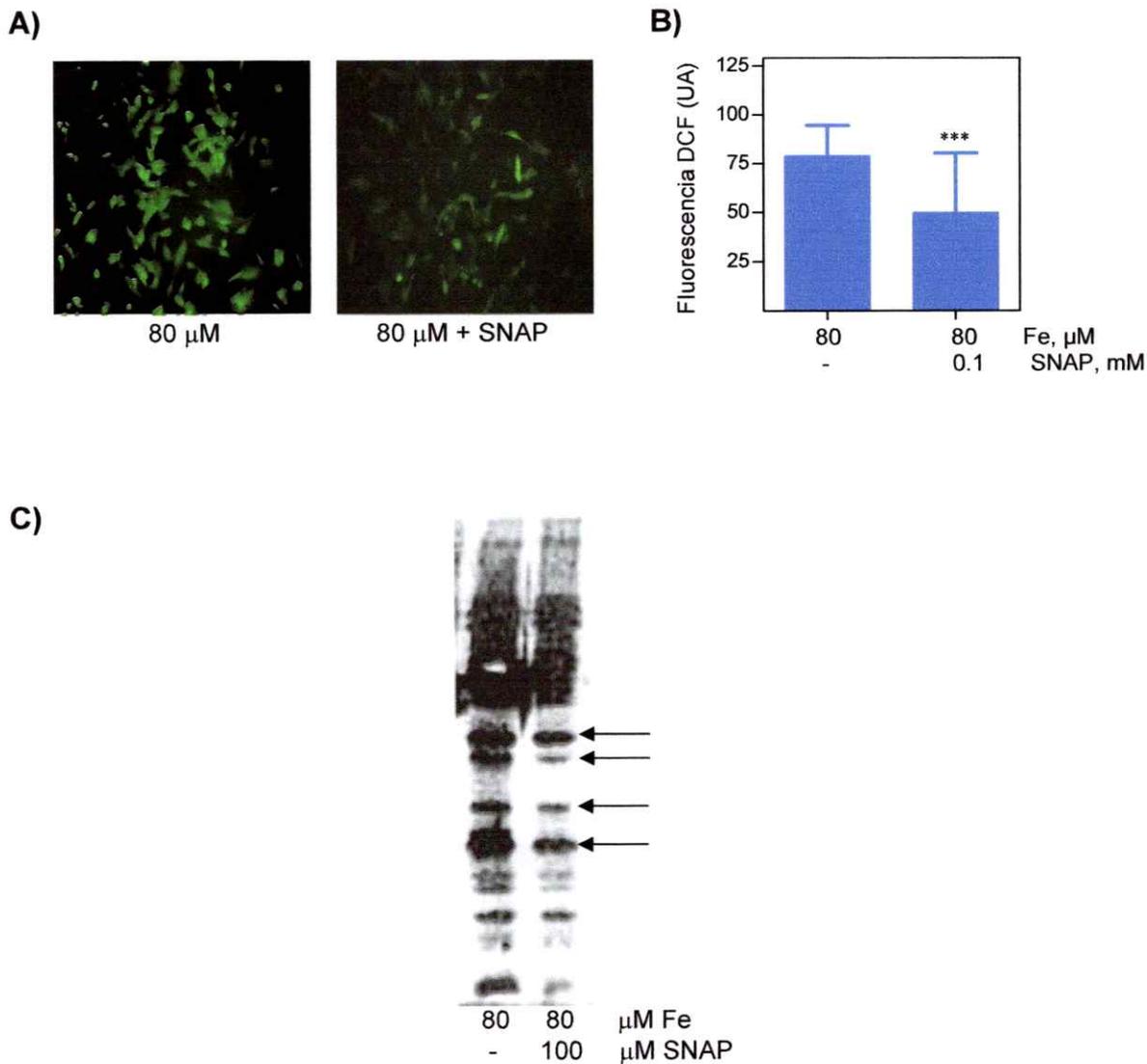


**Figura 17: Niveles de GSH en células SH-SY5Y.** Células SH-SY5Y fueron crecidas por 8 días en medios de cultivo regular y luego tratadas por 48 horas con 80  $\mu\text{M}$  de Fe y con 80  $\mu\text{M}$  de Fe en presencia del dador de NO, SNAP, y en presencia del inhibidor de las NOS, L-NNA. Extractos celulares fueron preparados y los niveles de GSH fueron determinados como se describe en (Núñez y col., 2004). a: 80  $\mu\text{M}$  + SNAP en relación a 80  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , b: 80  $\mu\text{M}$  + L-NNA en relación a 80  $\mu\text{M}$  + SNAP,  $p < 0.001$ .

### **5.5.3 Producción de ROS y formación de aductos de HNE.**

A continuación quisimos determinar el papel del NO sobre el estrés oxidativo inducido por Fe en células SH-SY5Y. Para esto, la producción de ROS fue determinada mediante fluorescencia de DCF y la formación de aductos de HNE en proteínas modificadas fue determinada por un ensayo de inmunoreactividad contra el anticuerpo monoclonal HNEJ-2. Como muestra la figura 18A, cuando estas células son tratadas con 80  $\mu\text{M}$  de Fe más el dador de NO, SNAP, se observa una disminución en los niveles de fluorescencia de DCF con respecto a células tratadas sólo con Fe.

Por otra parte cuando determinamos los niveles de HNE en células expuestas a sobrecarga de Fe (80  $\mu\text{M}$ ) en presencia de SNAP, observamos una disminución en la formación de los aductos de HNE en proteínas (Figura 18C).

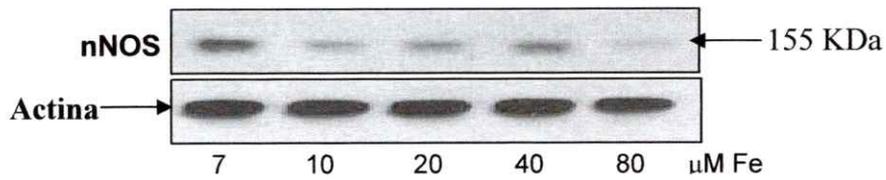


**Figura 18: Papel del NO sobre el daño oxidativo inducido por Fe. A) Células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en medio de cultivo regular y luego incubadas por 48 horas en medio suplementado con 80  $\mu\text{M}$  de Fe en ausencia y presencia de SNAP. Las células fueron cargadas con DCFH-DA y la fluorescencia de DCF fue determinada. Imágenes representativas de cultivos celulares son mostradas en A. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF en cultivos celulares sometidos a 80  $\mu\text{M}$  Fe en presencia de SNAP. \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia a 80  $\mu\text{M}$  Fe C) SNAP fue adherido al medio de cultivo con el fin de determinar el papel del NO sobre la formación de aductos de HNE. Treinta  $\mu\text{g}$  de extractos de células SH-SY5Y previamente cultivadas por dos días en medio MEM/F12 suplementado con 80  $\mu\text{M}$  de Fe y SNAP, fueron sometidos a inmunodetección por Western blot usando el anticuerpo monoclonal HNEJ-2, el cual detecta aductos de HNE en proteínas. Las flechas muestran algunas de las proteínas que fueron modificadas por la presencia de SNAP.**

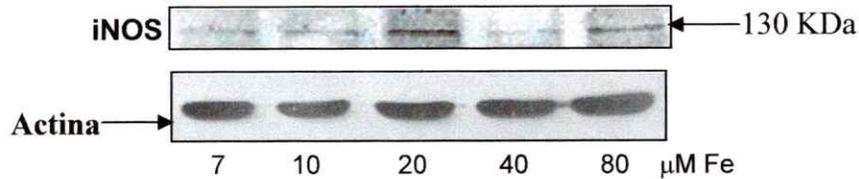
## **5.6 Niveles de proteína y de actividad de las NOS inducida por Fe en células SH-SY5Y.**

Para observar el efecto de Fe en la modulación de los niveles de NO, estudiamos la modulación de los niveles de proteína de las NOS. En extractos de células SH-SY5Y tratadas con crecientes concentraciones de Fe por 48 horas se determinó mediante Western blot los niveles de expresión de nNOS (Figura 19A) e iNOS (Figura 19B). Como se observa en la Figura, ambas proteínas presentan una conducta bifásica en función de las concentraciones de Fe. Los niveles de expresión de nNOS aumentan cuando las células son tratadas con 7 y 40  $\mu\text{M}$  de Fe; en cambio, estos niveles disminuyen cuando las células están expuestas a 80  $\mu\text{M}$  de Fe. Por otra parte, los niveles de expresión de la iNOS son opuestos a los observados para la NOS neuronal. Un aumento en los niveles de iNOS es observado cuando las células fueron tratadas con 20 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe, respectivamente. Estos resultados pueden sugerir que las células controlan en cierta forma la producción de NO debido al potencial citotóxico de esta molécula a través de la modulación compensatoria de los niveles de expresión de las NOS.

A)



B)



C)

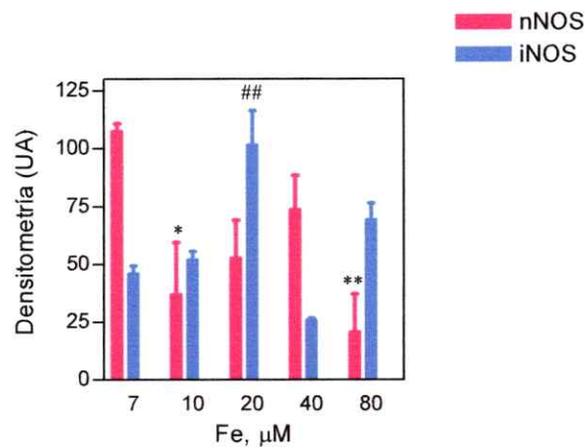
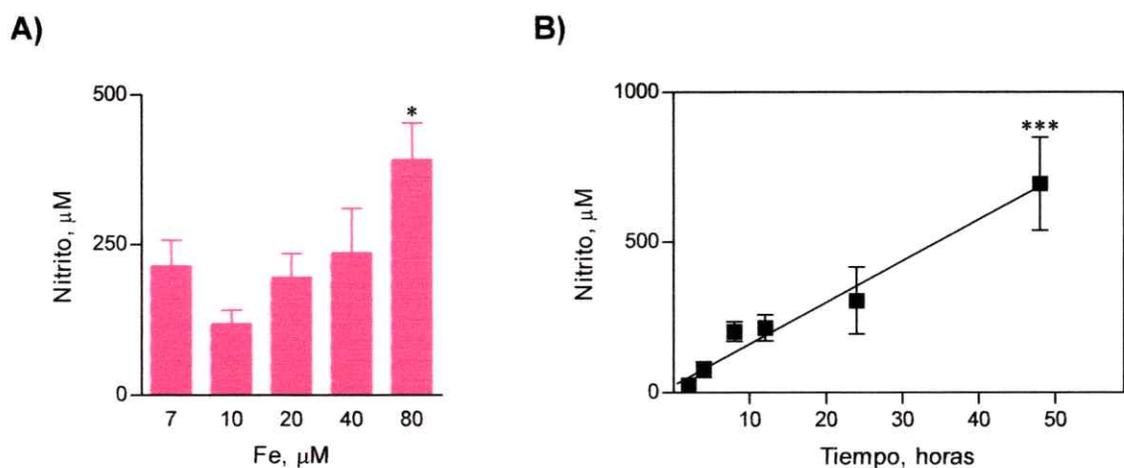


Figura 19: Inmunodetección de nNOS e iNOS en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de Fe. Las células SH-SY5Y fueron crecidas durante 8 días en condiciones normales y luego tratadas con 7, 10, 20, 40 y 80 μM de Fe por 48 horas. Los niveles de expresión de nNOS (A) y de iNOS (B) en 30 μg de extractos proteicos de estas células fueron analizados por Western blot. C) Análisis densitométrico de los niveles de proteína de nNOS e iNOS. \*:  $p < 0.05$  en referencia a 7 μM Fe, \*\*:  $p < 0.01$  en referencia a 7 μM Fe. ##:  $p < 0.01$  en referencia a 7 μM Fe

### 5.7 Producción de NO inducido por Fe en células SH-SY5Y.

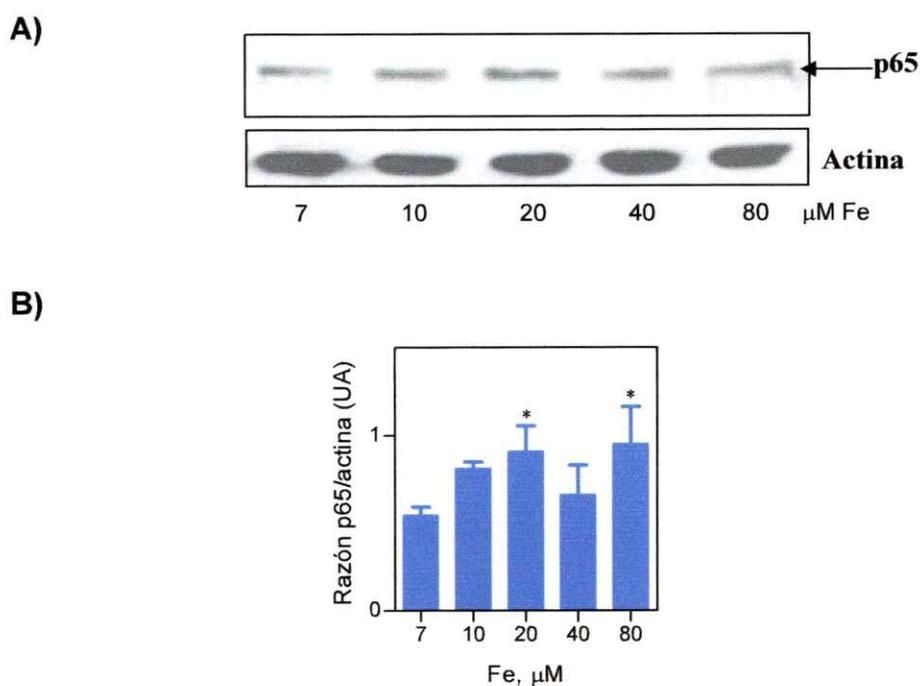
Una vez determinada la modulación de la expresión de las NOS por Fe, quisimos observar si esta inducción se reflejaba en un aumento en los niveles de NO; el cual puede ser medido a través de la producción de  $\text{NO}_2^-$ . Los niveles de  $\text{NO}_2^-$  fueron determinados del medio de cultivo luego de que las células SH-SY5Y fueron tratadas con crecientes concentraciones de Fe durante 48 horas (Figura 20A). De acuerdo a lo esperado, los niveles de  $\text{NO}_2^-$  aumentaron en el medio de cultivo en función de la concentración de Fe (10 a 80  $\mu\text{M}$ ). Además, quisimos observar la producción NO en función del tiempo de tratamiento con Fe (Figura 20B). De estos resultados podemos observar que los niveles de  $\text{NO}_2^-$  aumentaron en función del tiempo de exposición con Fe.



**Figura 20: Niveles de NO en células SH-SY5Y. A) Células SH-SY5Y fueron crecidas por 8 días en medio de cultivo normal y luego incubadas por 24 horas en medio de cultivo suplementado con 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe. La producción de NO fue estimada mediante la determinación de  $\text{NO}_2^-$  en el medio de cultivo. \*:  $p < 0.05$  en referencia a 7  $\mu\text{M}$  Fe. B) Producción de  $\text{NO}_2^-$  en función del tiempo de tratamiento con Fe. Células SH-SY5Y fueron tratadas con 80  $\mu\text{M}$  de Fe por diferentes tiempos (2-48 horas). \*\*\*:  $p < 0.001$  en referencia al control (sin tratamiento con Fe).**

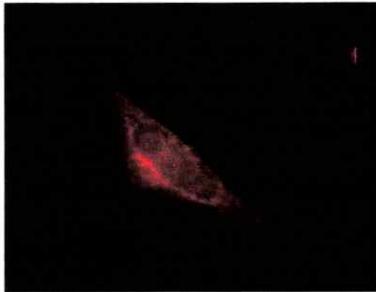
## 5.8 Activación de NF $\kappa$ B inducida por Fe en células SH-SY5Y.

A continuación estudiamos el efecto del Fe sobre NF $\kappa$ B. Para esto evaluamos la translocación al núcleo de la subunidad p65 mediante ensayos de Western blot y por microscopía de inmunofluorescencia. Células SH-SY5Y fueron tratadas con concentraciones crecientes de Fe por 2 días. Los resultados obtenidos de los experimentos de Western blot muestran que el Fe (20 y 80  $\mu$ M) indujo ligeramente la presencia de la subunidad p65 en extractos de proteína nuclear (Figura 21). Por su parte, los ensayos de inmunocitoquímica muestran que el Fe indujo la translocación de la subunidad p65 al núcleo (Figura 22).

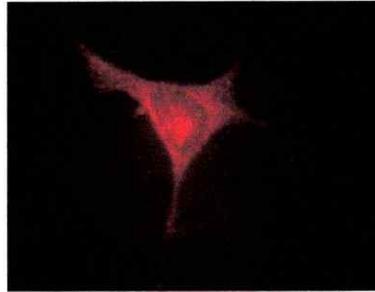


**Figura 21: Activación de NF $\kappa$ B inducida por Fe. A)** Inmunodetección de la subunidad p65 en extractos nucleares de células SH-SY5Y previamente tratadas con 7, 10, 20, 40 y 80  $\mu$ M de Fe por 2 días. **B)** Cuantificación de los niveles de expresión de p65 en extractos nucleares de células SH-SY5Y. \*:  $p < 0.05$  en referencia a 7  $\mu$ M Fe.

Inmunodetección de NF $\kappa$ B (p65)

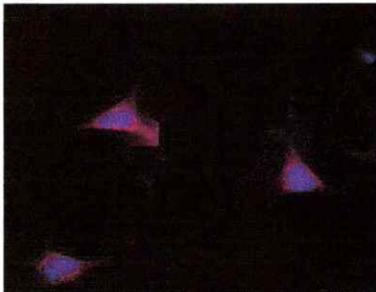


Control

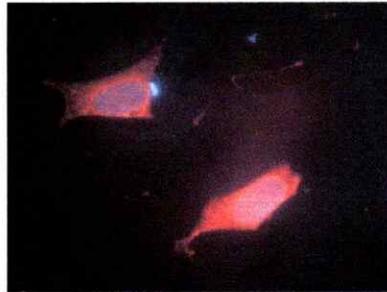


80  $\mu$ M Fe

Inmunodetección de NF $\kappa$ B (p65)-Höechst



Control



80  $\mu$ M Fe

**Figura 22: Activación de NF $\kappa$ B inducida por Fe. Inmunocitoquímica de la subunidad p65. Células SH-SY5Y fueron crecidas en cubreobjetos por 8 días en medio MEM/F12, 10% FBS y luego tratadas por 48 horas con 80  $\mu$ M Fe. Se muestran imágenes representativas de cultivos celulares.**

## VI. DISCUSIÓN

Los niveles celulares de hierro son altamente controlados, ya que por una parte es fundamental que las células obtengan suficiente Fe para sus necesidades metabólicas; y al mismo tiempo, se controla su exceso debido a la formación de ROS mediante la reacción de Fenton.

Las proteínas IRP1 e IRP2 son componentes esenciales del mecanismo por el cual los vertebrados regulan el metabolismo celular del Fe. La actividad de IRP2 es fundamental para el balance celular de Fe en condiciones fisiológicas, mientras que la actividad de IRP1 está relacionada con procesos de estrés oxidativo y la homeostasis de este metal. En este trabajo encontramos que las células SH-SY5Y tienen actividad IRP1; pero contrario a lo esperado, esta activación es inducida por estrés oxidativo, resultando en un aumento en la incorporación celular de Fe. Observamos que si bien la actividad de IRP1 decrece cuando las concentraciones de Fe van desde 1.5 a 20  $\mu\text{M}$ , un fuerte incremento en la actividad de IRP1 resulta cuando las concentraciones de Fe aumentan sobre 40  $\mu\text{M}$  (Figura 9). Estos resultados pueden interpretarse en términos de que a altas concentraciones de Fe, IRP1 se vuelve resistente a una inactivación mediada por Fe y sugiere un papel del estrés oxidativo sobre la actividad de IRP1 y la homeostasis de Fe. La reactivación de IRP1 fue acompañada por un aumento en la incorporación de Fe (Figura 5), lo cual indica que esta activación fue funcional. Este circuito de retroalimentación positiva de un aumento en la incorporación de Fe mediada por Fe resulta en un aumento del Fe intracelular, aumentando así el estrés oxidativo mediado por la reacción de Fenton. Además no todo el Fe intracelular fue guardado en ferritina, ya que un aumento en la concentración de Fe extracelular incrementa a su vez el pool de hierro reactivo, LIP (Figura 16).

Por otra parte, una sobrecarga de Fe en el medio de cultivo fue acompañada por una disminución en los niveles de proteína de IRP1 (Figura 10). El aumento de la actividad de IRP1 observado a pesar de la disminución en los niveles de expresión de esta proteína puede deberse a que en condiciones normales sólo una pequeña fracción del total de IRP1 esta activa como proteína de unión a RNA; lo que se asemeja a lo observado en otros tipos celulares (Campanella y col., 2004). En cambio, cuando las células son expuestas a estrés oxidativo inducido por Fe la fracción de IRP1 total con actividad de unión a RNA aumenta significativamente. Por lo tanto, estrés oxidativo inducido por Fe desplaza el equilibrio aconitasa/unión a RNA hacia actividad de unión a RNA. Finalmente, la disminución en los niveles de proteína de IRP1 observado en células con sobrecarga de Fe puede resultar de una respuesta autoregulatoria en un intento por disminuir la actividad de IRP1 y mantener así un adecuado control de la homeostasis de Fe.

En este trabajo a su vez determinamos que el Fe induce daño oxidativo a las células SH-SY5Y evaluado mediante la producción de ROS (Figura 7A) y a través de la formación de aductos de HNE en proteínas (Figura 8). Además, una sobrecarga de Fe en el medio de cultivo produce un aumento en la muerte celular, ya que cuando estas células son expuestas a 80  $\mu$ M de Fe aproximadamente la mitad de estas muere (Figura 4). Por otra parte, el uso del antioxidante DMTU demostró que los efectos del Fe son producto de su participación en la generación de ROS y por ende de daño oxidativo. Una posible explicación a estos resultados es que estos eventos sean un mecanismo de suicidio celular por aquellas células que no logran mantener un adecuado estado redox entrando a un ambiente pro-oxidante y finalmente terminado en muerte celular. Cabe recalcar que estos resultados fueron similares a los

encontrados en células de neuroblastoma de ratón N2A y en neuronas de hipocampo (Núñez-Millacura y col., 2002).

### **Papel del NO en el metabolismo celular del hierro.**

En este estudio quisimos evaluar el papel del óxido nítrico en la activación de IRP1 inducida por Fe. NO es una molécula señalizadora que en presencia de O<sub>2</sub> produce oxidación y/o nitración de especies reactivas que forman aductos S-nitrosotiolados o disulfidos en proteínas. Además, potentes oxidantes derivados de NO tales como peroxinitrito también pueden producir alteraciones oxidativas.

Estudios previos han determinado que el NO y/o productos relacionados pueden activar a IRP1 (Bouton, 1999). La ganancia de la actividad de unión a RNA, sin embargo, va acompañada por una disminución en los niveles de expresión de IRP1 en función del NO (Oliveira y Drapier, 2000); demostrando que el NO afecta independientemente, pero en el mismo curso de tiempo, la actividad y expresión de IRP1. Finalmente estos trabajos demuestran que los cambios de IRP1 tanto a nivel transcripcional como traduccional son dependientes del tiempo y están correlacionados con la cantidad de NO producido. Por consiguiente, la pérdida de expresión de IRP1 puede resultar de un circuito regulatorio, que puede envolver a la misma IRP1 luego de la exposición a NO o a una molécula derivada de éste (Weiss y col., 1994; Oliveira y Drapier, 2000).

En este trabajo encontramos que el NO es uno de los mediadores de daño oxidativo inducido por hierro en células SH-SY5Y ya que participa en la activación de IRP1 inducida por Fe. Sin embargo, también observamos que el NO ejerce efectos protectores que aminoran directamente el estrés oxidativo inducido por Fe. El papel del NO sobre la actividad de IRP1 fue determinada por ensayos de band shift. L-NNA, que

es un inhibidor competitivo de las NOS disminuye significativamente la activación de IRP1 inducida por Fe (Figura 12). En cambio, cuando las células fueron tratadas con SNAP, un dador de NO observamos un aumento de la actividad de esta proteína (Figura 13). Estos resultados en conjunto con estudios previos indican que el NO induce la actividad de IRP1 y sugieren fuertemente que el NO media la activación de IRP1 inducida por Fe.

Por otra parte, producto de que el Fe produce el anión superóxido a través de la reacción Haber-Weiss, es posible que un exceso de Fe resulte en un aumento en la producción de peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), mediante de la reacción entre  $\text{O}_2^-$  y NO. El  $\text{OONO}^-$  resultante puede reaccionar con grupos cisteína y/o tirosina de IRP1, desplazando así la actividad aconitasa de IRP1 hacia la actividad de unión a IREs. El mecanismo por el cual  $\text{OONO}^-$  inhibe la actividad aconitasa de IRP1 podría estar dado por la remoción de uno de los Fe del núcleo 4Fe-4S, presumiblemente el Fe lábil, el cual está en el sitio activo de la unión de citrato/isocitrato, alterando así la actividad enzimática de esta proteína (Soum y col., 2003). Otra vía por la cual  $\text{OONO}^-$  puede activar a IRP1 es mediante el aumento de Ca intracelular (Radi y col., 2002). Este incremento en los niveles de Ca induciría una activación de las NOS constitutivas (nNOS y eNOS) lo que conlleva a un aumento en los niveles de NO y por ende una activación de IRP1 como proteína de unión a RNA. Finalmente, está descrito que  $\text{OONO}^-$  puede aumentar los niveles celulares de NO vía activación de la iNOS en células del epitelio intestinal (Banan y col., 2001). Estos antecedentes indican que un aumento en los niveles de  $\text{OONO}^-$  puede activar a IRP1 como apoproteína a través de la modulación de la actividad de las NOS.

En este trabajo encontramos que el Fe induce la nitración de tirosinas en IRP1 en función de la concentración de éste en el medio de cultivo (Figura 11), lo cual es un

fuerte indicio de que el Fe induce la producción de  $\text{OONO}^-$  en las células SH-SY5Y. Sin embargo, los efectos de la nitración de tirosinas en IRP1 no están claros, ya que tanto inhibición (González y col., 2004) como activación (Castro y col., 1998) de IRP1 en función de  $\text{OONO}^-$  han sido reportado en otros tipos celulares. Por lo tanto, la respuesta de IRP1 a peroxinitrito observada en este trabajo puede depender de los sistemas antioxidantes presentes en estas células; en particular, los niveles intracelulares de GSH, determinando así el efecto neto del NO, ya sea el de activación o de inhibición sobre IRP1 (Castro y col., 1998). Debido a que las células SH-SY5Y tienen comparativamente bajos niveles de GSH (Núñez y col., 2004), es posible que la nitración de tirosinas de IRP1 observada pueda tener un efecto estimulador sobre la actividad de esta proteína en estas células.

En este estudio a su vez observamos un efecto protector del NO contra el estrés oxidativo inducido por Fe. Encontramos que el NO produce una disminución en los niveles LIP (Figura 16). El LIP es definido como un pool de Fe de bajo peso molecular ( $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ ) débilmente unido, ya que está asociado con una variedad de ligandos con baja afinidad (Kruszewsky, 2003). Ya que una alta afinidad de unión del NO por Fe ha sido establecida (Wanat y col., 2002), es posible que la disminución del LIP por el NO se deba a la unión de éste al metal. La disminución en los niveles de LIP puede traducirse en una disminución del estrés oxidativo inducido por Fe en estas células. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por (Chénais y col., 2002) donde se produce una disminución del LIP bajo inducción con NO en células microgliales de ratón BV-2, pero discrepan con los observados en células endoteliales de bovino (Ramachandran y col., 2004), donde un incremento del LIP es observado bajo una estimulación crónica con NO. Sobre la base de estos resultados, es posible postular que la respuesta del LIP a NO puede depender del tipo celular, lo cual puede

reflejarse en características celulares específicas de la homeostasis del Fe. Por otra parte, el significado en la disminución de LIP puede traducirse en la reducción de la producción de los niveles de ROS inducida por Fe, como un mecanismo de defensa por parte de las células que producen NO/ROS (Chénais y col., 2002).

Estudios previos han demostrado que la alta afinidad del NO por Fe puede resultar en la remoción del Fe de centros Fe-S o por la formación de complejos Fe-NO dentro de las proteínas que contienen estos centros. Con respecto a esto último, está demostrado que el NO forma complejos con una serie de proteínas que contienen Fe, como por ejemplo ferritina (Wardrop y col., 2000). NO intercepta al Fe antes de ser incorporado en ferritina y aparece como un agente indirecto en la movilización de Fe de esta proteína. La remoción de Fe de ferritina por NO puede producirse por dos posibles mecanismos: quelación directa del Fe unido a ferritina o por quelación del pool de Fe lábil, permitiendo así la liberación de este metal por ferritina (Wardrop y col., 2000). Sin embargo, estudios actuales han demostrado que para movilizar el Fe desde la proteína ferritina es requerido un activo metabolismo celular más que la quelación directa del Fe unido a ferritina.

El efecto de NO en disminuir los niveles de LIP es contrapuesto con la habilidad de NO en aumentar la actividad de unión a RNA de IRP1. Sin embargo, estos resultados sugieren que los efectos del NO son complejos y que está envuelto en una variedad de procesos en la homeostasis del Fe. Es así que hay evidencia de que el óxido nítrico contribuye al estrés oxidativo neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Heneka y col., 2001; Luth y col., 2001); y por el contrario, actúa como protector del estrés oxidativo inducido por Fe en astrocitos (Robb y col., 1999). Finalmente, un mecanismo adicional por el cual NO protege a las células de estrés oxidativo es a través de la neutralización del anión superóxido. Sin embargo, lo anterior

induce la formación de  $\text{OONO}^-$ , el cual a pH fisiológico rápidamente se protona a ácido peroxinitroso ( $\text{OONOH}$ ), quien se descompone y produce  $\text{OH}^-$ . Por lo tanto, esta tardía reacción podría entonces aumentar el estrés oxidativo más que disminuirlo (Robb y col., 1999).

Como se menciona anteriormente, el efecto del NO debe situarse en el ambiente reductor que presentan distintos tipos celulares. Por su parte, uno de los principales sistemas antioxidantes que presentan las células neuronales es el glutatión reducido (Cooper, 1997). Estudios previos han mostrado que los niveles de GSH en células SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo inducido por Fe disminuyen significativamente (Núñez y col., 2004). Para evaluar el rol del NO sobre el estrés oxidativo inducido por Fe, en este estudio determinamos los niveles de GSH en células tratadas con sobrecarga de Fe ( $80 \mu\text{M}$ ) en presencia del inhibidor de las NOS L-NNA y en presencia del dador de NO, SNAP (Figura 17), respectivamente. Un aumento en los niveles de GSH fue encontrado en células tratadas con SNAP, mientras que el contenido de GSH disminuyó cuando las células fueron tratadas con el inhibidor L-NNA. Al ser GSH el antioxidante más importante en las neuronas, nuestros resultados sugieren que el NO participa en la respuesta antioxidante mediada por GSH contra el estrés oxidativo inducido por Fe. El mecanismo por el cual el NO incrementa los niveles de GSH es desconocido, sin embargo nuestros datos muestran que el NO disminuye el LIP, y que existe una correlación inversa entre los niveles de LIP y GSH a altas concentraciones de Fe (Núñez y col., 2004). Por lo tanto, es posible pensar que el aumento en los niveles de GSH inducido por NO fue secundario a la disminución en los niveles del LIP. Otra evidencia del papel protector del NO esta dada por el trabajo de Rauhala y col. En este estudio los autores demuestran que la forma S-nitrosilada de GSH, GSNO, un putativo dador de NO, puede proteger a las neuronas de estrés

oxidativo (Rauhala y col., 1998). Este trabajo sugiere que las propiedades antioxidantes de GSNO contra el daño oxidativo inducido por Fe fue mediado por NO. Finalmente, este mecanismo de protección puede explicar que algunas células sean más resistentes al daño oxidativo cuando tiene altos niveles de GSH y a su vez nos ayuda a entender la biología del NO y algunas de sus propiedades antioxidantes.

### **Papel del Fe en la producción de NO**

El NO es sintetizado del aminoácido L-arginina por las óxido nítrico sintasas (NOS). Para determinar el rol del Fe sobre los niveles celulares de NO, determinamos los niveles de expresión de las proteínas nNOS e iNOS. En ambos casos encontramos que los niveles proteicos de nNOS e iNOS presentan una conducta bifásica en función de la concentración de Fe (Figura 19). Las diferencias en los niveles de proteína observadas entre nNOS e iNOS pueden deberse a una posible modulación que el NO ejerce sobre su propia síntesis. Estudios en cultivos de astrocitos han puesto en evidencia el papel que tiene el NO sobre su síntesis (Togashi y col., 1997). En este trabajo los autores mostraron que a concentraciones fisiológicas de NO como las que se alcanzan con la actuación de nNOS, suprimen la expresión del gen que codifica a la iNOS por mecanismos ligados a la inactivación del NF $\kappa$ B (Togashi y col., 1997). Estos mecanismos incluyen la inducción, estabilización e interferencia en el proceso de fosforilación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  (Peng et al., 1995), así como la interferencia del NO sobre la unión de NF $\kappa$ B a la región promotora del gen que codifica a la iNOS (Qu y col., 2001). A su vez, otros estudios han determinado que los mecanismos que promueven la inducción de la iNOS inhiben rápidamente la actividad de las NOS constitutivas a través de la fosforilación de residuos de tirosina presentes

en estas enzimas, disminuyendo las concentraciones intracelulares de NO (Qu et al., 2001). Sobre la base de nuestros resultados es posible postular entonces que la diferencia observada en los niveles de expresión de nNOS e iNOS en función de la oferta de Fe se debe a una regulación de las células para controlar los niveles celulares de NO.

En el presente estudio a su vez determinamos el efecto de la sobrecarga de Fe en el medio de cultivo sobre la generación de NO en células SH-SY5Y. Cuando estas células fueron incubadas con Fe observamos un incremento en la producción de NO en función de la concentración del metal y del tiempo de exposición a éste (Figura 20A-B).

Estudios previos a este trabajo han puesto en evidencia que el estrés oxidativo mediado por ROS y/o RNS induce la activación de la iNOS (Shimizu y col., 1998; Banan y col., 2001). Por lo tanto, el aumento en los niveles de NO en función de la oferta de Fe observado en este estudio podría deberse a una inducción en la actividad de las NOS, principalmente de la iNOS, a través de la producción de ROS. Finalmente, es posible que la modulación en los niveles de expresión de las NOS en función de la oferta de Fe pueda ser una respuesta regulatoria para disminuir la actividad de estas enzimas y mantener así niveles adecuados de NO. Cabe recalcar que es fundamental para las células controlar los niveles de NO, debido a las múltiples interacciones que éste presenta, y que de alguna manera condicionan a que el NO tenga un papel antioxidante y/o protectora a bajas concentraciones fisiológicas, o pro-oxidantes y deletéreas a altas concentraciones.

## **NF $\kappa$ B y niveles celulares de Fe**

Con respecto al papel del factor de transcripción NF $\kappa$ B en la vía de transducción en la activación de IRP1 inducida por Fe, los resultados presentes en este trabajo demuestran que NF $\kappa$ B participa en la activación de IRP1, ya que cuando estas células fueron tratadas con el inhibidor NaSal, se produce una disminución en la actividad de IRP1 en función de la concentración y del tiempo de tratamiento con el inhibidor (Figura 15).

Por otra parte, estudiamos el efecto del Fe sobre la vía de transducción de señales en la activación de NF $\kappa$ B en células SH-SY5Y, ya que estudios han puesto en evidencia que este factor de transcripción es inducido por estrés oxidativo (Marshall y col., 2000). En este trabajo evaluamos la respuesta de NF $\kappa$ B a Fe a través de dos técnicas. Mediante ensayos de Western blot observamos que cuando las células SH-SY5Y fueron incubadas con concentraciones crecientes de Fe se produce un leve aumento de la subunidad p65 en extractos de proteína nuclear (Figura 21). A su vez, a través de ensayos de inmunocitoquímica observamos la translocación de la subunidad p65 al núcleo cuando las células son incubadas con 80  $\mu$ M de Fe (Figura 22), lo que indicó la activación de este factor en función de este metal. Por lo tanto, al ser NF $\kappa$ B activado por estrés oxidativo, nuestros resultados sugieren que la activación de este factor inducida por Fe observada en este estudio se deba a una inducción en forma indirecta mediante la formación de ROS y por ende en la inducción de genes en respuesta a NF $\kappa$ B (Li y Karin, 1999).

Sin embargo, cabe recalcar que la actividad de NF $\kappa$ B es sensible tanto a estrés oxidativo como a estrés nitrosativo (Schoonbroodt y Piette, 2000; Marshall y Stamler, 2001). Por una parte, un ambiente citoplasmático oxidativo es asociado con la

activación de NF $\kappa$ B. En cambio, oxidación y nitración del heterodímero (p65-p50) previene la unión a DNA. Dentro de los posibles mecanismos que participan en este proceso podemos mencionar la inhibición de la degradación proteolítica de I $\kappa$ B $\alpha$  mediante un incremento en la transcripción o por estabilización del mRNA de esta proteína y la nitrosilación del residuo de cisteína 62 de la subunidad p50 previniendo así la activación de NF $\kappa$ B en su unión a DNA (Marshall y col., 2000). Finalmente, es posible concluir que las modificaciones oxidativas que modulan la actividad de NF $\kappa$ B ejercen un control dual sobre éste. La activación o inhibición de este factor por estrés oxidativo posiblemente se relacione con las vías de señalización involucradas en cada evento en particular y depender de la duración del evento, las circunstancias y del tipo celular.

En resumen, en esta tesis encontramos que células SH-SY5Y presentan un feedback de captación de hierro inducido por hierro lo cual resulta en más hierro intracelular, aumentando así el estrés oxidativo. Sin embargo, al igual que neuronas de hipocampo y células N2A (Núñez-Millacura y col., 2002), estas células responden al estrés oxidativo inducido por Fe generando mecanismos de protección para contrarrestar el daño oxidativo celular. Por lo tanto, los mecanismos antioxidantes son una importante respuesta adaptativa contra el daño oxidativo inducido por Fe. Sin embargo, desafortunadamente las células no pueden perpetuamente acumular Fe y por último el mecanismo homeostático controlado por el sistema IRP falla.

En este estudio encontramos que la actividad de IRP1 es inducida por un exceso de Fe en el medio de cultivo y que esta actividad es bloqueada por el inhibidor competitivo de las NOS, L-NNA y por el inhibidor de NF $\kappa$ B, NaSal. Estos resultados por lo tanto evidencian que tanto el NO y NF $\kappa$ B median la activación de IRP1. A su vez, un

rol protector del NO fue también observado, ya que el NO disminuye el pool de hierro reactivo y aumenta los niveles celulares de GSH. Por lo tanto, en respuesta a una acumulación de Fe, NO puede mediar tanto una respuesta pro-oxidante (activación de IRP1) y una respuesta antioxidante en células de neuroblastoma SH-SY5Y (Figura 23). El resultado final, ya sea sobrevida o muerte celular va a depender de la capacidad reductora del medio intracelular, de procesos adaptativos en lo referente a la homeostasis celular de Fe, como por ejemplo una disminución del transportador DMT1 y de los procesos adaptativos que contrarrestan la carga oxidativa como los son el aumento del GSH y la disminución del LIP.

## Acciones pro- y anti-oxidantes del NO

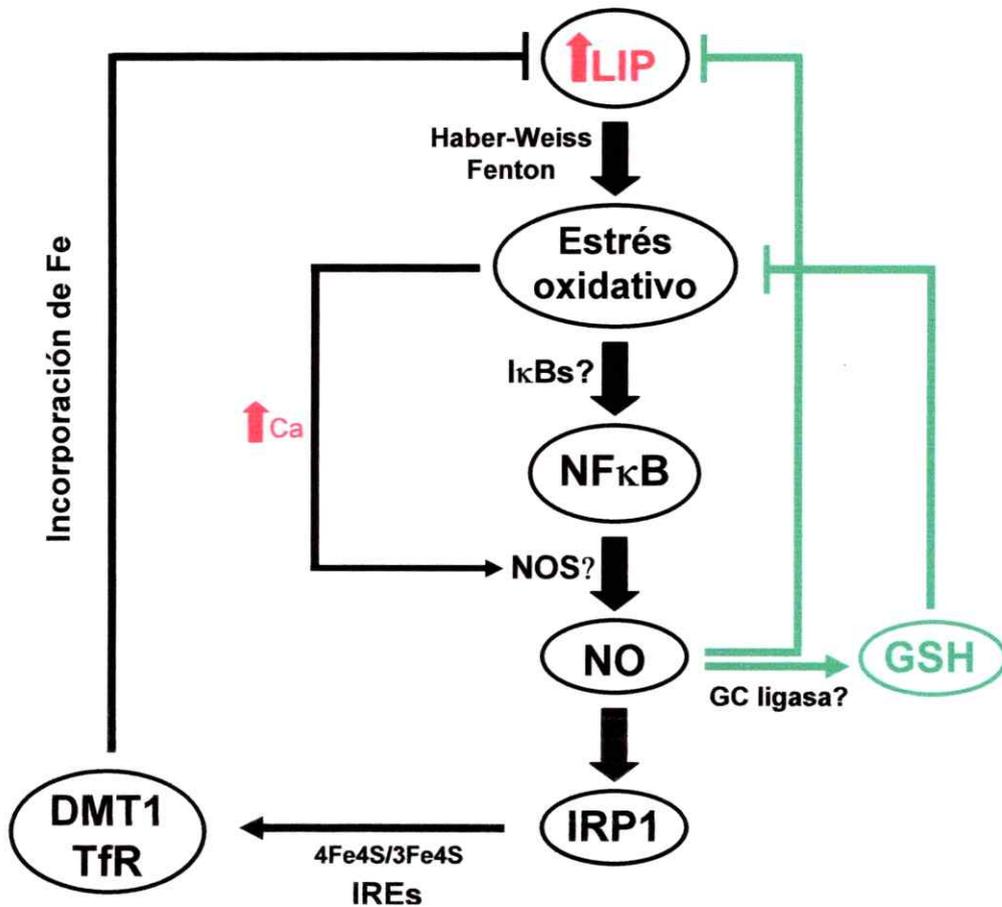


Figura 23: Modelo propuesto para la activación de IRP1 por estrés oxidativo inducido por Fe. Respuesta pro-oxidante y antioxidante del NO en células SH-SY5Y sometidas a una sobrecarga de Fe. Un aumento en el LIP produce un ciclo positivo consistente en un aumento del estrés oxidativo, la activación de NFκB, un incremento en NO, la activación de IRP1 y un aumento en la incorporación de Fe. Antioxidantes, inhibidores de la producción de NO o de la activación de NFκB rompen este ciclo. El NO promueve acciones de regulación negativa al inducir de la síntesis de GSH y al disminuir el LIP. Normalmente, las células están en un balance en el que los elementos pro-oxidantes (por ejemplo Fe) se contrapesan con elementos anti-oxidantes (por ejemplo GSH).

## VII. CONCLUSIONES

1. El hierro induce un incremento en la producción de daño oxidativo y muerte celular mediante la generación de ROS en células SH-SY5Y.
2. Una sobrecarga de Fe produce un incremento en la actividad de IRP1 y una disminución en los niveles de expresión de la proteína. Por lo tanto, el Fe afecta independientemente pero en el mismo curso de tiempo la actividad y expresión de esta proteína.
3. El óxido nítrico participa en la activación de IRP1 inducida por Fe en células SH-SY5Y.
4. El incremento en los niveles de óxido nítrico y la modulación en los niveles de nNOS e iNOS en función de la oferta de hierro, sugiere una relación entre la actividad de las óxido nítrico sintasas, producción de NO y la activación de IRP1.
5. El factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B participa en la señalización de la activación del sistema IRE/IRP.
6. El Fe induce la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF $\kappa$ B, lo que sugiere que en estas condiciones se induce una respuesta a estrés oxidativo.
7. Finalmente podemos concluir que si bien el NO es un factor pro-oxidante al estimular a IRP1, puede contrarrestar este efecto favoreciendo una respuesta antioxidante al disminuir los niveles de LIP y aumentar los niveles de GSH.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aguirre P., Mena N., Tapia V., Arredondo M. y Núñez M. (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neuroscience* 6 (1): 1-11.
- ❖ Atwood W., Tornatore C., Traub R., Conant K., Drew P. y Major E. (1994) Stimulation of HIV type 1 gene expression and induction of NF- $\kappa$ B (p50/p65)-binding activity in tumor necrosis factor  $\alpha$ -treated human fetal glial cells. *AIDS Research and Human Retroviruses* 10: 1207-1211.
- ❖ Baeuerle P. y Baltimore D. (1996) NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 87: 13-20.
- ❖ Baeuerle P. (1998) I $\kappa$ B- NF- $\kappa$ B structures: At the interface of inflammation control. *Cell* 95: 729-731.
- ❖ Banan A., Fields J., Zhang Y. y Keshavarzian A. (2001) iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G1234-G1246.
- ❖ Behl C., Davis J., Lesley R. y Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid- $\beta$  protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
- ❖ Berg D., Gerlach M., Youdim M., Double K., Zecca L., Riederer P. y Becker G. (2001) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 79: 225-236.
- ❖ Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology* 11 (2): 66-75.
- ❖ Boissiere F., Hunot S., Faucheux B., Duyckaerts C., Hauw J., Agid Y. y Hirsch E. (1997) Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8: 2849-2852.
- ❖ Bouton C., Hirling H. y Drapier J. (1997) Redox modulation of iron regulatory proteins by peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (32): 19969-19975.
- ❖ Bouton C., Oliveira L. y Drapier J. (1998) Converse modulation of IRP1 and IRP2 by immunological stimuli in murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 273 (16): 9403-9408.
- ❖ Bouton C. (1999) Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 1043-1053.
- ❖ Bredt D. y Snyder S. (1994) Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annual Reviews of Biochemistry* 63: 175-195.

- ❖ Campanella A., Levi S., Cairo G., Biasiotto G. y Arosio P. (2004) Blotting analysis of native IRP1: a novel approach to distinguish the different forms of IRP1 in cells and tissues. *Biochemistry* 43: 195-204.
- ❖ Carry M., Ferri A., Cazzolino M., Calabrese L. Y Rotilio G. (2003) Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Research Bulletin* 61 (4): 365-374.
- ❖ Castro L., Robalinho R., Cayota A., Meneghini R. y Radi R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359: 215-224.
- ❖ Chen L., Zhang B. y Harris D. (1998) Evidence suggesting that nitric oxide mediates iron-induced toxicity in cultured proximal tubule cells. *American Journal of Physiology* 274. *Renal Physiology* 43: F18-F25.
- ❖ Chénais B., Morjani H. y Drapier J. (2002) Impact of endogenous nitric oxide on microglial cell energy metabolism and labile iron pool. *Journal of Neurochemistry* 81: 615-623.
- ❖ Chiueh C., Hong J. y Leong S. (2002) Nitric Oxide: Novel actions, deleterious effects, and clinical potential. *Annals of the New York Academy of Sciences* 962: 1-437.
- ❖ Cooper A. (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In Rosenberg R., Prusiner S., DiMauro S., Barchi R. y Kunk L. eds. *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*, Boston, Butterworth-Heinemann 1195-1230.
- ❖ Dringen R., Gutterer J. y Hirrlinger J. (2000) Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry* 267: 4912-4916.
- ❖ Dröge W. (2002) Free radical in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- ❖ Duh E., Maury W., Folks T., Fauci A. y Rabson A. (1989) Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- $\kappa$ B sites in the long terminal repeat. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 86: 5974-5978.
- ❖ Eisenstein R. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual Review of Nutrition* 20: 627-662.
- ❖ Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Ceña V., Gallego C. y Comella J. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron like cells. *Journal of Neurochemistry* 75: 991-1003.

- ❖ Epsztejn S., Kahlon O., Glickstein H., Breuer W. y Cabantchik Z. (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Analytical Biochemistry* 248 (1): 31-40.
- ❖ Forrellat M., Gautier H. y Fernández N. (2000) Metabolismo del hierro. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia* 16 (3): 149-160.
- ❖ Gonzalez D., Drapier J. y Bouton C. (2004) Endogenous nitration of iron regulatory protein-1 (IRP-1) in nitric oxide-producing murine macrophages: further insight into the mechanism of nitration in vivo and its impact on IRP-1 functions. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43345-43351.
- ❖ Grant M., Cuadra A. y El-Fakahany E. (2002) Endogenous expression of nNOS protein in several neuronal cell lines. *Life Sciences* 71: 813-817.
- ❖ Grilli M. y Memo M. (1999) Nuclear Factor- $\kappa$ B/Rel Proteins. *Biochemical Pharmacology* 57: 1-7.
- ❖ Guo B., Phillips J., Yu Y. y Leibold E. (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 270: 21645-21651.
- ❖ Hall A., Antoniu H., Wang Y., Cheung A., Arbus A., Olson S., Lu W., Kau C. y Marsden P. (1994) Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *The Journal of Biological Chemistry* 269 (52): 33082-33090.
- ❖ Heneka M. y Feinstein D. (2001) Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *Journal of Neuroimmunology* 114: 8-18.
- ❖ Hunot S., Brugg B., Ricard D., Michel P., Muriel M., Ruberg M., Faucheux B., Agid Y. y Hirsch E. (1997) Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 94: 7531-7536.
- ❖ Kaltschmidt B., Uherek M., Volk B., Baeuerle P. y Kaltschmidt C. (1997) Transcription factor NF- $\kappa$ B is activated in primary neuron by  $\beta$  peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 94: 2642-2647.
- ❖ Kim S. y Ponka P. (2002) Role of nitric oxide in cellular iron metabolism. *BioMetals* 0: 1-11.
- ❖ Kruszewski M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research* 531: 81-92.
- ❖ LaVaute T., Smith S., Cooperman S., Iwai K., Land W., Meyron-Holtz E., Drake S., Miller G., Abu-Asab M., Tsokos M., Switzer R., Grinberg A., Love P., Tresser N. y Rouault T. (2001) Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2

causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nature Genetics* 27 (2): 209-214.

- ❖ Leibold F. y Munro H. (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 85 (7): 2171-2175.
- ❖ Leung K. y Nabel G. (1988) HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through and NF- $\kappa$ B-like factor. *Nature* 333: 776-778.
- ❖ Levites Y., Youdim M., Maor G. y Mandel S. (2002) Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochemical Pharmacology* 63: 21-29.
- ❖ Li N. y Karin M. (1999) Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress?. *FASEB Journal* 13: 1137-1143.
- ❖ Luth H., Holzer M., Gartner U., Staufenbiel M. y Arendt T. (2001) Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Research* 913 (1): 57-67.
- ❖ Marshall H., Merchant K. y Stamler J. (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB Journal* 14: 1889-1900.
- ❖ Marshall H. y Stamler J. (2001) Inhibition of NF- $\kappa$ B by S-Nitrosylation. *Biochemistry* 40: 1688-1693.
- ❖ Martins E., Robalinho R. y Meneghini R. (1995) Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316 (1): 128-134.
- ❖ Meyron-Holtz E., Ghosh M., Iwai K., LaVaute T., Brazzolotto X., Berger U., Land W., Ollivierre-Wilson H., Grinberg A., Love P. y Rouault T. (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO Journal* 23 (2): 386-395.
- ❖ Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55-63.
- ❖ Núñez M., Tapia V., Toyokunib S. y Okadac S. (2001) Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco-2) cells. *Free Radical Research* 34: 57-68.
- ❖ Núñez M., Núñez-Millacura C., Tapia V., Muñoz P., Mazariegos D., Arredondo M., Muñoz P., Mura C. and Maccioni, R.B. (2003) Iron-activated iron uptake: A positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. *BioMetals* 16: 83-90.

- ❖ Núñez M., Gallardo V., Muñoz P., Tapia V., Esparza A., Salazar J. y Speisky H. (2004) Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radical Biology & Medicine* 37 (7): 953-960.
- ❖ Núñez-Millacura Claudia, Tapia Victoria, Muñoz Patricia, Maccioni Ricardo B. y Núñez Marco T. (2002) An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *Journal of Neurochemistry* 82: 240-248.
- ❖ Oliveira L. y Drapier J. (2000) Down-regulation of iron regulatory protein 1 gene expression by nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12): 6550-6555.
- ❖ Pantopoulos K., Mueller S., Atzberger A., Ansorge W., Stremmel W. y Hentze M. (1997) Differences in the regulation of iron regulatory protein-1 (IRP1) by extra and intracellular oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272 (15): 9802-9808.
- ❖ Peng H., Libby P. y Liao J. (1995) Induction and stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  by nitric oxide mediates inhibition of NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry* 270 (23):14214-14219.
- ❖ Perry G., Nunomura A., Hirai K., Zhu X., Perez M., Avila J., Castellani R., Atwood C., Aliev G., Sayre L., Takeda A. y Smith M. (2002) Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases?. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (11): 1475-1479.
- ❖ Peunova N. y Enikolopov G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68-73.
- ❖ Piette J., Piret B., Bonizzi G., Schoonbroodt S., Merville M., Legrand-Poels S. y Bours V. (1997) Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biological Chemistry* 378 (11): 1237-1245.
- ❖ Qu X., Wang H., De Plaen I., Rozenfeld R. y Hsueh W. (2001) Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB Journal* 15: 439-446.
- ❖ Radi R., Peluffo G., Alvarez M., Naviliat M. y Cayota A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine* 30 (5): 463-488.
- ❖ Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. y Castro L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (11): 1451-1464.
- ❖ Ramachandran A., Ceaser E. y Darley-Usmar V. (2004) Chronic exposure to nitric oxide alters the free iron pool in endothelial cells: role of mitochondrial respiratory

complexes and heat shock proteins. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 101 (1): 384-9.

- ❖ Rauhala P., Lin A. y Chiueh C. (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB Journal* 12:165-173.
- ❖ Reddy M. y Clark L. (2004) Iron, oxidative stress, and disease risk. *Nutrition Reviews* 62 (3): 120-124.
- ❖ Robb S., Gaspers L., Wright K., Thomas A. y Connor J. (1999) Influence de nitric oxide on cellular and mitochondrial integrity in oxidatively stresses astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 56: 166-176.
- ❖ Sambucetti L., Cherrington J., Wilkinson G. y Mocarski E. (1989) NF- $\kappa$ B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T-cell stimulation. *EMBO Journal* 8: 4251-4258.
- ❖ Sarchielli P., Galli F., Floridi Ar., Floridi Al. y Gallai V. (2003) Relevance of protein nitration in brain injury: a key pathophysiological mechanism in neurodegenerative, autoimmune, or inflammatory CNS diseases and stroke. *Amino Acids* 25: 427-436.
- ❖ She H., Xiong S., Lin M., Zandi E., Giulivi C. y Tsukamoto H. (2002) Iron activates NF- $\kappa$ B in Kupffer cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 283: G719-G726.
- ❖ Shimizu S., Nomoto M., Naito S., Yamamoto T. y Momose K. (1998) Stimulation of nitric oxide synthase during oxidative endothelial cell injury. *Biochemical Pharmacology* 55: 77-83.
- ❖ Shoham S. y Youdim M.B.H. (2000) Iron involvement in neuronal damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Biology* 46 (4): 743-760.
- ❖ Schoonbroodt S. y Piette J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor  $\kappa$ B activation pathways. *Biochemical Pharmacology* 60: 1075-1083.
- ❖ Simpson C. y Morris B. (1999) Activation of nuclear factor  $\kappa$ B by nitric oxide in rat striatal neurons: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *Journal of Neurochemistry* 73: 353-361.
- ❖ Soum E., Brazzolotto X., Goussias C., Bouton C., Moulis J., Mattioli T. y Drapier J. (2003) Peroxynitrite and nitric oxide differently target the iron-sulfur cluster and amino acid residues of human iron regulatory protein 1. *Biochemistry* 42: 7648-7654.
- ❖ Stuehr D. (1997) Structure-Function aspects in the nitric oxide syntheses. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37: 339-359.

- ❖ Symons M., Gutteridge J. Editors (1998) Free radical and iron: Chemistry, Biology and Medicine. New York: Oxford University Press.
- ❖ Togashi H., Sasaki M., Frohman E., Taira E., Ratan R. Dawson T. and Dawson V. (1997) Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor  $\kappa$ B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. Proceedings of National Academy of Sciences USA 94: 2676-2680.
- ❖ Thompson K., Shoham S. y Connor J. (2001) Iron and neurodegenerative disorders. Brain Research Bulletin 55 (2): 155-164.
- ❖ Wanat A., Schnepfensieper T., Stochel G., Van Eldik R., Bill E. y Wieghardt K. (2002) Kinetics, mechanism and spectroscopy of the reversible binding of nitric oxide to aquated iron (II). An undergraduate textbook reaction revisited. Inorganic Chemistry 41:4-10.
- ❖ Wardrop S., Watts R. y Richardson D. (2000) Nitrogen monoxide activates iron regulatory protein 1 RNA-binding activity by two possible mechanisms: effect on the [4Fe-4S] cluster and iron mobilization from cells. Biochemistry 39(10): 2748-2758.
- ❖ Weiss G., Werner-Felmayer G., Werner E., Gr̄newald K., Wachter H. y Hentze M. (1994) Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. Journal of Experimental Medicine 180: 969-976.
- ❖ Yan S., Yan S., Chen X., Fu J., Chen M., Kuppusamy P., Smith M., Perry G., Godman G., Nawroth P., Zweier J. y Stern D. (1995) Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid  $\beta$ -peptide. Nature Medicine 1: 693-699.