

UCh-Fc
Biotecnología
A 284
c.1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

**El metabolito de la oxidación de dopamina,
aminocromo *o*-quinona, induce la inhibición del
complejo I mitocondrial y modifica la expresión
de los transportadores de Fe: DMT1 y FPN1.**

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

Por

Pabla Francisca Aguirre Ortiz

Director de Seminario de Título: Dr. M. Tulio Núñez González

Enero 2013
Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

PABLA AGUIRRE ORTIZ

“El metabolito de la oxidación de dopamina, aminocromo o-quinona, induce la inhibición del complejo I mitocondrial y modifica la expresión de los transportadores de Fe: DMT1 y FPN1”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. M. Tulio Nuñez
Director del Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'T. Nuñez', written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alejandro Roth
Presidente

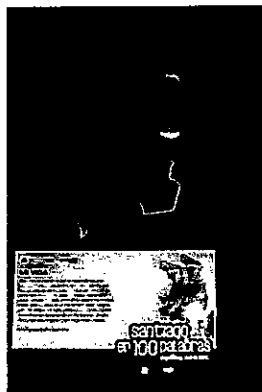
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alejandro Roth', written over a horizontal line.
A circular stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA CENTRAL' in the middle, and 'U. DE CHILE' at the bottom, flanked by two stars.

Dra. Cecilia Vergara
Evaluadora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. Vergara', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Enero de 2013





Nací el 26 de Septiembre de 1979 en una ciudad rota de un país roto, dentro de una familia dañada por la dictadura pero adorable en su afán.

Cuando llegó la democracia, no fue tan fácil terminar con el miedo, pero salimos adelante.

Hice de Kínder a 3° básico en el Liceo 105 de San Gerónimo y de 4° básico a 4° Medio en el Colegio Particular Subvencionado Estela Segura de Puente Alto. Luego llegué a la Universidad de Chile.

Creo que fue la oveja Dolly. Si vivo en un mundo donde se pueden clonar ovejas, yo quiero aprender a hacerlo.

En el colegio lo mío eran las matemáticas. Para darle buen uso a mis habilidades decidí entrar a estudiar Ingeniería Civil en Biotecnología en la Chile. El día de las postulaciones vi que aparte de la Ingeniería Civil existía una Ingeniería en Biotecnología Molecular. Comparando las mallas curriculares, no había donde perderse. Así llegué a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Y aquí todo fue mejor, mucho mejor. Conocí a personas increíbles, a científicos muy importantes, a gente que se convertiría en científico, a artistas camuflados de científicos, y por supuesto a mis muy buenos amigos, que son todo lo anterior.

En eso estaba cuando llegué al Laboratorio de Biología del Envejecimiento, donde descubrí que el Hierro era esencial para todos y en particular para mí. Y aquí sigo trabajando en un buen lugar y con buenas personas.

Dedicado a la Mamy.
Olga del Carmen Vivanco
17 de Septiembre 1920 - 07 de Mayo 2011

*“Todos estamos en la cuneta,
pero algunos de nosotros miramos las estrellas”*

Oscar Wilde

Poeta, dramaturgo y novelista irlandés

(1844-1913)

Paloma resucitada

*Soy tu paloma
antes fui cuervo
y te arranque los ojos.*

*Soy paloma
y me enredo
en tu silencio.*

*Soy paloma
y volaré
hasta cegarme
hasta perderme
hasta morirme.*

*Me desplomo
y me desplumo,
de mis cenizas
renazco
ya no paloma
sino Fénix.*

*Dispuesta a morir
por tu mirada,
dispuesta a matar
por ti,
resucitada.*

Kono Karü

Agradecimientos

A la comisión: al Dr. Roth y a la Dra. Vergara por su participación en este seminario de título. Gracias por su tiempo.

Al Dr. M. Tulio Núñez por la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio.

A la Dr. Casilda Mura por ser mi maestra y mi amiga.

Al señor decano, el Dr. Víctor Cifuentes por confiar en mí y permitirme ser ayudante. A su Laboratorio.

Al Laboratorio de Biología del Envejecimiento, a sus integrantes de ayer y de hoy: Vicky, Alejandro, Dora, Pablo, Andrés, Natalia, Nicole, Carol, Pame V., Enrique, Daniel, Pame U., Carolina G., Daniela, Carolina C., Elmer, Pancho, Alexis y Carlitos. A los estudiantes que pasaron por el Laboratorio y trabajaron conmigo, que me enseñaron más de lo que yo a ellos.

A mi familia: a la Mamy, a Mamá, a mi Hermano Camilo, a mis tíos y padrinos: Olgui y Juan, a mi tío Tito, a la Mónica, a mis primos: José Tomás, Camila, Javiera y Rodolfo. Por su cariño, su apoyo, su paciencia y su interés en la Biotecnología.

A mis amigos: Carolina, Claudia, Karen, Karina, Mario y Paula por haber estado conmigo.

A Miriam y a Nicole a la distancia.

Al Dr. Luis Luarte, a la Sra. Inés por cuidar a las madres y a la Sra. Magaly por cuidar a mamá. A las niñas.

Gracias por todo a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes Bibliográficos	1
1.1.1. Enfermedad de Parkinson	1
1.1.2. Disfunción mitocondrial en EP	3
1.1.3. Metabolismo de la dopamina y aminocromo	4
1.1.4. Fe en el Sistema Nervioso Central	6
1.1.5. Homeostasis de Fe	6
1.1.6. Sistema IRE/IRP	7
1.1.7. Fe y neurodegeneración	9
1.2. HIPÓTESIS	11
1.3. OBJETIVO GENERAL	11
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
1.4.1. Determinar el efecto del tratamiento de aminocromo sobre la actividad mitocondrial.	11
1.4.2. Determinar el efecto de aminocromo sobre la homeostasis de Fe.	11

2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Anticuerpos	12
2.2. Equipos	12
2.3. Cultivo Celular	12
2.4. Preparación de ARN total de células SH-SY5Y	13
2.5. Transcripción reversa (RT)	13
2.6. PCR	14
2.7. Preparación de mitocondrias aisladas	15
2.7.1. Desde células SH-SY5Y.	15
2.7.2. Desde hígado de rata	16
2.8. Actividad del complejo I mitocondrial.	16
2.9. Determinación de los niveles de ATP	17
2.10. Incorporación de Fe	18
2.11. Determinación de ferritina	18
2.12. Ensayo de viabilidad celular.	19
2.13. Preparación de aminocromo	19
2.14. Análisis de datos	19

3. RESULTADOS	20
3.1. Aminocromo disminuye la actividad mitocondrial.	20
3.1.1. Concentraciones de aminocromo sobre 30 μ M aumentan la muerte celular.	20
3.1.2. Aminocromo disminuye la actividad del complejo I mitocondrial	22
3.1.3. Aminocromo disminuye los niveles de ATP	23
3.1.4. La actividad del complejo I mitocondrial disminuye en mitocondrias aisladas tratadas con aminocromo	24
3.2. Aminocromo afecta la homeostasis de Fe	25
3.2.1. Aminocromo aumenta la incorporación de Fe y el contenido de ferritina.	25
3.2.2. Aminocromo aumenta el ARNm de DMT1 y disminuye el ARNm de FPN1	27
3.2.3. Aminocromo aumenta los niveles de expresión de DMT1 y disminuye FPN1	29
4. DISCUSIÓN	30
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	33
6. REFERENCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neuropatología de la E.P.	2
Figura 2. Metabolismo de aminocromo	5
Figura 3. Los 2 estados de IRP1	8
Figura 4. Sistema IRE/IRP. Regulación post transcripcional de rTf y ferritina.	9
Figura 5. Registro de A_{340} desaparición de NADH para la determinación de la actividad del complejo I mitocondrial.	17
Figura 6. Toxicidad de aminocromo.	21
Figura 7. Concentraciones micro molares de aminocromo, inhiben la actividad del complejo I mitocondrial, en células SH.SY5Y diferenciadas.	23
Figura 8. Concentraciones micromolares de aminocromo disminuyen los niveles de ATP en células SH-SY5Y diferenciadas.	24
Figura 9. Aminocromo inhibe la actividad del complejo I mitocondrial, en mitocondrias aisladas de hígado de rata.	25
Figura 10. Aminocromo aumenta la incorporación y la acumulación de Fe.	30
Figura 11. Aminocromo modifica el ARNm de los transportadores de Fe.	27

Figura 12. Aminocromo modifica la expresión de los transportadores de Fe. 28

Figura 13. Modelo de neurotoxicidad de aminocromo. 32

ABREVIATURAS

AC	:	Aminocromo
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	ADN complementario
AR	:	Ácido retinoico
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	ARN mensajero
ATCC	:	American Type Culture Collection
ATP	:	Adenina tri fosfato
AMP	:	Adenina mono fosfato
BDNF	:	Factor neuronal derivado de cerebro
BSA	:	Albumina de suero bovino
DA	:	Dopamina
DAT	:	Transportador activo de DA
DEPC	:	Dietyl pirocarbonato
DMT1	:	Transportador de metales divalentes
dNTPs	:	Desoxinucleotidos trifosfato
DTT	:	Ditiotreitol.
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EP	:	Enfermedad de Parkinson
Fe	:	Hierro
FPN1	:	Ferroportina
GADPH	:	Gliceraldehido 3-fosfate deshidrogenasa
GSH	:	Glutación reducido

HBSS	:	Solución salina balanceada de Hank
H ₂ DCF-DA	:	2', 7'- dicloro dihidro fluoresceína diacetato
IRE	:	Elemento de respuesta a Fe
IRP1	:	Proteína reguladora del Fe 1
LB	:	Cuerpos de Lewy
LDH	:	Lactato deshidrogenasa
LIP	:	Pool de Fe reactivo
M-MLV	:	Moloney Murine Leukemia Virus
MPP+	:	1-metil-4-fenilopiridino
MPTP	:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAC	:	N- acetil cisteína
NADH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PBS	:	Solución tampón salino de fosfato
PD	:	Parkinson disease
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno
S	:	Azufre
SFB	:	Suero fetal bovino
SH-SY5Y	:	Línea celular de neuroblastoma humano
SNpc	:	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TH	:	Tirosina hidroxilasa
Tf	:	Transferrina

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial, la acumulación de Fe, el estrés oxidativo, la disminución de glutatión (GSH) y la disfunción del sistema ubiquitina- proteosoma. Estos eventos pueden llevar a la muerte de la neuronas dopaminérgicas en la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), que se observa en la EP. La oxidación de la dopamina (DA) a aminocromo-*o*-quinona es parte del proceso de formación de neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que les confiere su pigmentación característica. El salirse de esta vía, por la ganancia de 1 electrón, lleva a la formación del radical leucoaminocromo *o*-semiquinona, el cual reacciona con el oxígeno y con los metales redox activos generando el radical libre hidroxilo. En este trabajo evaluamos la hipótesis que aminocromo es una toxina endógena que induce la acumulación de hierro (Fe) a través de la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, en la mitocondria. Nosotros encontramos que aminocromo inhibe la actividad del complejo I mitocondrial y disminuye los niveles de ATP en células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico. Este efecto fue aparentemente directo, ya que la inhibición fue reproducida en mitocondrias aisladas. Adicionalmente, el tratamiento con aminocromo induce un incremento de la expresión de DMT1, una disminución de la expresión de FPN1, a nivel de ARNm y proteína, y un incremento de la incorporación de ⁵⁵Fe. El efecto producido por aminocromo sobre DMT1 es prevenido en presencia de NAC. Estos resultados indican que en células SH-SY5Y, Aminocromo induce un círculo vicioso de inhibición del complejo I y dishomeostasis de Fe, como se observa en la EP.

SUMMARY

Diminished activity of mitochondrial complex I, iron accumulation, oxidative stress, glutathione (GSH) depletion and ubiquitin-proteasome system dysfunction are pathognomonic signs of Parkinson's disease (PD). These events can lead to death of dopaminergic neurons in the *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) observed in PD. The oxidation of dopamine (DA) to the *o*-quinone aminochrome is part of the process leading to neuromelanin formation in dopaminergic neurons in the SNpc and gives their characteristic pigmentation. The escape from this pathway by a gaining one electron leads to the formation of the leucoaminochrome *o*-semiquinone radical, which reacts with oxygen and redox-active metals to generate hydroxyl free radical. Here, we tested the hypothesis that the DA metabolite *o*-quinone aminochrome is an endogenous neurotoxin that induces iron accumulation through the inhibition of complex I of the mitochondrial electron-transport chain. We found that aminochrome inhibited complex I and ATP production in SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated into a dopaminergic phenotype. This effect was apparently direct since inhibition was replicated in isolated mitochondria. Additionally, treatment of cells with aminochrome induced an increased the DMT1 expression, decreased FPN1 expression, both at mRNA and protein levels, and increased ⁵⁵Fe uptake. The aminochrome effect on DMT1 was prevented by treatment with the antioxidant NAC. These results indicate that aminochrome induces a vicious cycle of complex I inhibition and iron dishomeostasis in SH-SY5Y cells as observed in PD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Bibliográficos

1.1.1. Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP), es el desorden relacionado a trastornos del movimiento más frecuente en el mundo. La prevalencia en países industrializados aumenta marcadamente con la edad y se estima cercana al 1% en personas sobre los 60 años y en 4% en personas de 80 años de edad (Nussbaum y Ellis, 2003). La edad de inicio de los síntomas está próxima a los 55 años (Dauer y Przedborski, 2003).

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

Fisiológicamente, la EP se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que conforman el circuito nigro-estriatal y la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas, denominados cuerpos de Lewy (LBs), en las neuronas remanentes. Los cuerpos celulares de las neuronas del circuito nigro-estriatal se encuentran localizados en la *Substancia Nigra pars compacta* (SNpc) y se proyectan al ganglio basal, donde forman

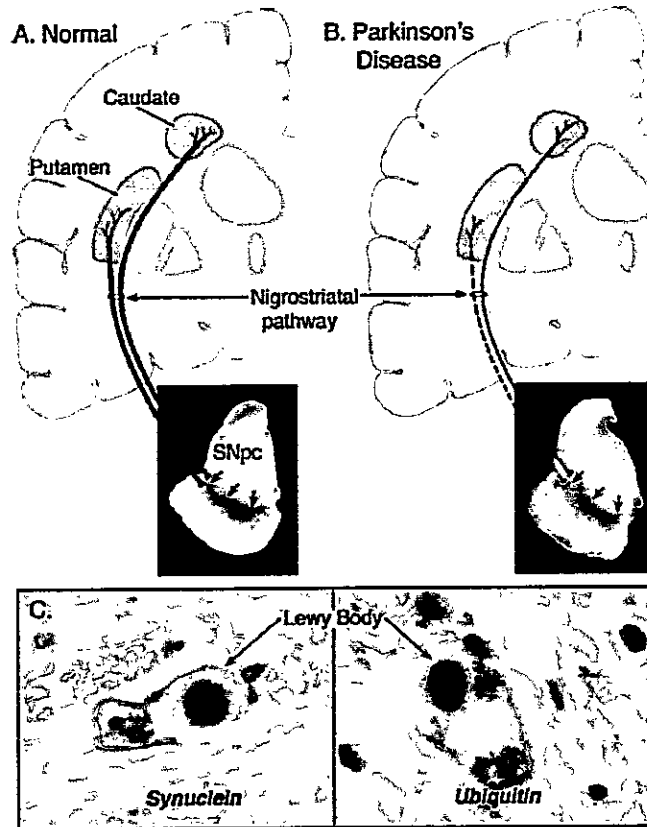


Figura 1. Neuropatología de la EP. A. Representación de la vía nigro-estriatal normal (en rojo). Está compuesta por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares están localizados en la SNpc. Estas neuronas proyectan al ganglio basal y hacen sinapsis en el estriado. La fotografía muestra la pigmentación normal de la SNpc, producida por la neuromelanina dentro de las neuronas dopaminérgicas. B. Representación esquemática de la vía nigro-estriatal en la enfermedad. En EP la vía nigro-estriatal degenera. Se observa una marcada pérdida de neuronas que proyectan al putamen (línea discontinua), y una menor disminución de las que proyectan al caudado (línea continua). La fotografía muestra la despigmentación de la SNpc debido a la marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas. C. LBs en una neurona dopaminérgica de la SNpc. Inmunotinción con un anticuerpo contra α -synucleína revela un LB con una zona central muy inmunoreactiva, rodeada por una zona periférica menos inmunoreactiva. Por el contrario la inmunotinción con un anticuerpo contra ubiquitina muestra una inmunoreactividad más difusa (foto de la derecha). (Dauer y Przedborski 2003).

sinapsis con los núcleos putamen y caudado en el estriado. La pérdida de estas neuronas, las cuales normalmente contienen el pigmento neuromelanina (Marsden, 1983), produce la despigmentación de la SNpc, un marcador patológico de la enfermedad. Al inicio de los

síntomas, ha disminuido cerca del 80% de la dopamina liberada en el putamen y se han perdido cerca del 60% de las neuronas dopaminérgicas (ref).

1.1.2. Disfunción mitocondrial en EP.

La primera evidencia de que un defecto en la fosforilación oxidativa juega un rol importante en la patogénesis de la EP provino del descubrimiento del compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Nicklas y col., 1987). En 1982, jóvenes drogadictos desarrollaron un rápido y progresivo síndrome parkinsoniano debido al uso intravenoso de 1-metil-4-fenil-4-propion-oxipiperidina (MPPP), un análogo de meperidina (Demerol) (Langston, 1985). El compuesto MPTP fue el contaminante neurotóxico producido durante la síntesis de esta droga. En humanos y monos, MPTP produce un síndrome parkinsoniano irreversible y severo. MPTP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y posteriormente es oxidado en el ion 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺) por la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) localizada principalmente en la mitocondria de células gliales. El metabolito activo del MPTP, el MPP⁺ es un inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y sustrato para el transportador de dopamina (DAT). El MPP⁺ ingresa a las neuronas dopaminérgicas vía DAT produciendo toxicidad y muerte celular (ref).

Estudios posteriores identificaron una disminución en la actividad del complejo I en la SNpc de pacientes con EP (Langston y Ballard, 1983; Schapira y col., 1990; Greenamyre y col., 2001). Intoxicaciones en ratones, monos y cultivos celulares con inhibidores de la actividad del complejo I como son MPP⁺, rotenona y paraquat (Sherer y col., 2003) son utilizados como modelos experimentales de la EP (Olanow, 2007) produciendo en estos la

pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas remanentes, similares a las observadas en pacientes con EP. Los principales efectos producidos por la inhibición del complejo I son un aumento en la producción de radicales libres y estrés oxidativo y una disminución de la síntesis de ATP, lo cual causa un incremento en la concentración de calcio intracelular, excitotoxicidad y daño celular asociado al óxido nítrico (Scotcher y col. 1990).

1.1.3. Metabolismo de la dopamina y aminocromo

El aminocromo es el precursor de la neuromelanina y se forma durante la oxidación de la DA. La concentración de DA presente en las neuronas dopaminérgicas es dependiente de la síntesis de DA catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y de la incorporación de dopamina extracelular mediada por los transportadores de DA. Los grupos hidroxilo de la DA juegan un rol importante en la oxidación de la DA, ya que los protones de los grupos hidroxilo se disocian a pH fisiológico en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas. El oxígeno cataliza la oxidación de DA a dopamina *o*-quinona, la cual espontáneamente se cicla y para formar aminocromo. La oxidación de la DA a aminocromo también puede ser catalizada por una serie de enzimas como xantina oxidasa, tyrosinasa, entre otras, así como por metales de transición (Paris y col. 2009).

Aminocromo es capaz de participar en distintas reacciones. La primera reacción es su polimerización para formar neuromelanina (Figura 2), una reacción que es dependiente de la concentración de aminocromo. La neuromelanina se acumula con la edad en la SN en humanos. Dado que las células que contienen neuromelanina no degeneran en la SN de individuos sanos (Figura 1), se sugiere que la vía de formación de neuromelanina no sería

neurotóxica por sí misma. La segunda reacción en la que participa aminocromo es en la formación de aductos de alfa- sinucleína. Aminocromo puede ser reducido por un electrón para formar el radical leucoaminocromo *o*-semiquinona, el cual es extremadamente reactivo. Puede oxidarse, generando un ciclo redox (Figura 2), lo que resulta en: el consumo de NADH (el que es requerido para la síntesis de ATP), el consumo de NADPH (el que es requerido entre otras cosas para mantener el glutatión reducido ejerciendo éste una acción antioxidante), el consumo de oxígeno (el que es requerido para la síntesis de ATP) y la formación de radical superóxido (Paris y col., 2009).

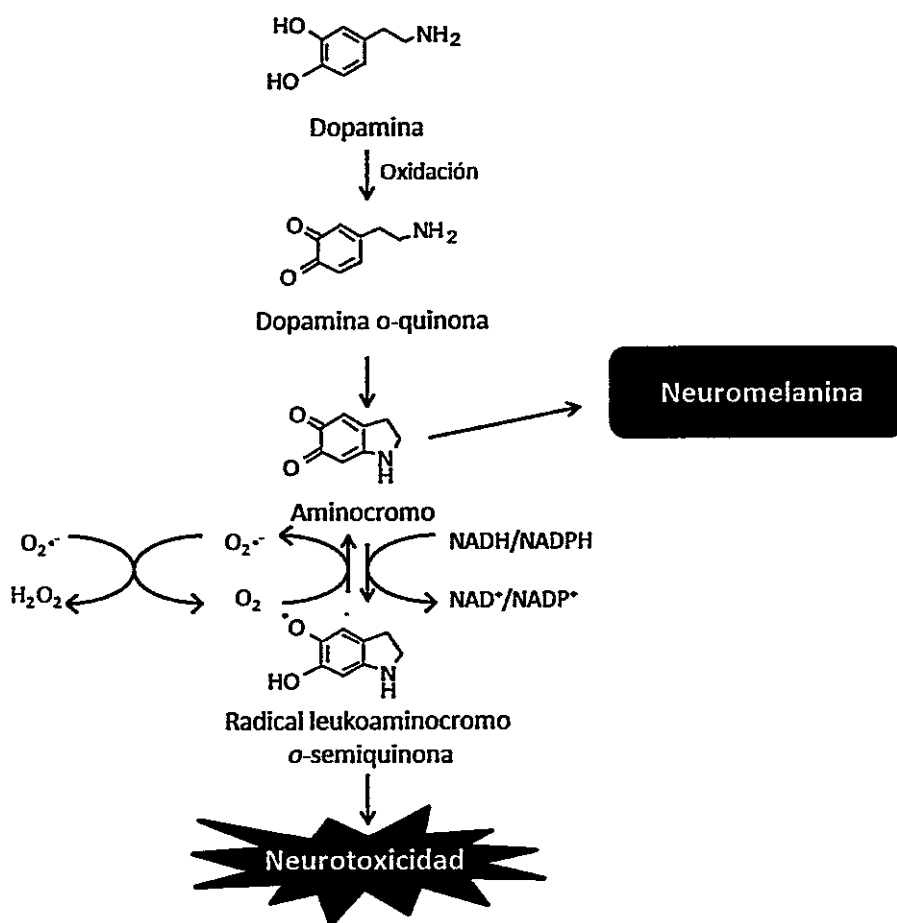


Figura 2. Metabolismo del aminocromo. Las neuronas son capaces de oxidar DA a aminocromo el cual es precursor de la neuromelanina. Aminocromo puede inducir neurotoxicidad cuando es reducido por un electrón de flavoenzimas para producir el radical leucoaminocromo *o*-semiquinona. (Modificado de Paris y col., 2009).

1.1.4. Fe en el Sistema Nervioso Central

El hierro (Fe) es un cofactor necesario en muchos procesos metabólicos en el sistema nervioso central, incluyendo fosforilación oxidativa, síntesis de mielina, producción de neurotransmisores, metabolismo del óxido nítrico y transporte de oxígeno. Juega un rol importante en la transferencia de electrones y es cofactor para un gran número de enzimas (Crichton y col., 2011), incluyendo enzimas que participan en la biosíntesis de neurotransmisores en el cerebro, como es el caso de la TH, (enzima implicada en la síntesis de catecolaminas, incluyendo DA), triptófano hidroxilasa, (enzima implicada en la síntesis de serotonina) y monoaminoxidasa implicada en el metabolismo de la DA.

Una inevitable consecuencia del envejecimiento es una elevación del Fe en zonas específicas del cerebro, localizado en ferritina y neuromelanina, sin que ello tenga un efecto adverso aparente. Sin embargo tanto la deficiencia como el exceso pueden afectar seriamente la función neuronal (Crichton y col., 2011).

1.1.5. Homeostasis de Fe.

El Fe es transportado a través de la circulación unido a la proteína transferrina (Tf), la que puede unir 1 o 2 átomos de Fe^{+3} . Tf se une a su receptor presente en la membrana plasmática y se produce internalización del complejo en vesículas endocíticas. El pH del endosoma es de 6, condiciones en que el Fe es liberado del complejo para luego ser transportado a través de la membrana endosomal por el transportador de metales divalentes DMT1. El Fe citoplasmático puede ser transferido a la mitocondria por el transportador mitoferrina para ser usado en la síntesis de grupos hemo y grupos Fe-S; almacenado en ferritina o formar parte del pool de Fe reactivo citoplasmático (LIPc) (Crichton y col.

2011). DMT1 también se encuentra en la membrana plasmática, desde donde incorpora Fe al interior celular, una vez que este ha sido reducido por ferrireductasas como Dcytb. La salida de Fe celular es mediada por el transportador de Fe ferroportina (FPN1) en conjunto con una ferroxidasa. Hefestina provee la actividad oxidasa en el intestino, mientras que ceruloplasmina es la oxidasa utilizada en la mayoría de los otros tejidos.

1.1.6. Sistema IRE/IRP.

La regulación de la homeostasis del Fe celular está controlada en gran medida a nivel de la traducción de los ARNm de proteínas involucradas en metabolismo celular del Fe. Esta regulación post transcripcional se ejerce a través de dos proteínas reguladoras del Fe (IRP1 e IRP2), que actúan como sensores citoplasmáticos de Fe.

En condiciones de abundancia de Fe celular, IRP1 contiene un núcleo 4Fe-4S que lo mantienen en una condición “cerrada” con actividad de aconitasa mitocondrial. En condiciones de deficiencia de Fe, ocurre un desensamblaje del núcleo 4Fe-4S alcanzando IRP1 una conformación “abierta”, con capacidad para unirse con alta afinidad a las estructuras en forma de horquilla (hairpin) presentes en los ARNm, conocidas como elemento de respuesta a Fe (IRE) de las proteínas reguladas (Figura 3).

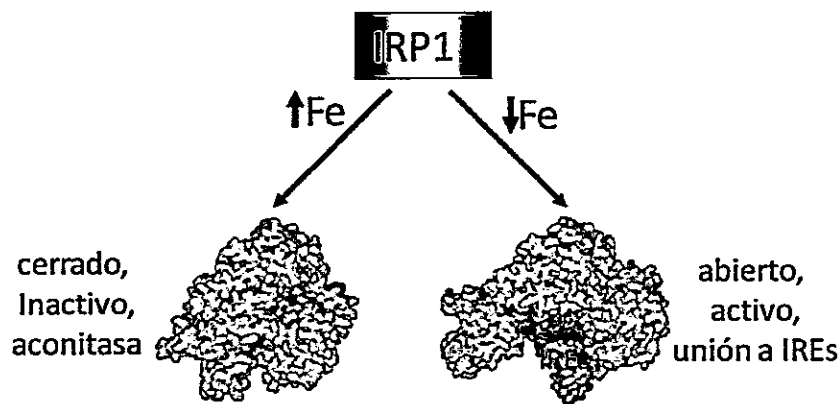


Figura 3. Los 2 estados de IRP1. Bajo condiciones de alto Fe citoplasmático IRP1 contiene un núcleo 4Fe-4S que lo mantiene en posición cerrada, con actividad aconitasa. Una baja en el Fe citoplasmático resulta en la disociación del núcleo 4Fe-4S y el paso a una estructura abierta con capacidad para unirse a IREs.

IRP2 no contiene un núcleo Fe-S y está constitutivamente en conformación abierta con capacidad de unión a IREs. Bajo condiciones de alto Fe, IRP2 es ubiquitinado y degradado en el proteosoma.

Cuando el IRE se encuentra en la región no traducida del extremo 5' del ARNm (como en el caso de ferritina y FPN1), la unión de las IRPs evita el inicio de la traducción, por el contrario, en el caso de DMT1 y el receptor de Tf (rTf), donde el IRE está en la región no traducida del extremo 3', la unión de las IRPs al ARNm protege de la degradación por nucleasas (Figura 4). Esto da como resultado un incremento de la incorporación de Fe y un bloqueo del almacenamiento y la salida de Fe (Zecca y col., 2004). Cuando el Fe es abundante, las IRPs no son capaces de unirse a los IREs, por lo que los ARNm de ferritina y FPN1 pueden ser traducidos y los ARNm del receptor de transferrina y de DMT1 pueden ser degradados.

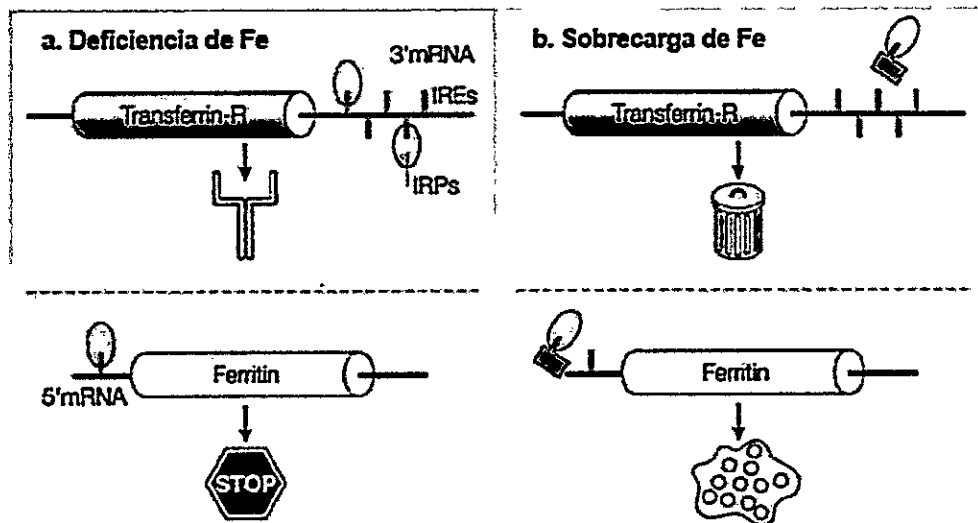


Figura 4. Sistema IRE/IRP. Regulación post transcripcional de rTf y ferritina. Las proteínas reguladoras del Fe, IRPs, se unen a los elementos de respuesta a Fe, IREs, localizados en la región 3' y 5' no traducida de los ARNm del rTf y ferritina respectivamente. **a.** en Deficiencia de Fe, las IRPs se unen a los IREs, protegiendo el ARNm de rTf de la degradación y evitando la síntesis de ferritina. **b.** Cuando el Fe está en abundancia, los IRPs no se unen a los IREs, permitiendo la degradación de el ARNm de rTf y la síntesis de ferritina (Modificado de Zecca y col. 2004).

1.1.7. Fe y neurodegeneración.

Se ha reportado en la literatura un aumento del transportador de entrada de Fe DMT1 en las neuronas de la SNpc de ratones tratados con MPTP y en tejido *post mortem* de pacientes con EP (Salazar y col, 2008). También se observó un incremento de DMT1 y una disminución de FPN1 en neuronas de la SN de ratones tratados con MPTP (Lv y col., 2011).

Por otra parte la inhibición del complejo I mitocondrial resulta en una disminución de la síntesis mitocondrial de núcleos Fe-S funcionales (Mena y col., 2011). Debido a que los núcleos Fe-S son un grupo prostético de numerosas proteínas, la inhibición de su síntesis podría tener amplias repercusiones para el metabolismo celular. Es particularmente relevante la observación de que la inhibición del complejo I resulta en la activación de

IRP1. Dado que las condiciones de bajo Fe suelen activar a IRP1, su activación por la disminución de la síntesis de núcleos Fe-S puede interpretarse como una falsa señal de bajo Fe. Con la correspondiente inducción de proteínas tales como DMT1 y el rTf, así como una disminución de ferritina (Mena y col., 2011).

En resumen, la evidencia experimental indica que la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la acumulación de hierro, la disminución de los niveles de glutatión son signos patognomónicos de la EP. Recientemente propusimos que estos procesos forman parte de un ciclo de retroalimentación positiva que termina en daño oxidativo irreversible y muerte neuronal (Núñez et al., 2012). En este Seminario de Título evaluamos la posible contribución de una toxina endógena en neuronas dopaminérgicas, la o-quinona aminocromo, en la posible inducción de elementos de este ciclo.

1.2. HIPÓTESIS

En células dopaminérgicas, aminocromo es una toxina endógena que induce la acumulación de hierro a través de la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones.

1.3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del tratamiento de aminocromo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico, sobre la actividad mitocondrial y la homeostasis del Fe.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.4.1. Determinar el efecto del tratamiento de aminocromo sobre la actividad mitocondrial.

- 1.4.1.1. Evaluar el efecto de aminocromo sobre la viabilidad celular en cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico.
- 1.4.1.2. Determinación de la actividad del complejo I mitocondrial
- 1.4.1.3. Determinación de los niveles de ATP celular

1.4.2. Determinar el efecto de aminocromo sobre la homeostasis del Fe.

- 1.4.2.1. Evaluar el efecto de aminocromo sobre la incorporación de Fe y el contenido de Fe intracelular.
- 1.4.2.2. Evaluar el efecto de aminocromo sobre la expresión de proteínas DMT1 y FPN1
- 1.4.2.3. Evaluar el efecto de aminocromo sobre el ARNm de DMT1 y FPN1

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Anticuerpos.

Anti- β actina (SIGMA, A 5441), suero policlonal anti-DMT1 (BioSynthesis, USA), liquido ascítico anti- FPN1, anti-ferritina (Rockland), anti-ferritina peroxidasa (Rockland).

2.2. Equipos.

Lector de placas ELISA SUNRISE (Tecan Trading AG, Suiza); cámaras electroforéticas (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA); fuente de poder PS 4010-2 (Sigma-Aldrich); centrifuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Alemania); centrífuga Sorvall RT600B; espectrofotómetro Lambda EZ210 Perkin-Elmer, lector de microplacas (Sinergy 2, Biotek); termociclador Maxigen Gradient (Axygen, USA), microscopio de epifluorescencia Nikon.

2.3. Cultivo celular.

Para el cultivo de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano (ATCC número CRL-2266, Rockville, MD), se utilizó como medio de cultivo una mezcla de MEM (Minimum Essential Medium) y F12 (Nutrient Mixture F-12) 1:1, suplementado con 20 mM de Hepes, 20 mM de NaHCO_3 , aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos. Las células fueron mantenidas en un incubador bajo condiciones constantes de temperatura (37 °C) y presión de CO_2 (5 %). Las células fueron crecidas en placas de 35 mm, 60 mm y 100 mm de diámetro; placas de 12, 24 y 96 pocillos, según el ensayo.

Para su diferenciación a un fenotipo dopaminérgico, las células fueron tratadas con 10 μ M de ácido retinoico (AR) por 4 días en medio completo, MEM/F12 10 % SFB, para luego cultivarse 3 días con 25 ng/mL de BDNF en medio MEM/F12 0,5 % SFB (Encinas y col., 2000).

2.4. Preparación de ARN total de células SH-SY5Y.

Luego del tratamiento con aminocromo se realizó la extracción de ARN de células SH-SY5Y utilizando el reactivo TRizol (Invitrogen) según las especificaciones técnicas del fabricante. Las células fueron lisadas directamente agregando 1mL de TRizol a una placa de cultivo de 60mm de diámetro. El lisado fue incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa fue traspasada a un tubo limpio y el ARN fue precipitado agregando a los tubos 500 μ L de isopropanol y dejándolos 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el ARN ubicado en el fondo del tubo fue lavado con etanol 75 % en agua tratada con DEPC y centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. Finalmente el ARN casi seco fue disuelto en H₂O-DEPC. El ARN de cada muestra se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}), además de calcular la relación $A_{260/280}$ (>1,6). La integridad del ARN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa.

2.5. Transcripción reversa (RT).

La síntesis del ADNc se realizó utilizando transcriptasa reversa (M-MLV, 28025, Invitrogen). Para comenzar se agregó a un tubo estéril libre de nucleasas: 2 μ g de ARN

total, 1 μL de oligo $(\text{dT})_{18}$ (Fermentas, S0132), 1 μL de de mezcla de dNTPs (10 mM de cada nucleótido) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 12 μL . El tubo se incubó 5 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$, luego de lo cual se puso en hielo y se agregó: 4 μL de Tampón 5X de RT, 2 μL de 0,1 M de DTT y 1 μL de RNase OUT (inhibidor de ribonucleasas, Invitrogen, 10777-019). Esta mezcla se incubó 2 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, luego se agregó la enzima, 1 μL de transcriptasa reversa. La reacción se incubó 50 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Luego de este tiempo, la reacción se inactivó calentando a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

2.6. PCR.

Se realizó PCR semi-cuantitativo para FPN1 y las isoformas 1B, +IRE y -IRE de DMT1 como se describe en (Mena y col., 2008). 2 μL del ADNc generado en la reacción de RT descrita anteriormente, fue utilizado como templado en la reacción de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se indica.

Mezcla base: 2 μL de ADNc, 2,5 μL de tampón de la polimerasa 10X, 0,5 μL de 10 mM de dNTPs, 17 μL de H_2O estéril, 0,5 μL de 10 μM de partidor (+), 0,5 μL de 10 μM de partidor (-), 1,5 μL de 25 mM de MgCl_2 y 0,5 μL de Taq DNA polimerasa.

El programa utilizado en el termociclador, fue el siguiente: 5 minutos a 94 $^{\circ}\text{C}$, 38 ciclos de 1 minuto a 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto a la temperatura de alineación (T_m) correspondiente al par de partidores, y 1 minuto a 72 $^{\circ}\text{C}$, seguido de una amplificación final de 10 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

Los partidores utilizados fueron : FPN1: (+) 5'CCAAGATACCTGAAATTACAAC3';(-) 5'CCAGCCATTTATTGGAATTCTGCAGTAC3', DMT1 1B: (+) 5'CGGGGGCGGCGTGT3'; (-) 5'AGGGATTACTATAGGCAGGGTTGAT3', DMT1+IRE: (+)

5'TGGGCATACGGTAAGCATCTCT3'; (-) 5'TCCCACCCTAATCCAGTTCTAAG3', DMT1-IRE: (+) 5'TCTGAACACCATGGACGCTGACT3'; (-) 5'CCATCAGAGGCCAATCGTTTAACT3', como control de carga se utilizaron los partidores del gene de GADPH: (+) 5'TGGGTGTGAACCATGAGAAG3'; (-) 5'CCATCACGACACAGTTTCC3'.

2.7. Preparación de mitocondrias aisladas.

2.7.1. Desde células SH-SY5Y.

Se utilizó un protocolo modificado de Bulteau y col., 2003. Células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico fueron tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h. Luego del tratamiento las células fueron removidas de las placas de cultivo, incubando con Tris-Salino-EDTA (40 mM de Tris-HCl pH: 8, 100 mM de NaCl y 1 mM EDTA) y la suspensión se pasó a un tubo de centrifuga. Luego de una centrifugación de 10 minutos a 600 g, las células sedimentadas fueron lavadas con PBS y centrifugadas de nuevo 10 minutos a 600 g. Las células sedimentadas fueron resuspendidas en tampón de extracción de mitocondrias (200 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EGTA, 10 mM de Hepes pH 7,4 y 0,5 mg/ml de BSA) y homogenizadas utilizando un homogenizador vidrio/teflón (Potter Elvehjem, Alemania). Se centrifugó 10 minutos a 500 g y se homogenizó nuevamente. Luego se centrifugar 10 minutos a 500 g y el nuevo sobrenadante fue centrifugado ahora a 12.000 g por 20 minutos. El sedimento fue resuspendido en solución de resuspensión (250 mM de manitol, 5 mM de Hepes y 0,5 mM de EGTA) y mantenido a 4 °C hasta su uso. Se reservó una alícuota para la posterior determinación de la concentración de proteínas.

2.7.2. Desde hígado de rata.

Un trozo de hígado de rata adulta fue lavado con PBS y luego homogenizado en 20 mL de tampón de extracción, para continuar con el protocolo descrito anteriormente para la preparación de mitocondrias aisladas.

2.8. Actividad del complejo I mitocondrial.

La actividad del complejo I mitocondrial fue determinada siguiendo la oxidación de NADH (que absorbe a 340 nm de longitud de onda), que se oxida a NAD⁺. Paralelamente, la actividad no respiratoria de oxidación de NADH, debida a la citocromo b oxido reductasa, se mide inhibiendo específicamente el complejo I con rotenona. El aceptor natural de electrones del complejo I mitocondrial es la coenzima Q₁₀ también conocida como ubiquinona. En este ensayo se reemplaza al aceptor por decyl-ubiquinona. (Jana y col., 2007; Mena y col., 2011).

La mezcla de reacción en esta determinación consiste en: 100 μ M de NADH, 50 mM de KH₂PO₄ pH: 7,5, 50 μ M de decylubiquinona y 3,75 mg/ml de BSA. Por otra parte las mitocondrias aisladas obtenidas del procedimiento antes descrito fueron incubadas 5 minutos a 37 °C con y sin rotenona para cada condición. Se colocan en cada pocillo de una microplaca, 190 μ L de la mezcla de reacción. Se comienza la lectura (A_{340}) de una línea base. La reacción comienza agregando de 6 a 10 μ g de mitocondrias aisladas previamente incubadas. En la Figura 5 se observa el registro de la A_{340} de una muestra representativa. Se estimó el coeficiente de extinción molar para NADH según la ley de Lambert-Beer (en este caso para lecturas en microplaca, con volúmenes de 200 μ L) y luego se calculó la actividad específica, la que fue expresada en nmoles de NADH/min/mg de proteínas.

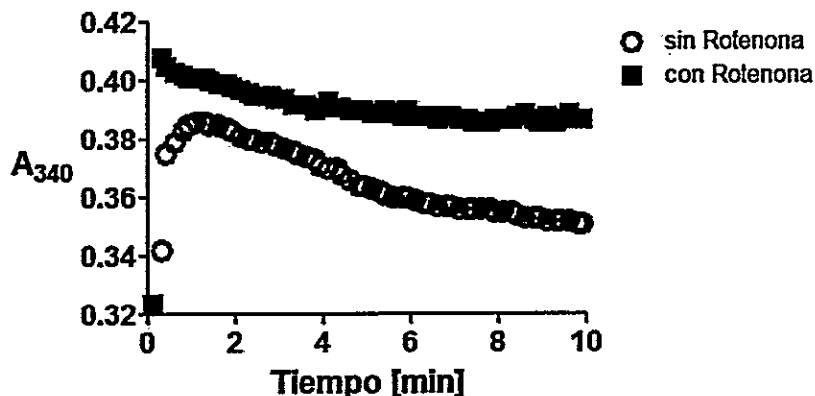


Figura 5. Registro de A_{340} . Oxidación de NADH para la determinación de la actividad del complejo I mitocondrial. Junto a la actividad respiratoria de oxidación de NADH del complejo I mitocondrial, se registró la actividad no respiratoria de oxidación de NADH, debida a la citocromo b oxido reductasa, inhibiendo específicamente el complejo I en presencia de rotenona. La figura muestra un experimento tipo en el que se observa disminución de la A_{340} correspondiente a la oxidación de NADH a NAD^+ . Se muestra un experimento representativo.

2.9. Determinación de los niveles de ATP.

El ATP fue determinado utilizando un kit basado en luminiscencia (Molecular Probes, A2206) Brevemente, las células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico fueron tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h. Luego del tratamiento las células fueron lisadas para el ensayo. Se considera que el ATP necesario para la emisión de luminiscencia mediada por la luciferasa, está dado por las muestras, según la siguiente relación:



La luminiscencia a 560 nm de longitud de onda fue detectada para cada muestra en el Lector de microplacas (Sinergy 2, Biotek) y para una curva de calibración, lo que permitió interpolar la concentración de ATP en cada muestra.

2.10. Incorporación de Fe.

Células SH-SY5Y diferenciadas fueron tratadas por 20 h a diferentes concentraciones de aminocromo o 100 μM de MPP+, en ausencia o presencia de 1 mM de NAC. Luego del tratamiento las células fueron incubadas con 1 mL de 1 μM $^{55}\text{FeCl}_3$; 100 μM ascorbato en HBSS a 37°C por 1 h, donde el $^{55}\text{FeCl}_3$ se encontraba en una relación 1:4 con el FeCl_3 . Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS para remover el ^{55}Fe no incorporado a las células. Las células fueron despegadas con 100 μL de buffer Tris- salino EDTA. Se usó una alícuota de 10 μL para determinar la concentración de proteínas. A la suspensión celular restante se le agregó 1 mL de líquido de centelleo para medir la radiactividad de ^{55}Fe . La radiactividad de cada grupo (definida como radiactividad de $^{55}\text{Fe}/\mu\text{g}$ de proteína) fue normalizada con el grupo control individual.

2.11. Determinación de ferritina.

El contenido de ferritina fue determinado con un ensayo de ELISA tipo sándwich (Arredondo y col., 1997). Brevemente, se adhirió a una microplaca el anticuerpo anti-ferritina (Rockland), como se muestra esquemáticamente en la Figura 6 (C), luego se incubó con la muestra o la curva de calibración según corresponda, y finalmente el anticuerpo anti-ferritina conjugado con peroxidasa

2.12. Ensayo de viabilidad celular.

Células SH-SY5Y diferenciadas fueron expuestas a diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h. La actividad LDH fue determinada espectrofotométricamente como se describe en (Aras y col., 2008). Brevemente, luego de la incubación con aminocromo, se tomo 2 μ L del medio de cada condición y se agregó a la mezcla de reacción compuesta por 283 μ L de 0,1 M de tampón fosfato pH: 7,0, 10 μ L de 23 mM de piruvato de sodio y 5 μ L de 12 mM de NADH. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se lee la absorbancia a 340 nm de longitud de onda.

2.13. Preparación de aminocromo.

El aminocromo fue preparado fresco y utilizado dentro de las siguientes 4 horas después de preparado como se describe en (Paris y col., 2010). Brevemente, 100 μ moles de DA (SIGMA, H8502) junto con 200 ng de tirosinasa (SIGMA, T3824) en 3 mL de tampón 25 mM de MES pH: 6,0, se incubaron por 10 minutos a 25 °C. Luego de la incubación la mezcla se cargó en una columna empacada con CM-Sephadex C-50 (Pharmacia, Sweden), la que se eluyó con tampón 25 mM de MES pH: 6,0. El color característico del aminocromo permitió la identificación del eluido de interés. El eluido recuperado presenta un pico de absorción a 478 nm de longitud de onda que coincide con el de aminocromo.

2.14. Análisis de Datos.

Los datos son presentados como promedio \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA) de un factor. La prueba post-hoc de Dunnett fue usada para comparaciones utilizando el programa InStat GraphPad (San Diego, CA) Valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos.

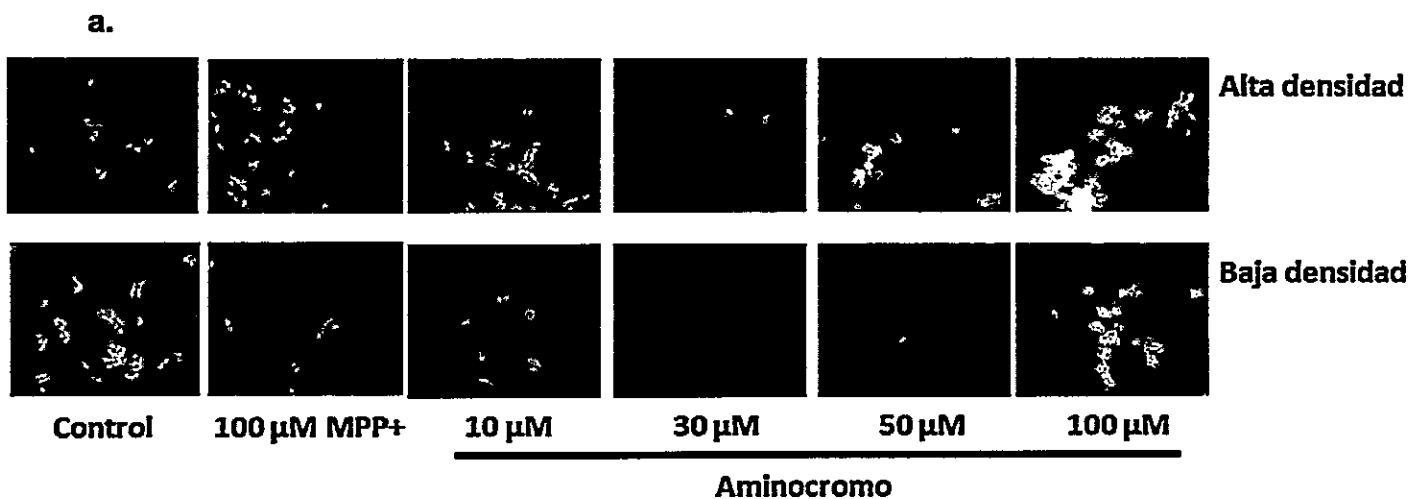
3. RESULTADOS

3.1. Aminocromo disminuye la actividad mitocondrial

3.1.1. Concentraciones de aminocromo sobre 30 μ M aumentan la muerte celular.

En consideración al diseño experimental de los siguientes ensayos, fue necesario evaluar la toxicidad que presentaba el metabolito de la DA aminocromo, al ser aplicado (dentro de las primeras 4 horas de producido), en cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico.

La figura 6a muestra fotografías de una zona de alta densidad de células y una de una zona de baja densidad celular, de células tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h. Sobre 30 μ M de aminocromo se observó una disminución en la densidad celular. Además se observó que el tratamiento con 100 μ M de MPP+ no produjo un aumento notorio de la muerte celular en comparación con la condición control. Estas observaciones fueron verificadas con un ensayo de viabilidad celular (Figura 6b).



b.

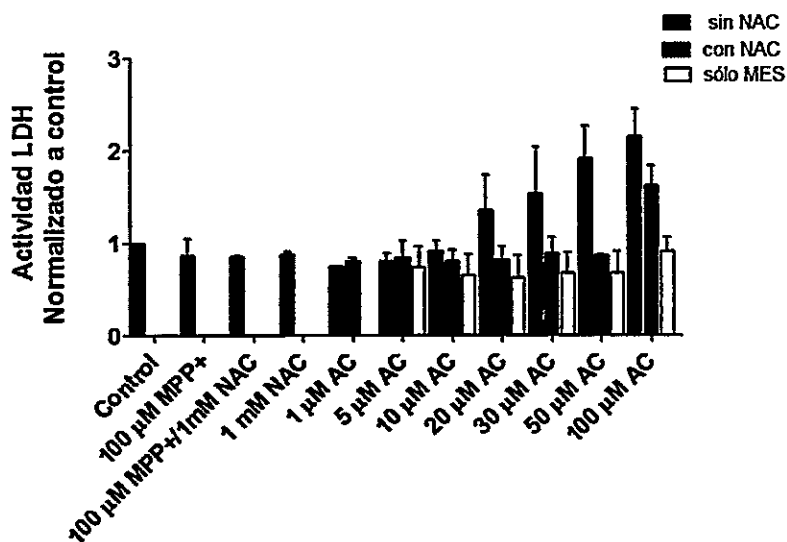


Figura 6. Toxicidad del aminocromo. **a.** Células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico fueron tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h, Podemos ver las fotografías de una zona de alta y baja densidad de células para cada condición. **b.** Viabilidad celular, ensayo de LDH. Células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico fueron expuestas por 20 h a diferentes concentraciones de aminocromo o 100 μ M de MPP+, en ausencia (barras rojas) o presencia de 1 mM de NAC (barras negras). Las barras blancas corresponden a la incubación con tampón MES La actividad LDH en el medio de cultivo fue determinada espectrofotométricamente como se describe (Aras y col., 2008). Los resultados se muestran normalizados respecto al control. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones.

Como se puede ver en la Figura 6b la actividad LDH en el medio de cultivo aumentó a concentraciones mayores de 30 μM de aminocromo, lo que se relaciona con un aumento de la muerte celular (barras rojas). En presencia de 1 mM de NAC (barras negras), solo la concentración 100 μM de aminocromo aumenta la muerte celular. Las barras blancas muestran la incubación de las células con el tampón 25 mM de MES pH: 6,0 (tampón en que se preparó y se eluyó el aminocromo), como control, observándose que no tuvo efecto por si solo en la viabilidad celular.

3.1.2. Aminocromo disminuye la actividad del complejo I mitocondrial.

La DA a concentraciones sub-milimolares, inhibe el complejo IV de la cadena transportadora de electrones y en menor medida inhibe también la actividad del complejo I, en mitocondrias aisladas de cerebro de rata (Khan y col., 2005). Considerando que una de las características de la EP es la disminución de la actividad del complejo I, quisimos evaluar si aminocromo inhibe esta actividad. La incubación de células SH-SY5Y con aminocromo entre 5 y 20 μM por 20 h, resultó en una fuerte inhibición de la actividad del complejo I (Figura 7), la que se puede comparar con la inhibición producida por 100 μM de MPP⁺, una toxina que inhibe la actividad del complejo I (Schapira y col., 1990).

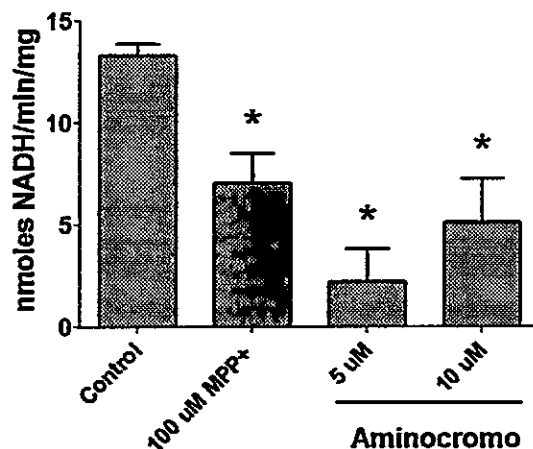


Figura 7. Concentraciones micromolares de aminocromo inhiben la actividad del complejo I mitocondrial, en células SH-SY5Y diferenciadas. Células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico fueron tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h, para luego determinar la actividad del complejo I mitocondrial como se describe en Materiales y Métodos. La actividad del complejo I mitocondrial fue expresada en nmoles/min/mg. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones. * $P < 0,05$ comparados con la condición control.

3.1.3. Aminocromo disminuye los niveles de ATP.

Ya que una disminución en la actividad del complejo I puede dar como resultado una disminución de la producción de ATP, determinamos los niveles de ATP en las células tratadas con aminocromo por 20 h (Figura 8). Se observó que 10 μ M de aminocromo, una concentración que es capaz de inhibir el complejo I, no disminuyó los niveles de ATP, sin embargo el tratamiento con 20 μ M de aminocromo resultó en una disminución significativa. Los tratamientos con los inhibidores del complejo I MPP+ (100 μ M) y rotenona (4 μ M) también mostraron una disminución de los niveles de ATP.

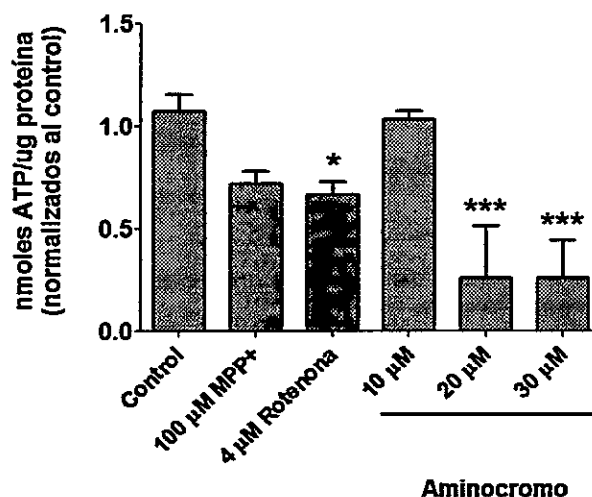


Figura 8. Concentraciones micromolares de aminocromo disminuyen los niveles de ATP en células SH-SY5Y diferenciadas. Células SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico fueron tratadas con diferentes concentraciones de aminocromo por 20 h con inhibidores del complejo I mitocondrial: 100 μM de MPP+ y 4 μM de rotenona, para luego determinar los niveles de ATP como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de ATP se expresaron en nmoles de ATP/ μg de proteína. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparados con la condición control.

3.1.4. La actividad del complejo I mitocondrial disminuye en mitocondrias aisladas tratadas con aminocromo.

La inhibición del complejo I producida por el tratamiento con aminocromo puede ser un efecto directo sobre la cadena transportadora de electrones o un efecto indirecto sobre un blanco intracelular indeterminado que incide en la actividad del complejo I mitocondrial. Para diferenciar entre estas dos alternativas, evaluamos el efecto de aminocromo sobre una preparación fresca de mitocondrias aisladas de hígado de rata (Figura 9). Se detectó una disminución significativa de la actividad del complejo I, después de 10 minutos de incubación con aminocromo. Este resultado sugiere que el aminocromo puede actuar directamente como un inhibidor del complejo I.

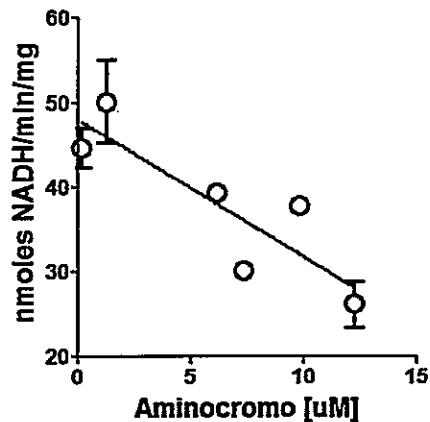


Figura 9. Aminocromo inhibe la actividad de complejo I mitocondrial, en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Una preparación fresca de mitocondrias aisladas de hígado de rata fue incubada con distintas concentraciones de aminocromo por 10 minutos. Luego se determinó la actividad del complejo I mitocondrial como se describe en Materiales y Métodos. Los datos presentan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones.

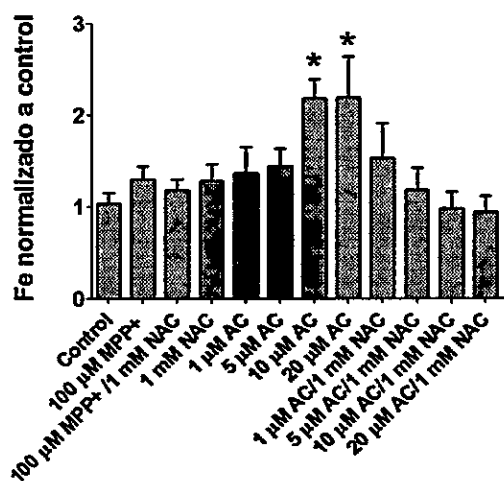
3.2. Aminocromo afecta la homeostasis de Fe

3.2.1. Aminocromo aumenta la incorporación de Fe y el contenido de ferritina.

El aumento de DMT1 y disminución de FPN1 observados podrían resultar en un incremento de la retención de Fe celular. Evaluamos esta posibilidad mediante un ensayo de incorporación de Fe (Figura 10a). Pudimos ver que el tratamiento con aminocromo indujo un aumento de la incorporación de Fe dependiente de la concentración. Este aumento fue totalmente revertido cuando se agregó 1 mM de NAC al medio.

El contenido de ferritina, puede dar cuenta del contenido de Fe de la célula, ya que participa en el almacenamiento del Fe. El tratamiento con aminocromo también indujo un significativo ($P < 0,05$) aumento de la ferritina celular, que en presencia de aminocromo y NAC no fue significativo (Figura 10b).

a



b

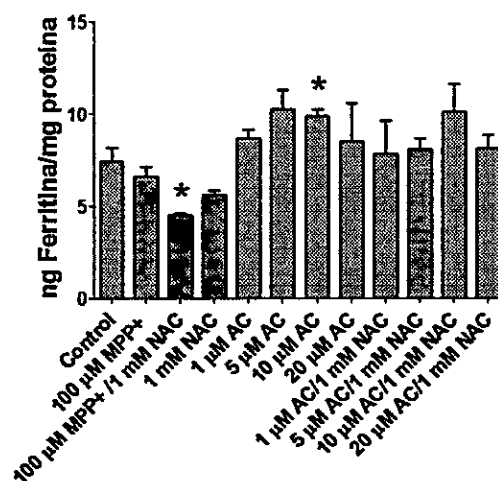


Figura 10. Aminocromo aumenta la incorporación y la acumulación de Fe. a. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron tratadas por 20 h a diferentes concentraciones de aminocromo o 100 μM de MPP+, en ausencia o presencia de 1 mM de NAC. Ensayo de incorporación. Ver Materiales y Métodos. Los datos presentan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones b. Contenido celular de ferritina cuantificado por ELISA. Los datos presentan el promedio \pm SEM de 3 determinaciones. * $P < 0,05$; comparados con la condición control.

3.2.2. Aminocromo aumenta el ARNm de DMT1 y disminuye el ARNm de FPN1.

Ha sido reportado en la literatura un aumento del transportador de entrada de Fe DMT1 en las neuronas de la SNpc en tejido *post mortem* de pacientes con EP y en ratones tratados con MPTP (Salazar y col., 2008). Junto con el incremento de DMT1 ha sido observada una disminución de FPN1 en neuronas de la SN de ratones tratados con MPTP (Lv y col., 2011). Habiendo observado que aminocromo es un inhibidor del complejo I, fue interesante ver si aminocromo podía producir cambios en los transportadores de Fe. Como se muestra en la Figura 11, el tratamiento con aminocromo en células SH-SY5Y diferenciadas aumentó el nivel de ARNm de DMT1 isoforma +IRE y no tuvo un efecto significativo sobre los niveles del ARNm de DMT1 isoforma -IRE. En el caso del transportador de salida de Fe FPN1, el tratamiento con aminocromo resultó en una disminución de sus niveles de ARNm. El tratamiento con 1 mM de NAC inhibe el efecto de MPP+. En el caso del tratamiento con aminocromo, 1 mM de NAC inhibió parcialmente el efecto sobre el ARNm de DMT1 isoforma +IRE, no así el efecto sobre el ARNm de FPN1.

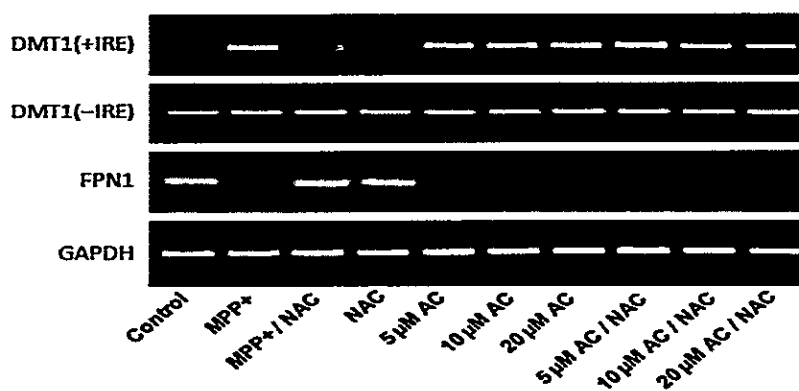
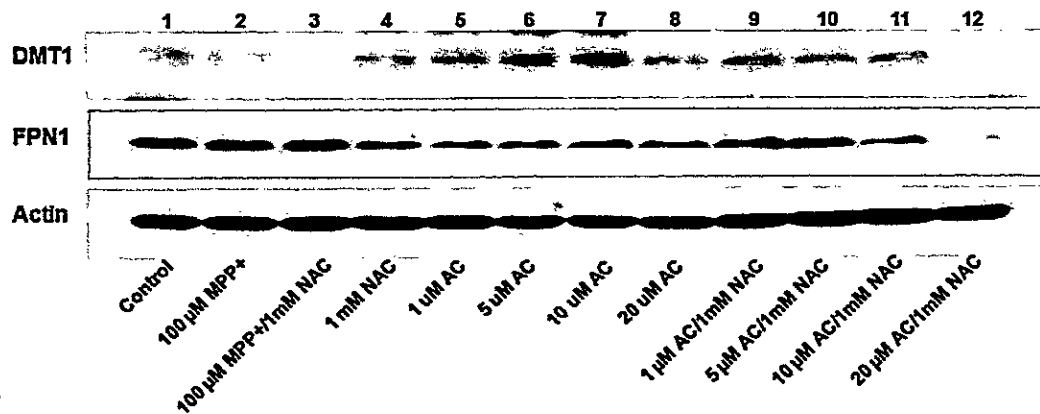


Figura 11. Aminocromo modifica los niveles de ARNm de los transportadores de Fe. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron expuestas por 20 h a diferentes concentraciones de aminocromo o 100 μM de MPP+, en ausencia o presencia de 1 mM de NAC. Se muestra un gel representativo de los cambios en los niveles de ARNm de DMT1 isoforma +IRE, DMT1 isoforma -IRE y FPN1, en los extractos celulares. GAPDH fue utilizado como control de carga.

a.



b.

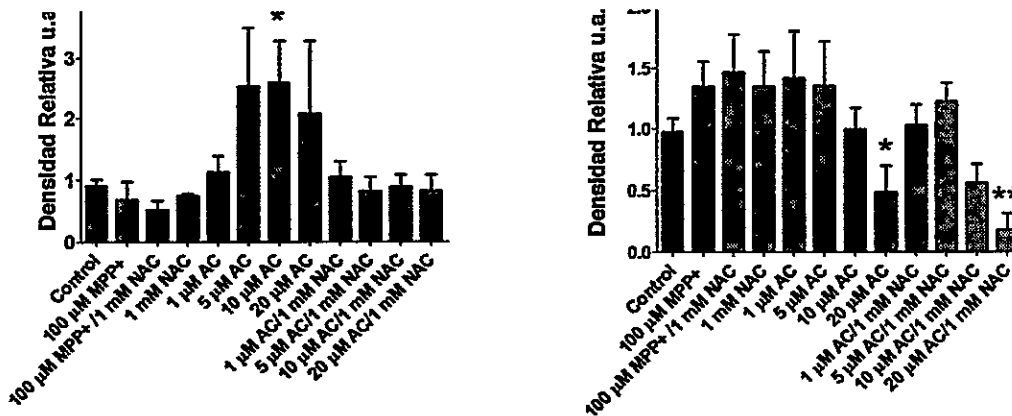


Figura 12. Aminocromo modifica la expresión de los transportadores de Fe. Células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico fueron expuestas por 20 h a diferentes concentraciones de aminocromo o 100 μM de MPP+, en ausencia o presencia de 1 mM de NAC. a. Se muestra un Western blot representativo de los cambios de inmunoreactividad para FPN1, DMT1 en los extractos celulares. β-actina fue utilizado como control de carga. b. Densitometría (cuantificación de la densidad de las bandas) para DMT1. Los datos presentan el promedio ±SEM de 3 determinaciones. c. Densitometría para FPN1. Los datos presentan el promedio ±SEM de 3 determinaciones. *P<0,05; **P<0,01 comparados con la condición control.

3.2.3. Aminocromo aumenta los niveles de expresión de DMT1 y disminuye los de FPN1.

Los niveles de proteína también se vieron afectados por el tratamiento con aminocromo (Figura 13a), se observó un aumento de DMT1 y una disminución de FPN1. La densitometría de las bandas observadas por Western blot, mostró un aumento significativo de DMT1 (Figura 12b), que puede ser revertido por la presencia de 1 mM de NAC

Estos resultados, apoyan un modelo en el cual la inhibición del complejo I mitocondrial producida por aminocromo, resulta en un cambio en la expresión de los transportadores de Fe, lo que favorece la acumulación de Fe en la célula.

4. DISCUSIÓN

La acumulación de Fe, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la agregación de proteínas y la disfunción de la actividad proteosomal, son eventos patognomónicos de la EP (Altamura y Mckenthaler 2009; Schapira y Jenner 2011). La neurotoxina MPTP, un conocido inhibidor del complejo I mitocondrial (Dauer y Przedborski, 2003), es capaz de producir muerte de las neuronas de la SNpc y síntomas de parkinsonismo en primates (Iravani y col., 2005). Por esto, es posible que la disminución de la actividad del complejo I sea un evento inicial en la muerte neuronal observada en la EP. En este trabajo reportamos la capacidad de aminocromo de inhibir el complejo I mitocondrial y causar una pérdida de la homeostasis del hierro que resulta en la acumulación de este metal.

Toxinas que inhiben la actividad del complejo I utilizadas como pesticidas (rotenona y paraquat por ejemplo) también pueden generar la enfermedad, lo que se ha observado en una alta incidencia de EP en temporeros (Gorell y col., 1998; Pan-Montojo y col., 2010). Nosotros encontramos que aminocromo es capaz de inhibir la actividad del complejo I aplicado a la célula completa y a mitocondrias aisladas. De acuerdo con esta inhibición, también encontramos que aminocromo indujo la disminución de los niveles de ATP. Por lo que aminocromo puede ser considerado una toxina endógena a concentraciones mayores a 5 μ M aplicadas a nuestro sistema.

El exceso de Fe es considerado un evento común en muchas enfermedades neurodegenerativas, como la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la neuroferrinopatía y la EP (Kell 2010). En particular, en la EP,

neuronas y microglías muestran una marcada acumulación de Fe que ha sido atribuida a un incremento en la expresión de DMT1 (Salazar y col., 2008; Lv y col., 2011) y a una disminución de la expresión de FPN1 (Song y col., 2010). En esta investigación encontramos que el tratamiento con aminocromo aumentó la expresión de DMT1 a la vez que disminuyó la expresión de FPN1, a nivel tanto de ARNm como de proteína, en células SH-SY5Y diferenciadas. De acuerdo con estos resultados, encontramos que las células tratadas con aminocromo incorporan más Fe y expresan altos niveles de ferritina, en comparación con las células no tratadas. El tratamiento con el antioxidante NAC neutraliza el efecto de aminocromo. Estos resultados apoyan la idea de que aminocromo a concentraciones micromolares puede actuar como una toxina endógena que mediante modificaciones oxidativas afecta los niveles de los transportadores de Fe, DMT1 y FPN1 que resultan en un aumento del contenido de hierro intracelular.

El Fe puede inducir la oxidación de DA, llevando a la producción de quinonas reactivas derivadas de DA, que pueden producir daño en las células vía conjugación covalente con proteínas funcionales más que por modificaciones oxidativas (Zhou y col., 2010). También se ha reportado que la DA y las quinonas derivadas de la DA, pueden causar inhibición del proteasoma, depolarización de la membrana mitocondrial y disminución de la fosforilación oxidativa, que no puede ser revertido en presencia de atrapadores de radicales libres, catalasa o quelantes de Fe, indicando que las ROS no están directamente implicadas en este proceso. Por otro lado, GSH y NAC previenen estos efectos presumiblemente por su función atrapadora de quinonas (Jana et al. 2011). Nosotros evaluamos la generación de ROS utilizando la sonda fluorescente H₂DCF (Molecular Probes, Invitrogen) (datos no mostrados) y no pudimos detectar aumento de ROS en nuestro sistema de células SH-

SY5Y diferenciadas a fenotipo dopaminérgico tratadas con aminocromo. Estos resultados están de acuerdo con evidencia que indica que el aumento del daño oxidativo es debido al aumento de semiquinonas redox-activas no son detectables por H₂DCF (Zhou y col., 2010).

Ya que la inhibición del complejo I resulta en una disminución de la síntesis de los núcleos Fe-S y en una activación constitutiva de IRP1 (Mena y col., 2011), es posible que aminocromo produzca cambios en la expresión de los transportadores de Fe, DMT1 y FPN1 vía activación IRP1. En la Figura 13 se observa un modelo que integra nuestros resultados.

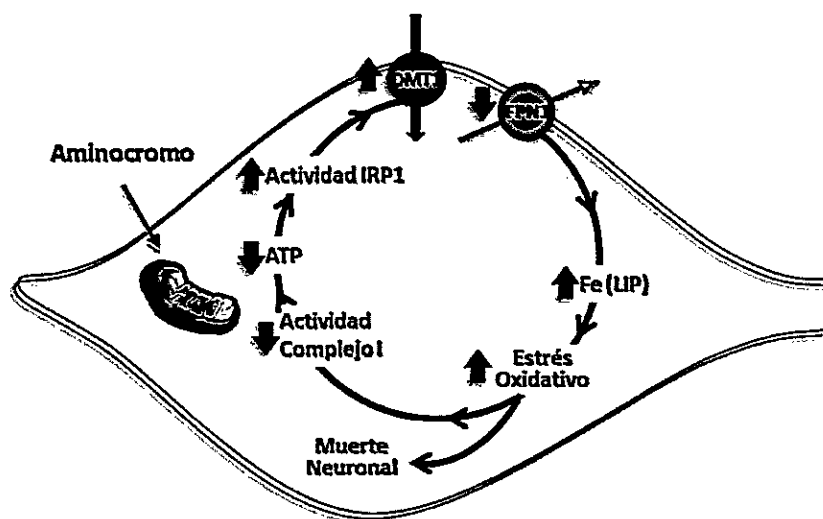


Figura 13. Modelo de neurotoxicidad de aminocromo. La inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial producida por aminocromo resulta en la disminución de los niveles de ATP, la activación de IRP1 por falla en la síntesis de núcleos Fe-S, lo que resulta en un incremento en la expresión de DMT1 y una disminución de FPN1, lo que finalmente produce un aumento en la incorporación y la acumulación de Fe. Estos eventos llevan al aumento del tono oxidativo. El aumento del tono oxidativo podría reducir los niveles de glutatión reducido (no mostrado) lo que inhibiría adicionalmente la actividad del complejo I mitocondrial. La generación de este circuito de retroalimentación positiva podría llevar a la muerte celular.

Este modelo da cuenta de los cambios en la expresión de los transportadores. Para explicar los cambios que se observan a nivel de mensajeros se requieren más estudios.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que aminocromo, un metabolito de la oxidación de DA, precursor de la neuromelanina, a concentraciones micromolares:

- Inhibe el complejo I mitocondrial. Esto fue observado tanto en cultivos de células SH-SY5Y tratados , como en mitocondrias aisladas.
- Disminuye los niveles de ATP, efecto similar al producido por los inhibidores del complejo I MPP+ y rotenona.
- Induce un aumento en la incorporación y la acumulación de Fe, consistente con el observado aumento de la expresión de DMT1 y la disminución de FPN1.

Los resultados de este trabajo apoyan el rol de aminocromo como toxina endógena que inhibe la actividad mitocondrial afectando la homeostasis de Fe induciendo su acumulación.

6. REFERENCIAS

Altamura S, Muckenthaler MU (2009) Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis* 16 (4):879-895.

Aras MA, Hartnett KA, Aizenman E (2008) Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Curr Protoc Neurosci Chapter 7:Unit 7 18*.

Arredondo M, Orellana A, Garate MA, Nunez MT (1997) Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol* 273 (2 Pt 1):G275-280

Bulteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI (2003) Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42 (50):14846-14855.

Crichton RR, Dexter DT, Waed RJ (2011) Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *J Neural Transm Mar*;118(3):301-14. Epub 2010.

Dauer and Przedborski. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* vol. 39 (6) pp. 889-909

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, Gallego C, Comella JX (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 75 (3):991-1003

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50 (5):1346-1350

Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. (2001)Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*. Sept-Nov;52(3-5):135-41. Review

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jul;27(1-2):146-59.

Iravani MM, Syed E, Jackson MJ, Johnston LC, Smith LA, Jenner P (2005) A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. *Eur J Neurosci* 21 (4):841-854.

Jana S, Maiti AK, Bagh MB, Banerjee K, Das A, Roy A, Chakrabarti S (2007) Dopamine but not 3,4-dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC) inhibits brain respiratory chain activity

by autoxidation and mitochondria catalyzed oxidation to quinone products: implications in Parkinson's disease. *Brain Res* 1139:195-200.

Jana S, Sinha M, Chanda D, Roy T, Banerjee K, Munshi S, Patro B, Chakrabarti S. (2011) / Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease *Biochimica et Biophysica Acta* 1812:663-673

Kell DB (2010) Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol* 84 (11):825-889.

Khan FH, Sen T, Maiti AK, Jana S, Chatterjee U, Chakrabarti S (2005) Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1741 (1-2):65-74.

Langston JW, Ballard PA Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*; 309(5): 310.

Langston JW (1985) MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci* 36 (3):201-206

Lv Z, Jiang H, Xu H, Song N, Xie J (2011) Increased iron levels correlate with the selective nigral dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 118 (3):361-369.

Marsden CD (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 19:121-41.

Mena NP, Bulteau AL, Salazar J, Hirsch EC, Nunez MT (2011) Effect of mitochondrial complex I inhibition on Fe-S cluster protein activity. *Biochem Biophys Res Commun* 409 (2):241-246.

Nussbaum RL, Ellis CE (2003) Alzheimer disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 348(14):1356-64.

Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. (1987).MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci.* 1987 40(8):721-9.

Olanow, C.W. (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord.* 22 Suppl 17:S335-42.

Pan-Montojo F, Anichtchik O, Denning Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RH (2010) Progression of Parkinson's disease

pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5 (1):e8762.

Paris I, Perez-Pastene C, Cardenas S, Iturriaga-Vasquez P, Munoz P, Couve E, Caviedes P, Segura-Aguilar J (2010) Aminochrome induces disruption of actin, alpha-, and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra-derived cell line. *Neurotox Res* 18 (1):82-92.

Paris I, Lozano J, Perez-Pastene C, Muñoz P, Segura-Aguilar J (2009) Molecular and Neurochemical Mechanism in PD Pathogenesis. *Neurotox Res* 16:271-279. 2009.

Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, Duyckaerts C, Sazdovitch V, Zhao L, Garrick LM, Nunez MT, Garrick MD, Raisman-Vozari R, Hirsch EC (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (47):18578-18583.

Scotcher, K.P., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, J.W., Di Monte, D. (1990) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes. *J Neurochem.* 54(4):1295-301.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54 (3):823-827.

Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26 (6):1049-1055.

Sherer TB, Betabert R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT.(2003) *J Neurosci* 23(34):10756-64.

Song N, Wang J, Jiang H, Xie J (2010) Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 48 (2):332-341.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor J and Crichton (2004) Iron, brain and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 863-873.

Zho Zhou ZD, Lan YH, Tan EK, Lim TM. 2010 Iron species-mediated dopamine oxidation, proteasome inhibition, and dopaminergic cell deminse: Implications for iron-related dopaminergic neuron degeneration. *Free Radical Biology & Medicine* 49 (2010) 1856-1871.