

UCH-FC'

Doc-BMCN

U 829

C.1

**LA EXPRESION DE HEPCIDINA Y SU PAPEL EN
LA MODULACION DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL**

Tesis

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

**Doctor en Ciencias Mención Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

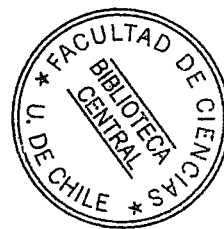
Facultad De Ciencias

Por

Pamela J. Urrutia Vargas

Octubre, 2015

Director de Tesis Dr: Marco Tulio Núñez



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

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

PAMELA J. URRUTIA VARGAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 01 de Octubre del año 2015.

Director de Tesis:
Dr. Marco Tulio Núñez

Co-Director de Tesis
Dr. Christian González-Billault

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth

Dra. María Rosa Bono

Dr. Pablo Caviedes

Dr. Nivaldo Inestrosa



Three signatures in blue ink, corresponding to the members of the Evaluation Commission: Alejandro Roth, María Rosa Bono, and Pablo Caviedes.

Dedicada a Daniel

5



Mi nombre es Pamela Urrutia, nací en Santiago el 16 de diciembre de 1984. Mis estudios de enseñanza básica los realice en la escuela superior de niñas DN°20 en estación central. Mis estudios de enseñanza media los realice en el liceo 7 de niñas de providencia, fue en este lugar donde me enamore de la biología y las ciencias. En el año 2003 entre al programa de bachillerato de la Universidad de Chile, aun sin tener clara mi vocación. Al finalizar mi primer año de bachillerato y motivada por mi papá, definí el rumbo a cursar. En el año 2005 entre a la carrera Ingeniería en Biotecnología molecular de la Universidad de Chile, convencida en dedicarme mi vida y energía a la investigación. El año 2008 entre a trabajar en el laboratorio del hierro y biología del envejecimiento, en donde realice mi memoria de título. En el año 2010 ingrese al programa de doctorado en ciencias mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias de la Universidad de Chile, realizando mi tesis doctoral en el mismo laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Doctor Marco Tulio Núñez por recibirme en su laboratorio, por ser mi guía y tutor. Por sus palabras de apoyo frente a los fracasos, por permitirme siempre realizar investigación libremente y por la enorme confianza depositada en mi.

A mi co-tutor, el Dr. Christian González-billault por su enorme disposición en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr Etienne Hirsch, Jefe del laboratorio de Neurodegeneración, del Hospital de Salpetriere en Paris, Francia por todo el apoyo en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Quiero agradecer a las personas del laboratorio de Biología del envejecimiento. Entre ellas a Pabla y Vicky por su enorme paciencia. A Alexis por ser mi maestro y gran amigo. A Andrés por tener la paciencia de escucharme en mis delirios experimentales. A Natalia por ser una gran guía, gran científica y gran amiga. Al “niño” Carlos por transmitirme siempre mucha tranquilidad y a Carlitos por alegrarme las mañanas y por prepararme el material que necesitaba.

Quiero agradecer a Daniel que ha sido mi pilar en momentos de debilidad, además por su paciencia y comprensión.

A mis amigas y amigo de bachillerato Naty, Nai, Karen, Jani, Yasni y Eric quienes siempre me han apoyado en todo.

A mis compañeros de Doctorado Mario, Victor, Diego, Felipe, Daniel y Max por incluirme siempre ya que era la única mujer en esa generación.

A mis compañeros de carrera Gaby, Bea, Chica, Sonia, Vale, Fran y Mati.

A mis amigas de danza árabe Marce, Pau, Cata y Lolo. Con ellas he liberado tensiones y superado frustraciones.

Finalmente a mi familia, mi mama Inés, mi papa Manuel y mis hermanos y hermana Fernando, Manuel, Ariel y Fabiola por siempre creer en mi.

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes bibliográficos	1
1.1.1 <i>Enfermedad de Alzheimer</i>	1
1.1.2 <i>Inflamación en la enfermedad de Alzheimer</i>	5
1.1.3 <i>Rol del hierro en la enfermedad de Alzheimer</i>	10
1.1.4 <i>Relación entre la inflamación y el hierro</i>	15
1.1.5 <i>Hepcidina como regulador maestro de la homeostasis de hierro</i>	19
1.1.6 <i>Hepcidina como modulador de la respuesta inflamatoria</i>	21
1.1.7 <i>Hepcidina en el sistema nervioso central</i>	22
1.2 Hipótesis de trabajo	25
1.3 Objetivo general	25
1.4 Objetivos específicos	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Materiales	27
2.1.1 <i>Reactivos generales y péptidos</i>	27
2.1.2 <i>Material biológico</i>	27

<i>2.1.3 Cultivo celular</i>	27
<i>2.1.4 Anticuerpos</i>	28
<i>2.1.5 Sondas fluorescentes</i>	29
<i>2.1.6 Equipos</i>	29
<i>2.1.7 Partidores</i>	29
2.2 Métodos	30
<i>2.2.1 Cultivos Primarios</i>	30
<i>2.2.2 Preparación de péptido beta-amiloide</i>	32
<i>2.2.3 Tratamientos</i>	32
<i>2.2.4 Histoquímica redox</i>	33
<i>2.2.5 Inmunocitoquímica</i>	34
<i>2.2.6 Determinación de la producción de ROS intracelular</i>	34
<i>2.2.7 Determinación de viabilidad</i>	35
<i>2.2.8 Western blot</i>	35
<i>2.2.9 RT-PCR</i>	37
<i>2.2.10 Detección de citoquinas</i>	38
<i>2.2.11 Inyecciones estereotáxicas</i>	39

2.2.12	<i>Inmunofluorescencia</i>	41
2.2.13	<i>Inmunohistoquímica</i>	42
2.2.14	<i>Programas utilizados</i>	42
2.2.15	<i>Análisis estadístico</i>	42
3.	RESULTADOS	44
3.1	<i>Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF-α en la expresión de DMT1, FPN1 y hepcidina en neuronas, astrocitos y microglías.</i>	44
3.2	<i>Efecto de hepcidina en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- inducida por el péptido β-amiloide en cultivos de astrocitos o microglías</i>	62
3.3	<i>Efecto en el estrés oxidativo y muerte de neuronas expuestas a medios condicionados por glías tratadas con el péptido β-amiloide y/o hepcidina</i>	66
3.4	<i>Efecto de hepcidina en la activación glial, estrés oxidativo y dishomeostasis de hierro en cerebros inyectados con péptido β-amiloide</i>	72
4.	DISCUSIÓN	84
4.1	<i>Relación entre la inflamación y la homeostasis de hierro.</i>	85
4.2	<i>Rol de hepcidina en la homeostasis de hierro</i>	93

4.3	<i>Rol de hepcidina en la modulación de la respuesta inflamatoria mediada por el péptido Aβ₁₋₄₂</i>	98
5.	CONCLUSIONES	107
6.	BIBLIOGRAFIA	109

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP).	3
Figura 2. Componentes inflamatorios en la Enfermedad de Alzheimer.	6
Figura 3. Inyección intracerebroventricular de Cy3-beads.	39
Figura 4. Protocolo de administración de sustancias.	40
Figura 5. Inmunocitoquímica de cultivos primarios enriquecidos en neuronas, astrocitos o microglías.	44
Figura 6. TNF-α, IL-6 y LPS inducen cambios en los niveles de proteína de los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC.	46
Figura 7. Expresión de DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC tratadas con TNF-α, IL-6 y LPS visualizadas por inmunocitoquímica.	47
Figura 8. TNF-α, IL-6 y LPS inducen cambios en los niveles de ARNm de los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC.	48
Figura 9. Estímulos inflamatorios inducen cambios en el contenido intracelular de hierro.	49
Figura 10. Estímulos inflamatorios inducen la expresión de hepcidina en astrocitos y microglías.	51

Figura 11. Dependencia del tiempo y la concentración de la disminución de FPN1 mediada por hepcidina en células derivadas del sistema nervioso central.	53
Figura 12. Hepcidina induce cambios en FPN1 en células derivadas del SNC	55
Figura 13. Inmunodetección de FPN1 y DMT1 en células derivadas del SNC tratadas con hepcidina.	56
Figura 14. TNF-α, IL-6 y LPS inducen cambios en el tono redox de neuronas hipocampales.	58
Figura 15. TNF-α, IL-6 y LPS inducen cambios en el tono redox de neuronas hipocampales.	59
Figura 16. TNF-α, IL-6 y LPS potencian la producción de ROS Generada por hierro en neuronas hipocampales.	61
Figura 17. Hepcidina reduce la expresión de TNF-α e IL-6 desde astrocitos tratados con el péptido Aβ.	63
Figura 18. Hepcidina reduce la expresión de TNF-α e IL-6 desde Microglías tratadas con el péptido Aβ.	65
Figura 19. Hepcidina reduce el daño oxidativo en neuronas Hipocampales incubadas con el medio condicionado por astrocitos tratados con el péptido Aβ.	68

Figura 20. Hecidina reduce el daño oxidativo en neuronas hipocampales incubadas con el medio condicionado por microglías tratadas con el péptido Aβ.	70
Figura 21. Hecidina reduce la expresión de GFAP inducida por la inyección del péptido Aβ.	74
Figura 22. Hecidina disminuye el número de microglías en cerebros de ratones inyectados con péptido Aβ.	76
Figura 23. Hecidina reduce la activación de microglías en cerebros de ratones inyectados con péptido Aβ.	77
Figura 24. Hecidina reduce el estrés oxidativo inducido por la inyección de péptido Aβ.	79
Figura 25 Hecidina disminuye la expresión de FPN1 en cerebros de ratones inyectados con péptido Aβ.	81
Figura 26. Hecidina disminuye la expresión de DMT1 en cerebros de ratones inyectados con péptido Aβ.	82
Figura 27. Cinética de la actividad de NF-kB mediada por ROS.	102
Figura 28. Representación esquemática de la relación entre la inflamación y la acumulación de hierro en la enfermedad de Alzheimer	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los partidores utilizados en el estudio.	30
Tabla 2. Condiciones de PCR realizados.	38
Tabla 3. Grupos experimentales.	41

ABREVIATURAS

A β	:	β -amiloide
AD	:	Enfermedad de Alzheimer
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	ADN complementario
APP	:	Proteína precursora del amilide
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	ARN mensajero
BSA	:	Albumina de suero bovino
DEPC	:	Dietyl pirocarbonato
DMT1	:	Transportador de metales divalentes
dNTPs	:	Desoxinucleotidos trifosfato
DTT	:	Ditiotreitol.
EA	:	Enfermedad de Alzheimer
EP	:	Enfermedad de Parkinson
Fe	:	Hierro
FPN1	:	Ferroportina
Ft	:	Ferritina
HIF	:	Factor inducible por hipoxia
IL	:	Interleuquina

iNOS	:	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRE	:	Elemento de respuesta a hierro
IRF	:	Factor de respuesta a interferón
IRP	:	Proteína regulatoria del hierro
M-MLV	:	Moloney Murine Leukemia Virus
MTF	:	Factor de transcripción de metales
NAC	:	N-acetilcisteína
NADPH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	:	Factor nuclear kappa B
NO	:	Óxido nítrico
NOX	:	NADPH oxidasa
PBS	:	Solución tampón salino de fosfato
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PHF	:	Filamentos helicoidales pareados
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno
SNC	:	Sistema nervioso central
Tf	:	Transferrina
TfR	:	Receptor de transferrina
TLR	:	Receptor de tipo toll
TNF	:	Factor de necrosis tumoral
UPR	:	Respuesta a proteínas mal plegadas

4-HNE : 4-hidroxi-2-nonenal

RESUMEN

Dos características relevantes en múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, son la inflamación y la acumulación de hierro en neuronas y microglías. Consecuentemente, el estudio de la asociación entre la inflamación y la acumulación de hierro en células del sistema nervioso central es relevante para entender la contribución de esos procesos en la progresión de la muerte neuronal. En esta tesis, se probó la hipótesis de que ambos fenómenos se encuentran interconectados, siendo la inflamación un inductor de acumulación de hierro. Para ello se analizó el efecto de citoquinas pro-inflamatorias sobre la expresión de proteínas asociadas a la homeostasis de hierro como DMT1, FPN1 y hepcidina, así como también su efecto sobre el contenido de hierro de neuronas, astrocitos y microglías. En paralelo se analizó el efecto de hepcidina sobre la homeostasis de hierro y se evaluó un nuevo rol de hepcidina como modulador de la respuesta inflamatoria inducida por el tratamiento con el péptido A β . Se determinó que TNF- α , IL-6 o LPS inducen un incremento de la expresión de DMT1 y una disminución de la expresión de FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías. Estos cambios conllevaron a un incremento en el contenido celular de hierro solamente en neuronas y microglías. Adicionalmente, TNF- α , IL-6 y LPS indujeron un incremento en la oxidación de grupos tioles y potenciaron en neuronas la generación de ROS producidas por el tratamiento con hierro. Se encontró que TNF- α , IL-6 o LPS inducen la expresión de hepcidina en astrocitos y microglías pero no así en neuronas. A su vez, el tratamiento con hepcidina redujo la expresión de FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías e incrementó la expresión de DMT1 en microglías,

potenciando la acumulación de hierro. Con respecto a su rol anti-inflamatorio, se observó que el pre-tratamiento con hepcidina redujo la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en astrocitos y microglías tratados con el péptido A β . El pretratamiento con hepcidina también redujo la toxicidad sobre neuronas de medios condicionados obtenidos desde astrocitos y microglías tratadas con A β . Esta actividad fue corroborada *in vivo*, ya que la inyección estereotáxica intracerebral de hepcidina redujo la activación glial, el daño oxidativo, el aumento de DMT1 y la acumulación de hierro en ratones co-inyectados con péptido A β . Los datos obtenidos en este trabajo sustentan la idea de una relación causal entre la inflamación y la acumulación de hierro, así como también un nuevo rol de hepcidina en la modulación de los procesos inflamatorios. Debido a que el hierro redox-activo produce el altamente dañino radical hidroxilo, la acumulación de hierro generada por los estímulos inflamatorios podría contribuir a la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas que tienen un componente inflamatorio.

ABSTRACT

Inflammation and iron accumulation are pathognomonic signs in a variety of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. Consequently, the study of a putative association between inflammation and iron accumulation in central nervous system cells is relevant in order to understand the contribution of these processes to the progression of neuronal death. In this thesis, we tested the hypothesis that both phenomena are linked, with inflammation acting as an inducer of iron accumulation. To this end, we analyzed the effect of inflammatory cytokines on the expression of the iron homeostasis associated proteins DMT1, FPN1 and hepcidin as well as their impact on cell iron content in neurons, astrocytes and microglia. In addition, we evaluated the effect of hepcidin on brain iron homeostasis, and its new role as a modulator of the inflammatory response induced by the A β peptide in astrocytes and microglia. We found that exposure of neurons, astrocytes and microglia to TNF- α , IL-6 or LPS resulted in increased DMT1 expression and decreased FPN1 expression. These changes lead to an increase in cellular iron content in neurons and microglia, but not in astrocytes. In addition, exposure of neurons to TNF- α , IL-6 and LPS increased the oxidation of thiol groups and enhanced the generation of ROS. We found that TNF- α , IL-6 or LPS induced hepcidin expression in astrocytes and microglia but not in neurons. In turn, hepcidin treatment reduced FPN1 expression in neurons, astrocytes and microglia and increased DMT1 expression in microglia, enhancing iron accumulation in these cells. Regarding the anti-inflammatory role of hepcidin, we observed that pre-treatment with hepcidin reduced the expression and secretion of TNF- α and IL-6 in astrocytes and microglia

treated with A β peptide. Additionally, hepcidin reduced neurotoxicity generated by treatment with the conditioned media obtained from astrocytes and microglia treated with A β . This protective activity was confirmed in vivo. Stereotaxic intracerebral injection of hepcidin reduced glial activation, oxidative damage and iron accumulation triggered by A β injection in mice. Overall, the data presented in this thesis support a causal relationship between inflammation and neuronal iron accumulation, as well as a new role for hepcidin in modulating inflammatory processes. Given that redox-active iron produces the highly damaging hydroxyl free radical, iron accumulation induced by inflammatory stimuli could contribute to the progression of neurodegenerative diseases that have an inflammation component.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes bibliográficos

¶

1.1.1. *Enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia a nivel mundial. Se estima que afecta a aproximadamente un 1% a 3% de la población menor a los 65 años de edad y aumentando hasta 30% a 50% en los mayores de 85 años. (<http://www.alz.org>).

La EA clínicamente se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y otras habilidades cognitivas, siendo la principal causa de demencia (<http://www.alz.org>). Las características neuropatológicas distintivas incluyen la pérdida de sinapsis y una muerte neuronal selectiva, principalmente de neuronas glutamatérgicas así como algunas neuronas colinérgicas y adrenérgicas. Las regiones afectadas incluyen la capa II de la corteza entorinal, las capas piramidales del hipocampo y ciertas áreas de la neocorteza frontal, temporal y parietal (Holtzman y cols. 2011). Adicionalmente, la característica histopatológica distintiva es la presencia de agregados proteicos llamados placas seniles (Glennner y Wong 1984a, Glennner y Wong 1984b, Masters y cols. 1985) y ovillos neurofibrilares (Ballatore y cols. 2007, Braak y Braak 1998). Las placas seniles son agregados proteicos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$, por amyloid β), mientras que los ovillos neurofibrilares constituyen agregados

intracelulares de la proteína tau denominados filamentos helicoidales pareados (PHFs, por Paired Helical Filaments).

La etiología de la enfermedad aun es desconocida, pero se ha propuesto que el evento inicial sería un incremento en la generación y agregación de péptido A β , el cual desencadenaría cambios celulares produciendo finalmente la agregación de la proteína tau y la muerte celular. Esta teoría es conocida como la “hipótesis de la cascada del amiloide” (Hardy y Selkoe 2002, Hardy 2009, Masters y Beyreuther 2006).

El péptido A β es producido a través de la proteólisis de una proteína de mayor tamaño denominada proteína precursora del amiloide (APP, por amyloid precursor protein). La APP es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 110 a 130 kDa y se piensa que regula el desarrollo, supervivencia y reparación neuronal (Turner y cols. 2003, Priller y cols. 2006). Su expresión es regulada durante el desarrollo (Small y cols. 1992, Lee y Cole 2007) e incrementándose durante la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas (Clarris y cols. 1995). La APP *in vivo* puede ser procesada a través de 2 rutas: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica (Figura 1). En la vía no amiloidogénica, la APP es cortada por 2 proteasas denominadas secretasas. El primer corte lo realiza la α -secretasa, generando un fragmento soluble α -APP (sAPP α). El fragmento C-terminal restante denominado C83, posteriormente es cortado por el complejo de la γ -secretasa liberando el fragmento P3, el cual se ha descrito que no posee toxicidad (Nunan y Small 2000). En la vía amiloidogénica, la APP es procesada por la β -secretasa, también denominada BACE1, generando un fragmento soluble de la APP (sAPP β) y un

fragmento C-terminal denominado C99. Este fragmento es posteriormente cortado por la γ -secretasa generando así el $A\beta_{1-40}$ y/o el $A\beta_{1-42}$ (Haass y Selkoe 2007). El $A\beta$ tiende a agregarse (especialmente la especie $A\beta_{1-42}$) (Yan y Wang 2006) formando oligómeros, fibrillas y/o placas (Benseny-Cases y cols. 2012).

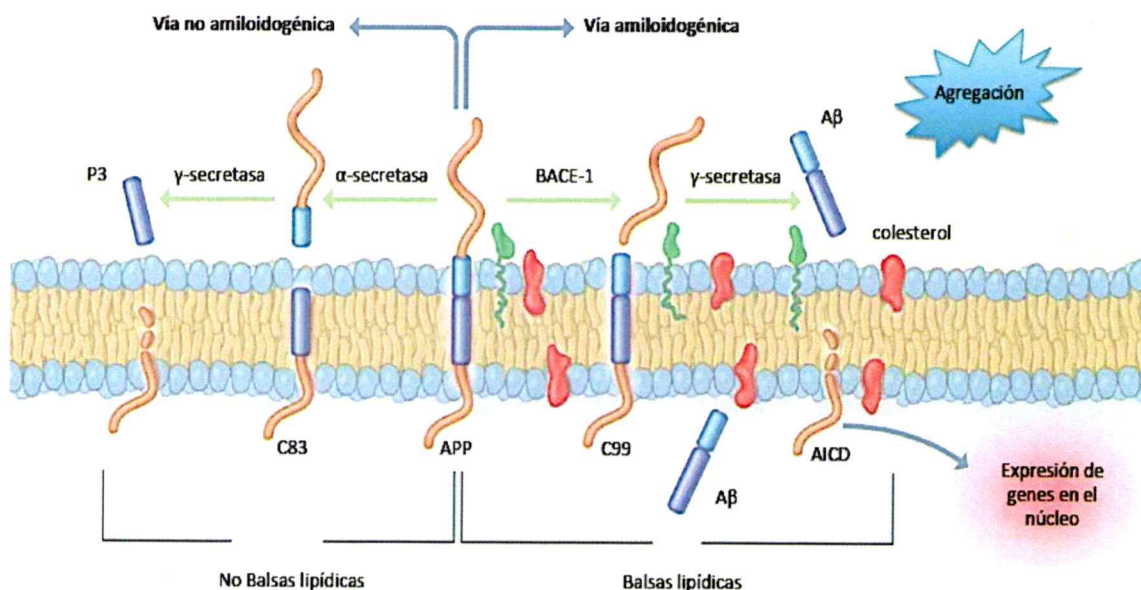


Figura 1. Esquema del procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP). La escisión por la α -secretasa en el interior de la proteína inicia el procesamiento no amiloidogénico de la APP. Se libera un ectodominio de la APP llamado $sAPP\alpha$, dejando un fragmento carboxi-terminal de 83 residuos. C83 luego es digerido por la γ -secretasa, liberando el fragmento p3 al medio extracelular y un dominio intracelular de la APP (AICD). El procesamiento amiloidogénico se inicia por el corte de la APP por β -secretasa, lo que genera el $sAPP\beta$ y un fragmento remanente C99 que también es sustrato de la γ -secretasa. El corte por la γ -secretasa se produce dentro de la membrana celular “proteólisis intramembranosa regulada” y genera el $A\beta$ y el AICD. AICD se dirige al núcleo y regula la expresión génica, mientras que el $A\beta$ en el medio extracelular inicia su agregación. Modificado de (Querfurth y LaFerla 2010).

En 1990 Yankner y colaboradores propusieron que el $A\beta$ posee un rol dual en el cerebro, ya que ejerce una acción neurotrófica en la diferenciación de neuronas, mientras que a altas concentraciones causala degeneración de neuronas maduras (Yankner y cols.

1990). Adicionalmente se ha reportado que concentraciones bajas de A β pueden estimular la liberación pre-sináptica de neurotransmisores excitatorios como aspartato y glutamato, mientras que concentraciones altas inhiben dicho proceso (Mura y cols. 2012). En humanos, las concentraciones en el líquido cerebroespinal (CSF) de A β_{1-40} y A β_{1-42} son de alrededor de 1500 and 200 pM respectivamente (Giedraitis y cols. 2007). Estas se han visto incrementados en pacientes con deterioro cognitivo leve que progresaron a EA (Williams y cols. 2011a).

Una de las evidencias mas importantes sobre el rol patogénico del A β , es que mutaciones de la APP o las presinilinas (componentes del complejo de la γ -secretasa) que generan un incremento en la producción de A β , se encuentran asociadas con formas familiares de EA (Bagyinszky y cols. 2014, Piaceri y cols. 2013). Adicionalmente ratones transgénicos que posee sobreexpresan las proteínas humanas mutadas desarrollan características neuropatológicas similares a la EA (Oddo y cols. 2003b, Oddo y cols. 2003a, LaFerla y Oddo 2005). También se ha demostrado que la administración de A β intracerebralmente en animales (Morimoto y cols. 1998, Ruiz-Munoz y cols. 2011, Tsukuda y cols. 2009, Perez-Severiano y cols. 2004, Kim y cols. 2004) o en neuronas en cultivo (Bruce y cols. 1996, Busciglio y cols. 1993, Harris y cols. 1995) produce neurotoxicidad.

El efecto neurotóxico del A β se ha asociado a una disminución de la actividad mitocondrial (Shearman y cols. 1994), a un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno(ROS, por reactive oxygen species) (Behl y cols. 1994), a un

incremento en las concentraciones de calcio intracelular (Mattson y cols. 1993, Pike y cols. 1993), potencia la excitotoxicidad de aminoácidos excitatorios (Mattson y cols. 1992), incrementa la actividad enzimática de las fosfolipasas A2, C y D (Kanfer y cols. 1998), disminuye la síntesis y liberación de acetilcolina desde el sistema colinérgico del cerebro anterior basal (Kar y cols. 1996, Vaucher y cols. 2001) e induce la liberación de citoquinas, activando la respuesta inmune (Araujo y Cotman 1992).

1.1.2. Inflamación en la enfermedad de Alzheimer

La respuesta inflamatoria en el tejido nervioso, denominada neuroinflamación se ha relacionado estrechamente con el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Heneka y cols. 2015b, Wisniewski y Goni 2015, Liu y cols. 2014, Zhang y Jiang 2015, Sui y cols. 2014). Esta incluye la activación de microglías, astrocitos, macrófagos y linfocitos resultando en la liberación de mediadores inflamatorios entre ellos citoquinas, quimioquinas, neurotransmisores, ROS y óxido nítrico (NO, por nitric oxide) (Barrientos y cols. 2015, McGeer y McGeer 1995, Floyd 1999, Smith y cols. 2012).

El análisis de cerebros post-mortem de pacientes con EA han revelado la presencia de abundantes mediadores inflamatorios entre ellas interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como también productos de la activación del complemento y estrés oxidativo (Figura 2) (Glass y cols. 2010). Si bien la inflamación no es responsable del inicio de la enfermedad, si se ha visto asociada a la

progresión de ésta (Wisniewski y Goni 2015).

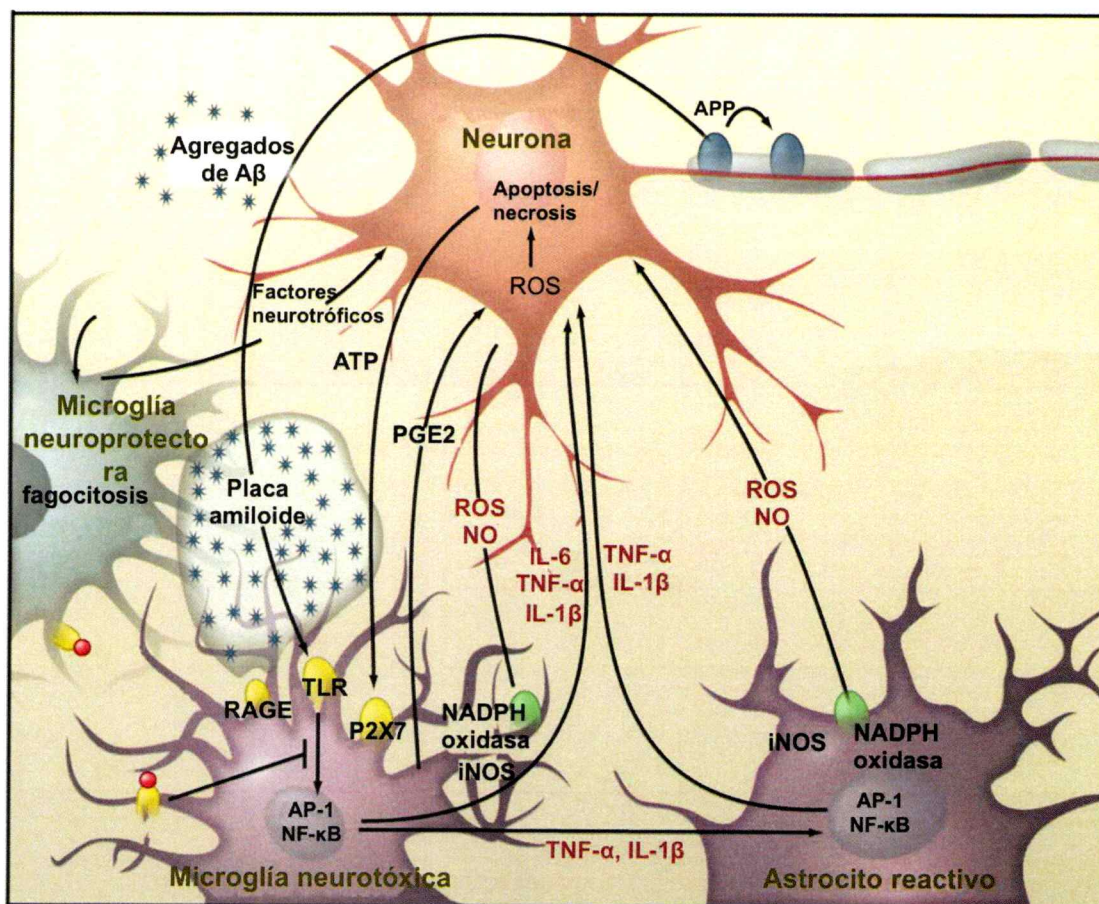


Figura 2. Componentes inflamatorios en la Enfermedad de Alzheimer. El péptido A β , producido por el clivaje de la APP, forma agregados que activan a la microglía, por señalización a través de TLRs y RAGE. Esos receptores activan a los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, los cuales a su vez inducen la producción de ROS y NO. Asimismo inducen la expresión de mediadores inflamatorios como citoquinas, las cuales actúan directamente sobre las neuronas así como también estimulan a los astrocitos, quienes amplifican las señales pro-inflamatorias, induciendo efectos neurotóxicos. La apoptosis y necrosis de las neuronas resulta en liberación de ATP, el cual activa a la microglía a través del receptor P2X7. La microglía también puede tener roles protectores a través de la fagocitosis del A β . Modificado de (Glass y cols. 2010).

La función de las microglías incluyen el soporte y protección neuronal y constituyen el principal componente de la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC) (Michell-Robinson y cols. 2015). Sin embargo posee efectos neurotóxicos cuando es

activada crónicamente. El A β puede reclutar y activar a las microglías, las que a través de sus receptores scavenger que median su adhesión a superficies recubiertas de fibrillas amiloides, conduciendo a la producción de ROS e inmovilización celular. El A β es capaz de activar a las microglías uniéndose a receptores de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) y factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) (Lossinsky y Shivers 2004, Fang y cols. 2010), y receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Harry 2013, Fang y cols. 2010, Zhang y cols. 2012b, Landreth y Reed-Geaghan 2009, Jin y cols. 2008), incluidos los receptores de superficie tipo toll (TLR)-2 y TLR-4 (Udan y cols. 2008, Walter y cols. 2007, Stewart y cols. 2010, O'Halloran y cols. 2014, Lotz y cols. 2005, Costello y cols. 2015). La unión del A β a estos receptores inicia vías de señalización que conducen a la activación celular, a través de modulación de la expresión génica por los factores de transcripción AP-1, NF- κ B, IRF3 e IRF7 (Kaisho y Akira 2006).

Las microglías activadas por A β muestran un incremento de la expresión en la superficie celular del complejo principal de histocompatibilidad de clase II junto con un incremento en la secreción de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) y proteínas del complemento (Akiyama y cols. 2000).

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el cerebro humano (Tabata 2015). Cumplen funciones de soporte bioquímico de células endoteliales de la barrera hematoencefálica, producción de nutrientes para el tejido nervioso, mantención del equilibrio iónico extracelular y reparación del cerebro y medula espinal luego de lesión

por trauma (Tabata 2015). Al igual que las microglías, los astrocitos activados son capaces de secretar moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulación y proteínas del complemento (Lee y cols. 2010, Heneka y cols. 2015a, Heneka y cols. 2015c). Los astrocitos presentan en su superficie receptores RAGE así como también algunos TLR, entre ellos TLR-2 y TLR-4 (Alarcon y cols. 2005, Sasaki y cols. 2001, Salminen y cols. 2009, Jin y cols. 2008) los cuales receptores reconocen el A β e inducen la activación de vías de señalización intracelular (Forloni y cols. 1997).

Tanto microglías como en astrocitos activados por A β presentan activación de la NADPH oxidasa (NOX) e inducción de la sintasa de óxido nítrico (iNOS, por inducible nitric oxide sintase), lo cual genera un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno y NO respectivamente, los cuales generan daño oxidativo y muerte neuronal (Lazarowski y cols. 1990, Vodovotz y cols. 1996, Butterfield y cols. 2007).

La NOX es la principal fuente regulada de generación de ROS. Se compone de un complejo proteico organizado alrededor de una proteína de transmembrana que posee la actividad catalítica, de la cual se conocen 5 isoformas llamadas NOX1-5. La más estudiada, la NOX2 o gp91phox, posee una alta expresión en células del sistema inmune innato incluyendo microglías y se piensa que es la isoforma predominante en astrocitos (Skalnik y cols. 1991, Noh y Koh 2000, Lavigne y cols. 2001, Abramov y cols. 2004, Pawate y cols. 2004). Varios estímulos activan el complejo de la NOX2, entre ellas citoquinas TNF- α y IL-1 β , agonistas de TLR, peroxinitrito, la proteína del complemento

C5a y proteasas. (Yang y cols. 2009, Sareila y cols. 2011, Yang y cols. 2013). Se ha observado que las microglías de pacientes con EA presentan activación de la NOX2, lo que se asocia a un incremento en la producción de ROS y toxicidad en las neuronas vecinas (Shimohama y cols. 2000). También se ha observado un incremento en el ARNm de la NOX1 y NOX3 en el lóbulo frontal de pacientes con EA (de la Monte y Wands 2006). Por otra parte estudios *in vitro* utilizando co-cultivos de neuronas y astrocitos se observó que la muerte neuronal producida por el péptido A β es dependiente del incremento de calcio en el citoplasma concomitante con un aumento en los niveles de ROS, una disminución del glutatión y disipación del potencial de membrana interna mitocondrial en astrocitos, fenómenos que son bloqueados usando inhibidores farmacológicos de la NOX (Abramov y Duchon 2005, Park y cols. 2008, Abramov y cols. 2004). Resultados similares se han obtenido utilizando microglías, en donde estas potencian la toxicidad inducida por el péptido A β en neuronas a través de la producción de ROS (Qin y cols. 2002).

Aunque la expresión de la iNOS es baja en cerebro en condiciones fisiológicas, se incrementa fuertemente durante gliosis en situaciones patológicas como la EA (Vodovotz y cols. 1996, Smith y cols. 1997b, Wallace y cols. 1997, Seyidova y cols. 2004, Aliev y cols. 2009). Los mediadores inflamatorios el LPS, TNF- α , IL-1 β y IFN- γ inducen la transcripción de la iNOS en astrocitos y microglías, a través de la activación de los factores de transcripción STAT1 y NF-kB (Grzybicki y cols. 1996, Hewett y Hewett 2012).

Se ha propuesto la existencia de un circuito de retroalimentación positiva en que los ROS y las citoquinas pro-inflamatorias. De esta manera los ROS, a través de la activación de factores de transcripción NF- κ B, AP-1 y Nrf-2 inducen la expresión de mediadores inflamatorios como Cox-2, MCP-1, IL-6, TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β (Hensley y cols. 2000, Thannickal y Fanburg 2000, Ueda y cols. 2002, Ridder y Schwaninger 2009, Kitazawa y cols. 2011, Guo y cols. 2012, Kawamoto y cols. 2012, Phani y cols. 2012, Song y cols. 2012, Zhang y cols. 2012a, Tobon-Velasco y cols. 2013). Estos a su vez aumentan el estrés oxidativo por medio de la activación de NOX e inducción de iNOS.

1.1.3. Rol del hierro en la enfermedad de Alzheimer

El hierro es un elemento esencial para la función neurológica normal. Varios procesos biológicos en el cerebro son dependientes del hierro, incluyendo el desarrollo (Beard 2003), la síntesis de neurotransmisores (Agarwal 2001), la mielinización (Schulz y cols. 2012) y funciones básicas celulares como son la producción de energía (Malkin y Rabinowitz 1967), ya que este metal actúa como cofactor de diversas enzimas (King y Huang 1984, Namgaladze y cols. 2002). Sin embargo el hierro es un elemento altamente reactivo, pudiendo a través de la llamada reacción de Fenton producir el radical hidroxilo, el cual es altamente tóxico para la célula, ya que produce la oxidación de lípidos, ADN y proteínas, promoviendo la muerte celular y contribuyendo en el desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA (Nunez y cols. 2004, Nunez y cols. 2012, Zigler y cols. 1985).

Reacción de Fenton:



A diferencia del anión radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, no existen defensas celulares destinadas a eliminar el radical hidroxilo, por lo que hay una relación directa entre su producción y el daño oxidativo.

Los niveles celulares de hierro son regulados por transportadores y proteínas de almacenamiento, sujetos a una compleja coordinación de su transcripción y traducción.

Las proteínas participantes incluyen:

1.- Transportador de metales divalentes 1 (DMT1, por divalent metal transporter 1). Su función es la incorporación de hierro al citoplasma desde el medio externo. En el cerebro es expresado tanto en neuronas como en glías, células vasculares y células ependimales del tercer ventrículo (Gunshin y cols. 1997, Williams y cols. 2000, Burdo y cols. 2001, Rathore y cols. 2012). La expresión de DMT1 es regulada a nivel transcripcional por los factores de transcripción NF-kB, factor nuclear Y e HIF-1 (Paradkar y Roth 2006b, Lis y cols. 2005, Wang y cols. 2010a) y a nivel traduccional por las proteínas de respuesta a hierro IRP1 y IRP2 (IRP, por iron regulatory protein). En ausencia de hierro, IRP1 se activa y estabiliza el ARNm de DMT1, aumentando su expresión. Por otra parte IRP2 se encuentra constitutivamente activo, siendo degradado por el proteasoma cuando se genera daño oxidativo inducido por hierro (Garrick y Garrick 2009).

2.- Transferrina (Tf) es una proteína producida por los oligodendrocitos y su función es el transporte extracelular de hierro. La Tf unida a hierro es capaz de asociarse a su receptor (TfR, por transferrin receptor) presente en la membrana plasmática. El complejo TF-TfR es endocitado, permitiendo así la incorporación de hierro a las células (Harding y cols. 1983). Dos receptores, TfR1 y TfR2, se expresan a nivel cerebral, siendo el primero el presente en neuronas y el segundo en células endoteliales (Leitner y Connor 2012). La isoforma expresada en astrocitos y microglías es aun motivo de controversia. La transcripción de TfR es estimulada por el factor de transcripción HIF-1 (Alberghini y cols. 2005, Rolfs y cols. 1997), mientras que su traducción es regulada por IRP1/2 similarmente a lo observado con DMT-1. En ausencia de hierro, IRP1/2 se une al 3'UTR del ARNm del TfR, estabilizándolo y aumentando la expresión de la proteína (Zakin 1992).

3.- Ferroportina (FPN1), es una proteína de membrana cuya función es la del exporte del hierro intracelular. Su expresión ha sido descrita en neuronas, astrocitos y microglías (Burdo y cols. 2001, Moos y Rosengren Nielsen 2006, Song y cols. 2010). FPN1 es regulado transcripcional, traduccional y postraduccionalmente. El promotor de FPN1 posee elementos de respuesta a HIF (Taylor y cols. 2011), al factor de transcripción de metales 1 (MTF-1, por metal transcription factor 1) y a Nrf2 (por nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2) (Harada y cols. 2011, Ward y Kaplan 2012). A nivel traduccional también es regulado por IRP1/2. En ausencia de hierro IRP1/2 se une a la región 5'UTR del ARNm de FPN1, impidiendo la traducción de la proteína, lo cual genera la disminución de su expresión (Abboud y Haile 2000, McKie y cols. 2000,

Lymboussaki y cols. 2003, Muckenthaler y cols. 2008). Finalmente la regulación postraducciona de FPN1 esta determinada por hepcidina, la cual al unirse a FPN1 induce su internalización y degradación (ver más adelante).

4.- Ferritina (Ft) es la proteína encargada del almacenamiento de hierro en forma redox inactiva dentro de la célula (Salgado y cols. 2010). Es un complejo compuesto por 24 subunidades de monómeros de H y L ferritina (FtH, FtL) pudiendo almacenar hasta 4,500 átomos de hierro en forma de complejos oxohidroxil diferricos cristalizados (Harrison y Arosio 1996). La FtH contiene la actividad ferroxidasa, permitiéndole convertir el Fe^{2+} a Fe^{3+} , mientras que la FtL posee la particularidad de ofrecer residuos de aminoácidos ácidos en la superficie que facilita la nucleación y mineralización del hierro (Balla y cols. 1992, Levi y cols. 1992). Por ende Ft enriquecidas en subunidad H se encuentran asociadas a una disminución del daño oxidativo asociado al hierro, mientras que las enriquecidas en subunidades L se asocian principalmente al almacenamiento de hierro a largo plazo (Levi y cols. 1992, Connor y cols. 1995, Zecca y cols. 2004). Ft es expresada principalmente en microglías y oligodendrocitos, aunque su composición es diferente entre ambos tipos celulares: mientras las microglías expresan principalmente la subunidad L, los oligodendrocitos expresan cantidades equivalentes de ambas subunidades (Connor y cols. 1994). Los astrocitos expresan niveles bajos de Ft, cuya composición varía dependiendo de su ubicación en el cerebro (Connor y cols. 1990). La expresión de ferritina es regulada a nivel transcripcional y traduccional (Koorts y Viljoen 2007). Al igual que FPN1 en ausencia de hierro IRP1/2 se une a la



region 5'UTR del ARNm, impidiendo la traducción de la proteína y por ende disminuyendo la expresión de la proteína (Koorts y Viljoen 2007).

En 1953 aparece la primera evidencia que muestra un incremento del contenido de hierro en pacientes con EA (Goodman 1953), siendo confirmado posteriormente en múltiples estudios (Connor y cols. 1992a, Connor y cols. 1992b, Collingwood y cols. 2005, Meadowcroft y cols. 2009, Uusimaki y cols. 2013). La acumulación de hierro se asocia a los ovillos neurofibrilares y a las placas seniles (Smith y cols. 1997a), fenómeno que se observa principalmente en la corteza y no en el cerebelo, lo cual es consistente con el perfil anatómico de neurodegeneración en la EA (Andrasi y cols. 1995).

Adicionalmente se ha observado un incremento del contenido de hierro intracelular en neuronas y microglías, sugiriendo que algunos de los componentes que regulan la homeostasis celular de hierro pudiesen encontrarse alterados (Benkovic y Connor 1993, Lovell y cols. 1998, Antharam y cols. 2012). De hecho, varias proteínas que regulan la homeostasis de hierro muestran cambios en su expresión en la EA (Bush 2013).

Se ha observado un aumento en la expresión de Fn en cerebros de pacientes con EA, particularmente en las microglías ubicadas dentro y alrededor de las placas seniles (Connor y cols. 1992a). A su vez, en cerebros de pacientes con EA, Tf es expresada ectópicamente en astrocitos (Connor y cols. 1992a), incrementándose su expresión en la corteza frontal (Loeffler y cols. 1995). Asimismo se ha observado un incremento en la expresión de DMT1 en corteza e hipocampo en ratones transgénicos modelos de EA

(Zheng y cols. 2009) y se encuentra colocalizando con las placas seniles en la corteza cerebral de pacientes con EA (Zheng y cols. 2009). Con respecto a FPN1, se ha observado una disminución en su expresión en pacientes con EA (Raha y cols. 2013, Crespo y cols. 2014). Todos los cambios observados en la expresión de proteínas que regulan la homeostasis de hierro apuntan claramente a un fenotipo de acumulación de hierro, con un riesgo evidente para el desarrollo de la neurodegeneración a través de daño oxidativo.

Se ha propuesto que la acumulación de hierro en la EA contribuiría a la generación de estrés oxidativo y a la agregación de proteínas (Gallagher y cols. 2012). Se ha reportado que el hierro promueve la agregación del péptido A β *in vitro* (Mantyh y cols. 1993, Huang y cols. 2004), los cuáles son tóxicos en células en cultivo, al generar daño oxidativo probablemente a través de la producción de ROS asociado a la reacción de Fenton (Huang y cols. 2004, Schubert y Chevion 1995, Liu y cols. 2011). Adicionalmente el hierro también incrementa la fosforilación e induce la agregación de las formas hiperfosforiladas de tau (Yamamoto y cols. 2002, Amit y cols. 2008). El hierro colocaliza con los ovillos neurofibrilares actuando como una fuente de generación de ROS dentro de las neuronas (Smith y cols. 1997a, Sayre y cols. 2000).

1.1.4. Relación entre la inflamación y el hierro

Hasta ahora la inflamación y la acumulación de hierro se han estudiado independientemente como dos eventos fuertemente relacionados con la muerte neuronal

en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, pero existe poca evidencia acerca de su interrelación en neurodegeneración. El hierro y su homeostasis están íntimamente ligados a la respuesta inflamatoria y el ejemplo más obvio de esta relación está en la denominada anemia por inflamación o anemia de enfermedades crónicas. Esta relación puede ser directa o indirecta a través de hepcidina, la que se detallará más adelante.

Por ejemplo, la inyección de ratones con TNF- α resulta en la generación de una hiperferritinemia y la retención de hierro en el sistema retículo-endotelial, generando anemia (Alvarez-Hernandez y cols. 1989). El tratamiento con TNF- α o IFN- γ incrementa los niveles del ARNm para la FtH en macrófagos (Fahmy y Young 1993), y la expresión de DMT1 en células bronquiales epiteliales (Wang y cols. 2005).

Los cambios observados en los transportadores pueden ser explicados a través de la modulación de la actividad de IRP1/2 (Mulero y Brock 1999). La estimulación de macrófagos con IFN- γ , TNF- α y LPS produce un incremento en la capacidad de unión de IRP1 e IRP2 a sus ARNm blancos, reduciendo la expresión de FPN1 e incrementando la expresión de DMT1. Interesantemente el pre-tratamiento con la citoquina anti-inflamatoria IL-10 revierte esta respuesta (Wardrop y Richardson 2000, Yang y cols. 2002, Ludwiczek y cols. 2003, Wang y cols. 2005). Adicionalmente la expresión de DMT1 es regulada transcripcionalmente por el factor de transcripción NF- κ B (Paradkar y Roth 2006a), cuya activación se encuentra río abajo de receptores de citoquinas como el receptor de TNF (TNFR) y el receptor de IL-1 (IL-1R), así como también de la vía de

señalización activada por LPS (Rothwell y Luheshi 2000, Teeuwssen y cols. 1991, Hanke y Kielian 2011b).

Recientemente se ha empezado a analizar la relación entre el hierro y la inflamación a nivel del SNC. Se observó que la inyección intraperitoneal con turpentina, un inductor de inflamación de respuesta aguda, genera un aumento en la expresión de TfR, Fn e IRP1/2 así como una disminución de FPN1 y DMT1 en el cerebro de ratones (Malik y cols. 2011). Adicionalmente se reportó un incremento en el contenido de hierro, particularmente dentro de microglías reactivas cercanas a los vasos sanguíneos, pero no en astrocitos reactivos, en un modelo animal de esclerosis múltiple (Williams y cols. 2011b). Se ha reportado que citoquinas pro-inflamatorias afectan la homeostasis de hierro en astrocitos y microglías diferencialmente. Los astrocitos hipocampales activados tienen mayor expresión de DMT1 en comparación con astrocitos inactivos (Pelizzoni y cols. 2013). El tratamiento de astrocitos corticales con TNF- α induce un aumento en la expresión de DMT1 y FnL así como también una reducción en la expresión de FPN1, generando un incremento en la entrada de hierro pero sin diferencias en su exporte. Mientras que el tratamiento de microglías con TNF- α genera un incremento en la expresión de DMT1, FnH, FnL y FPN1, produciendo un aumento en la incorporación de hierro, también sin alterar su salida (Rathore y cols. 2012). La activación de los astrocitos les permitiría desarrollar una eficiente protección contra estrés oxidativo y muerte celular mediada por hierro, a través de la activación de la expresión de varios genes involucrados en el control del estado redox celular (Macco y cols. 2013).

En cultivos de neuronas mesencefálicas ventrales el tratamiento con IL-1 β o TNF- α aumenta la expresión de DMT1 y TfR y reduce la expresión de FPN1, lo que se traduce en un incremento en la entrada de hierro así como una disminución en su salida. Estos cambios se encuentran asociados a un aumento en la expresión de IRP inducido por las citoquinas y pueden ser revertidos con el uso de antioxidantes (Wang y cols. 2013). Usando un modelo de enfermedad de Parkinson por inyección de LPS se observó un incremento en el contenido de hierro en la misma región en donde se produjo la activación glial, así como también una disminución en la expresión de FPN1. Esta respuesta también fue observada de SH-SY5Y, una línea celular dopaminérgica, tras del tratamiento con medio condicionado enriquecido en citoquinas pro-inflamatorias (Zhang y cols. 2014).

Por otra parte se ha reportado en cultivos primarios de microglías que la administración del quelante de hierro deferoxamina reduce la producción de ROS y NO inducidas por hierro así como también la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Rathnasamy y cols. 2011), sugiriendo un carácter bidireccional de la regulación. Finalmente, la identificación reciente en el SNC de la hepcidina, una hormona que interviene en la relación entre la homeostasis del hierro y la inflamación sistémica, introduce un nuevo participante en los procesos neurodegenerativos.

1.1.5. Hecpídina como regulador maestro de la homeostásis de hierro

Hecpídina es un péptido catiónico de 25 aminoácidos secretado principalmente por el hígado al torrente sanguíneo. Es sintetizado como un precursor de 84 aminoácidos que luego de dos cortes proteolíticos sucesivos genera el péptido maduro (Scamuffa y cols. 2008). Inicialmente hecpídina fue descrita como un péptido con actividad antimicrobiana, sin embargo estudios posteriores revelaron su función como regulador maestro de la homeostasis sistémica de hierro (Nicolas y cols. 2001, Pigeon y cols. 2001).

Los niveles de hierro en la sangre dependen de dos procesos, el reciclaje de hierro desde glóbulos rojos senescentes y la absorción intestinal desde la dieta. El primero contribuye al 95% del hierro circulante, mientras que la absorción intestinal componen cerca de 5% (Kemna y cols. 2008).

Hecpídina es capaz de regular los dos procesos anteriormente descritos: en macrófagos y otros tipos celulares hecpídina induce la endocitosis y degradación lisosomal FPN1 (transportador de salida de hierro) provocando una acumulación de este metal en los tejidos, con la concomitante reducción de sus niveles plasmáticos (Nemeth y cols., 2004, De Domenico y cols. 2008, Kovtunovych y cols. 2010). Por otra parte en células del epitelio duodenal, hecpídina disminuye la expresión deDMT1 (transportador de entrada de hierro) reduciendo la incorporación de este metal desde la dieta (Mena y cols. 2008, Chaston y cols. 2008).

La síntesis de hepcidina es regulada en respuesta a múltiples estímulos, que incluyen la inflamación (Lee y cols. 2004, Lee y cols. 2005, Matak y cols. 2009), los niveles de hierro plasmáticos (Gao y cols. 2009), la hipoxia (Nicolas y cols. 2002, Silvestri y cols. 2008, Volke y cols. 2009) y el estrés de retículo (Oliveira y cols. 2009).

La expresión de hepcidina aumenta en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Nicolas y cols. 2002, Nemeth y cols. 2003, Nemeth y cols. 2004, Lee y cols. 2004, Lee y cols. 2005, Dzikaite y cols. 2006, Matak y cols. 2009), así como también en respuesta a la activación de TLR2 y TLR4 (Peyssonnaud y cols. 2006, Sow y cols. 2007, Theurl y cols. 2008, Koenig y cols. 2009). La regulación de la expresión génica de hepcidina mediada por inflamación ocurre a través de la activación del factor de transcripción STAT-3, el cual posee sitio de unión en el promotor de hepcidina (Verga Falzacappa y cols. 2007, Wrighting y Andrews 2006).

La transcripción de hepcidina aumenta en respuesta a un incremento de los niveles de hierro plasmáticos. Esta regulación depende de la proteína de la hemocromatosis humana (HFE), la cual cuando los niveles de saturación de Tf son altos forma un complejo con TfR2, estimulando la transcripción de hepcidina (Kemna y cols. 2008, Gao y cols. 2009).

1.1.6. Hecpidina como modulador de la respuesta inflamatoria

Evidencia reciente sugiere que hepcidina podría tener un rol anti-inflamatorio. La unión de hepcidina a FPN1 y su posterior endocitosis en macrófagos se acopla a la activación de la vía de transducción de señales de la tirosina quinasa JAK-2, que fosforila y activa al factor de transcripción STAT-3, disminuyendo la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α e induciendo la expresión de SOCS-3, una molécula adaptadora que regula negativamente la vía de señalización de las citoquinas pro-inflamatorias (De Domenico y cols. 2009, De Domenico y cols. 2010). Concordante con esto el pre-tratamiento con hepcidina en ratones reduce la expresión hepática de IL-6 y TNF- α y la muerte producto de una inyección letal de LPS. Por otra parte ratones *knockout* de hepcidina, presentan una mayor sensibilidad a la toxicidad del LPS, lo cual es revertido por inyección de hepcidina sintética (De Domenico y cols. 2010).

La actividad anti-inflamatoria de hepcidina también ha sido evaluada en otros modelos, como la ictericia obstructiva, observándose también una disminución de la expresión de TNF- α y MCP-1 y protección frente a la muerte (Huang y cols. 2012). Adicionalmente en un modelo de daño pulmonar agudo inducido por sepsis polimicrobiana mediante cirugía de ligadura y punción cecal, se ha observado que la ausencia de hepcidina incrementa la mortalidad y la severidad de la enfermedad. Interesantemente macrófagos alveolares obtenidos de ratones knockdown de hepcidina tienen alterada su capacidad fagocítica comparado con macrófagos obtenidos desde ratones controles (Chen y cols. 2014). Debido a que la expresión de hepcidina es regulada por los niveles de hierro,

ratones con deficiencia de este metal (y por lo tanto bajos niveles de hepcidina) presentan una mayor respuesta inflamatorias al LPS, efecto que es revertido por la administración de hepcidina exógena. Este efecto es independiente de la función de hepcidina sobre el metabolismo de hierro, ya que utilizando ratones *Tmprss6*^{-/-} los cuales se caracterizan por tener anemia por deficiencia de hierro y a su vez alta producción de hepcidina tiene una respuesta inflamatoria menor que ratones expuestos a una dieta baja en hierro (Pagani y cols. 2011).

1.1.7. Hpcidina en el sistema nervioso central

Se ha observado la presencia de hepcidina en varias regiones del cerebro incluyendo bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo, así como también en el ganglio de la raíz dorsal y el sistema nervioso periférico, determinado a través de diversas técnicas como RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Zechel y cols. 2006).

Se ha reportado la expresión de hepcidina en células gliales, neuronas y células endoteliales de plexus coroideo (Zechel y cols. 2006, Marques y cols. 2009). Se ha observado un incremento del ARNm de hepcidina durante el envejecimiento en corteza, estriado e hipocampo (Wang y cols. 2010b).

Existe evidencia que la expresión de hepcidina en el cerebro es regulada de un modo similar a lo observado en hepatocitos, incrementando su expresión en corteza y estriado

ante un estímulo inflamatorio sistémico, como la inyección intraperitoneal de LPS (Wang y cols. 2008). Esta respuesta se ha observado también en el plexus coroideo, lo que correlaciona con un incremento de los niveles de pro-hepcidina en el líquido cefaloraquídeo (Marques y cols. 2009).

La función de hepcidina en el cerebro se ha estudiado principalmente en relación a la homeostasis del hierro. Se ha observado que tanto la inyección intracerebroventricular de hepcidina como el tratamiento de cultivos primarios de neuronas o astrocitos con hepcidina, reduce los niveles de FPN1 y altera la expresión de otras proteínas asociadas a la homeostasis de hierro como son DMT-1, la ferroxidasa ceruloplasmina y TfR1 (Ding y cols. 2011, Du y cols. 2011, Li y cols. 2011). Adicionalmente en células endoteliales hepcidina también disminuye la expresión de FPN1, DMT-1 y TfR1 suprimiendo la acumulación de hierro en el cerebro (Du y cols. 2014).

Recientemente se ha reportado la isquemia cerebral induce un incremento en la expresión de hepcidina en corteza, hipocampo y estriado en paralelo con un incremento en ferritina y de los niveles de hierro libre, así como también una disminución de los niveles de FPN1 (Ding y cols. 2011). A su vez en un ratón transgénico modelo de EA y tejido postmortem obtenido desde pacientes que sufrieron esta patología, se observó una disminución de la expresión tanto de hepcidina como FPN1 en el hipocampo (Raha y cols. 2013).

Hasta la fecha no existen estudios que muestren si hepcidina participa en la modulación

de la respuesta inflamatoria en el cerebro y existe muy poca información acerca de la regulación de la homeostasis de hierro dependiente de la inflamación en el SNC. Determinar si hepcidina constituye un conector molecular entre la neuroinflamación y la acumulación de hierro resulta esencial debido al rol crítico que juegan estos dos procesos en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas crónicas en general y en la EA en particular (Heneka y O'Banion 2007, Perry y cols. 2010, Pomara y Sidtis 2010).

1.2. Hipótesis de trabajo

IL-6 y TNF- α inducen acumulación de hierro en neuronas directamente a través de la modificación de la expresión de los transportadores de hierro, e indirectamente mediante la inducción de la expresión de hepcidina por astrocitos y microglías, la que atenúa la secreción de estas citoquinas inducida por el péptido beta-amiloide.

1.3. Objetivo general

Estudiar el rol de la IL-6 y el TNF- α en la acumulación de hierro en neuronas, astrocitos y microglías y evaluar el rol de hepcidina en la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por el péptido β -amiloide.

1.4. Objetivos específicos

1.4.1. Evaluar el efecto de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en la expresión de DMT1, FPN1 y hepcidina en neuronas, astrocitos y microglías.

1.4.2. Determinar el efecto de hepcidina en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , inducida por el péptido β -amiloide en cultivos de astrocitos o microglías.

1.4.3. Analizar el efecto en el estrés oxidativo y muerte neuronal de medios condicionados por astrocitos o microglías tratados con péptido β -amiloide y/o hepcidina.

1.4.4. Estudiar el efecto de hepcidina en la activación glial, estrés oxidativo y dishomeostasis de hierro en cerebros inyectados con péptido β -amiloide.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1 *Reactivos generales y péptidos*

Dimetilsulfóxido(DMSO) (#D2650, Sigma-Aldrich); 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP, #325244-25G, Sigma-Aldrich); Hepcidina sintética humana (4392-s, PeptideInstitute), Lipopolisacárido de *E. Coli* 026:B6 (#L2654, Sigma-Aldrich); Interleuquina 6 (#206-IL-010 RyDSystems); Factor de necrosis tumoral α (#210-TA-020, RyDSystems); péptido β -amiloide 1-42 (#H6466 #H1368, Bachem) péptido β -amiloide 42-1 (#H3976, Bachem).

2.1.2 *Material biológico*

En este estudio se utilizaron células obtenidas desde ratas Sprague-Dawley y ratones C57BL/6 para los experimentos de inyección estereotáxica.

2.1.3 *Cultivo celular*

De Gibco-BRL, Life Technologies, se obtuvo: Minimal Essential Medium (MEM), medio de cultivo F-12 Nutrient Mixture, aminoácidos no esenciales (MEM), Suero fetal bovino (FBS), Suero de caballo (HS), Buffer Fosfato 1X (PBS 1X), mezcla de antibióticos/antimicóticos (Streptomycina, Penicilina y Anfotericina B), tripsina 5mM EDTA, tripsina 25mM, Neurobasal y suplemento B27. De laboratorios Sanderson

(Santiago, Chile) se obtuvo agua bidestilada de calidad inyectable. De Corning Incorporated (NY, USA) se obtuvieron placas de cultivo de 10 cm y 35 mm de diámetro y placas de cultivo de 96, 48, 24 y 6 pocillos. De JSP (Santiago, Chile) se obtuvo cubre objetos para cultivo. De Millipore (Billerica, USA) se obtuvo unidades de filtración de 500 ml con poro de 0,2 μ m.

2.1.4 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron los siguientes: Anti-panDMT-1 (conejo: Biosynthesis, USA). Anti-MTP1 (conejo #MTP11-A, AlphaDiagnostics). Anti- α -tubulina (ratón #T6199, Sigma-Aldrich). Anti-hepcidina (conejo #HEPC11-A, AlphaDiagnostics). Anti-GFAP (ratón #C9205, Sigma-Aldrich). Anti-Cd11b (ratón #MCA375G, Serotec). Anti-Tuj1 (mouse: Promega #G7121). Anti 4-HNE (conejo #HNE11-S, Alpha Diagnostics). Anti-iba1 (conejo #019-19741, WAKO). Anti-IgG de ratón (conejo #31450: Thermo Scientific). Anti-IgG de conejo (cabra #31460, Sigma-Aldrich). Anti-IgG de ratón biotinilado (cabra #BA-9200, Vector). Anti-IgG de conejo biotinilado (cabra #BA-1000, Vector). Anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (cabra #A11001, Invitrogen). Anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (cabra #A11008, Invitrogen). Anti-IgG de ratón Alexa Fluor 532 (cabra #A11002, Invitrogen). Anti-IgG de conejo Alexa Fluor 532 (cabra #A11009, Invitrogen).

2.1.5 Sondas fluorescentes

2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diáacetato (DCDHF-AM) (#D399, Invitrogen); calceína-AM (#C3100MP, Invitrogen); TO-PRO-3 (#T3605, Invitrogen); yoduro de propidio PI (#P3566, life technologies); Alexa Fluor 555 C2-maleimida (#A20346, Invitrogen) y Alexa Fluor 488 C5-maleimida (#A10254, Invitrogen).

2.1.6 Equipos

Incubador con inyección de CO₂ modelo 3141 (ThermoScientific, USA), Campana de cultivo con flujo vertical (Jouan, Francia), Campana de cultivo con flujo horizontal (Nuare, USA), Cámaras electroforéticas (Bio-Rad Laboratories Inc, USA), Fuente de Poder PS 4010-2 (Sigma-Aldrich, USA), Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Alemania), Lector de Placas ELISA SUNRISE (Tecan Trading AG, Suiza), Lector de Fluorescencia Synergy 2™ (BioTek, USA) Microscopio confocal, Carl Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss AG, Alemania), Transiluminador UV (UVP Inc., USA) y Centrifuga Rotina 35R (Hettich, Alemania). Estereotáxico con consola digital modelo 940 (Kopfinstruments), bomba de inyección estereotóxica modelo Legato 130 (KD Scientific), Unidad de anestesia para isoflurano modelo U-410 (Univentor) y bomba peristáltica modelo Minipuls 3 (Gilson).

2.1.7 Partidores

Los partidores utilizados en este estudio se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Secuencias de los partidores utilizados en el estudio.

Símbolo	Nombre del gen	Especie	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Tm
Actina	Actina	Rata	5'-TAGAGCTTCAC CA'CCACAGC-3'	5'-AAGGAAGGCTG GAAAAGAGC-3'	59°C
DMT1	Transportador de metales divalentes 1	Rata	5'-TGATCCTGACC CGGTCTATC-3'	5'-CAATCCTCCAG CCTATTCCA-3'	58°C
FPNI	Ferroporfina	Rata	5'-TCGGTTCCTCT CACTCCTGT-3'	5'-GTGGAGAGAGA GTGGCCAAG-3'	58°C
Hepc	Hepcidina	Rata	5'-GGCAACAGAC GAGACAGACT-3'	5'-AGGCTCTTGGC TCTCTATGT-3'	58°C
IL-6	Interleucina 6	Rata	5'-CAAGAGACTTC CAGCCAGTTGC-3'	5'-TGGCCGAGTAGAC CTCATAGTGACC-3'	60°C
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa	Rata	5'-CACCACGCTCTTC TGTCTACTGAAC-3'	5'-CCGGACTGCGTGAT GTCTAAGTACT-3'	59°C

2.2. Métodos

2.2.1 Cultivo Primarios

Cultivo primario de neuronas hipocampales:

Las neuronas fueron aisladas desde hipocampos de embriones de ratas SpragueDawley de 18 o 19 días post coito y cultivadas como se describe en (Kaech y Banker 2006). Brevemente se extraen los hipocampos y se transfieren a una solución de 0.25% de tripsina en tampón Hank's salino (HBSS) y se incuban por 20 minutos a 37°C. Inmediatamente se lavan dos veces con HBSS y el tejido se disgrega mediante 20 pasadas a través de una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a la mitad y 20 pasadas adicionales a través de una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a 1/4. Luego las células se cuentan en un hemocitómetro y se siembran en neurobasal con 10% desuero de caballo 1 mM de piruvato de sodio y Glutamina en placas de 24 pocillos con cubre

objetos de vidrio a una densidad de 90.000 células/cm² para inmunofluorescencia o en placas de 6 a la misma densidad para extracción de proteínas y 48 pocillos para ensayos de viabilidad. Una hora tras el plaqueo el medio se reemplaza por Neurobasal con 2% de B27 , penicilina (100U/mL), estreptomycin (100µg/mL), 1mMdepiruvato de sodio y GlutaMAX.

Cultivo primario de glías corticales:

Las glías corticales fueron aisladas desde corteza de neonatos de ratas Sprague Dawley de 1 o 2 días post natal. Para ello las cortezas son disectadas en medio HBSS y digeridas utilizando tripsina 0,25% suplementada con 0,5 mg/ml de DNasa I. Las células se siembran en frascos de 75 cm e incuban en MEM-F12 10%FBS a 5%CO₂, donde el medio de cultivo es reemplazado cada 3 días. Después de 13 días, el cultivo mixto de astrocitos y microglías, es agitado vigorosamente en un agitador orbital a 260 rpm durante 16 horas para separar las células microgliales. Las microglías son sembradas en MEM-F12 10% FBS. Después de 20 min de incubación a 37°C las células no adherentes (principalmente astrocitos) son eliminadas con un cambio de medio. Las células remanentes en el flask nuevamente se agitan durante 72 h para eliminar el resto de las microglías. Después de la agitación, los astrocitos se tratan con tripsina, se siembran en placas de 35 mm, y son crecidos hasta 80% confluencia, donde posteriormente se realizan los diferentes tratamientos.

2.2.2 Preparación de péptido beta-amiloide

El péptido A β , se resuspendió en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), se alicuotó en tubos eppendorf de 1,7 mL y se dejó secar una noche en una campana de flujo, según descrito en (Stine y cols. 2011). Los viales secos con el film que contiene el péptido beta amiloide fueron guardados en -80°C en presencia de desecante hasta su uso. Para los tratamientos un vial de 45 μ g se resuspendió en 2 μ L de DMSO y posteriormente en 90 μ L de PBS-CMF 1X. La solución fue incubada a 37°C durante 72 horas para permitir su agregación (Hu y cols. 1998).

2.2.3 Tratamientos

Tratamientos con citoquinas: Neuronas de 7 DIV cultivadas en medio neurobasal suplementado con B27 fueron tratadas por 18 horas con 50 ng/mL de TNF- α , 50 ng/mL de IL-6 o 1 μ g/mL de LPS. Astrocitos corticales cultivados en medio MEM/F12 1%FBS y 7 μ M de hierro, fueron tratados similarmente durante 18 horas con 50 ng/mL de TNF- α , 50 ng/mL de IL-6 o 1 μ g/mL de LPS.

Tratamientos con hepcidina: Neuronas de 7DIV fueron tratadas con hepcidina 350nM en medio neurobasal suplementado con B27. En astrocitos los tratamientos fueron realizados en MEM/F12 10% FBS. Sin embargo en los experimentos de medición de liberación de citoquinas, los tratamientos con hepcidina fueron realizados en MEM/F12 sin suero, suplementado con 7 μ M de Fe-NTA. Previamente al tratamiento con

hepcidina las células fueron incubadas con 10 μM Fe-NTA según protocolo descrito por De Domenico (De Domenico y cols. 2010).

Tratamientos con péptido β -amiloide: Cultivos de astrocitos o microglías crecidos en medio MEM/F12 sin suero 7 μM de hierro fueron tratados con péptido β -amiloide a una concentración final de 2 μM determinado por la cuantificación utilizando BCA. Para producir medios condicionados los tratamientos fueron realizados en Neurobasal suplementado con B27 durante 24 horas y posteriormente recolectados y utilizados para el tratamiento de neuronas hipocampales a los 7 DIV durante 48 horas.

2.2.4 *Histoquímica redox*

La histoquímica redox se realizó como se describe en (Horowitz y cols. 2011). Brevemente, luego de los diferentes tratamientos, las células son fijadas durante 30 minutos en una solución de 4% de paraformaldehído, 1mM de N-etilmaleimida, 2 μM maleimida Alexa555 y 0,05% triton X-100 preparada en PBS pH 7.0. Posteriormente son lavadas durante 5 minutos con PBS tres veces para eliminar el exceso de sonda e incubadas por 30 minutos en 5mM tris(2-carboxyetil) fosfina (TCEP) en PBS. Luego nuevamente lavadas con PBS durante 30 segundos e incubadas durante otros 30 minutos con 1mM de N-etilmaleimida y 2 μM Maleimida Alexa488 preparado en PBS. Finalmente, los covers, son lavados durante 5 minutos con PBS tres veces, completando así la tinción y permitiendo su posterior montaje en FluorSave y análisis a través de microscopia confocal.

2.2.5 Inmunocitoquímica

Las células sembradas en cubre-objetos se lavaron con PBS 0.1M y fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% y sacarosa 4% en PBS 0.1M durante 30 minutos a 37°C. Luego se permeabilizaron por 5 minutos en 0,2% Triton X-100 en PBS 0.1M. El bloqueo se realizó con 5% de BSA en PBS 0.1M a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron en 0,1% tritón, 1% BSA en PBS 0.1M durante 16 horas a 4°C. La dilución de los anticuerpos utilizados fue: anti-tuj1 1:1000, anti-4HNE 1:100, anti-GFAP 1:100, anti-Cd11b 1:100, anti-Iba1 1:500, anti-DMT1 1:500, anti-MTP1 1:100, anti-hepcidina 1:100 y TOPRO 1:500. Los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-Fluor se incubaron en 0,1% tritón, 1% BSA en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente y la dilución utilizada fue de 1:300. Los cubreobjetos se montaron en un portaobjeto con medio de montaje Fluor Save Reagent.

2.2.6 Determinación de la producción de ROS intracelular

Se utilizó la sonda DCDHF-DA, para determinar la producción de ROS (Nunez y cols. 2004). En estos experimentos, las neuronas fueron sembradas en placas de 24 pocillos y al finalizar los tratamientos, las células fueron lavadas con HBSS 1X y cargadas con 5µM DCDHF-DA en HBSS durante 15 minutos. Después de la carga, las células fueron lavadas tres veces con HBSS. Para el registro de fluorescencia las células fueron incubadas con 300 µL de HBSS por pocillo, y se les permitió a las células un tiempo de recuperación de 5 minutos a 37°C en el incubador, previo a la obtención de los registros. Para los lavados e incubaciones se usaron soluciones precalentadas a 37 °C y los

registros fueron obtenidos también a 37°C, en un lector de fluorescencia Synergy 2™ (BioTek), usando las longitudes de onda de excitación y emisión, Ex/Em, 485/528. Para la obtención de los registros se midió la fluorescencia durante 5 minutos para obtener la línea base, tras lo cual se ofreció a las células 20 μM de FAS (Para la presentación de los datos, se dividió cada dato de fluorescencia obtenido (F) por la fluorescencia inicial registrada (F0), obteniéndose para cada punto en el tiempo un valor de F/F0.

2.2.7 Determinación de viabilidad

La viabilidad fue determinada utilizando calceína y yoduro de propidio. Brevemente, las células tratadas fueron lavadas con HBSS1X a 37°C y posteriormente incubadas con 3 μMcalceína y 3 μMyoduro de propidio durante 30 minutos a 37°C en HBSS 1X. Posteriormente fue determinada la intensidad de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y emisión, Ex/Em, 485/528 para la calceína y 540/600 para el yoduro de propidio. La viabilidad celular fue determinada considerando tanto la intensidad de fluorescencia de la calceína como la del yoduro de propidio.

2.2.8 Western blot.

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron usando un buffer de extracción RIPA (20 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mMNaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio) con un coctel de inhibidores de proteasas y PMSF. Para ello las células se lavaron y rasparon en buffer RIPA a 4°C sobre la placa de cultivo con un *cellscraper*. El extracto se recolectó en tubos Eppendorf e incubó 15 minutos a 4°C.

Luego de este periodo se realizó una centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recolectó y cuantificó mediante el método de BCA midiendo absorbancia a 560 nm (Bollag y cols. 1996).

En la separación electroforética, se cargaron 25 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora 30 minutos a 300 mA a 4°C. Para determinar la eficacia de la transferencia posteriormente la membrana se tiñó con rojo Ponceau. El bloqueo se realizó con leche descremada al 5% en TBS-T20 (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron en leche descremada al 1% en TBS-T20 a 4°C toda la noche con agitación suave. La dilución de anticuerpos utilizados fue: anti-tubulina 1:10.000, anti-FPN1 1:1.000 y anti-DMT1 1:1.000. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó en leche descremada al 1% en TBS-T20 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La dilución empleada de los anticuerpos secundarios fue de 1:10.000 para el anti-IgG de conejo y 1:5.000 para el anti-IgG de ratón. Para el revelado se utilizó el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate y la señal fue detectada mediante placas fotográficas.

2.2.9 RT-PCR

Se realizó RT-PCR contra los ARN mensajeros de DMT1, FPN1, Hepsidina, IL-6, TNF- α y Actina. Para extraer ARN mensajero de DMT1, FPN1 y Hepsidina desde neuronas, astrocitos y microglías, se utilizó TRIzol según instrucciones del fabricante. Para extraer ARN total desde astrocitos y microglías se utilizó el kit Qiagen RNeasy minikit. El ARN obtenido fue disuelto en agua tratada con DEPC y cuantificado a través de un nanodrop (Biotek). La síntesis del ADNc se realizó mediante el uso de la transcriptasa reversa M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) usando como templado 1 μ g de ARN total. En un tubo de microcentrifuga libre de nucleasas se agregaron 1 μ g de ARN total, 1 μ L de oligodT 500 μ g/mL, 1 μ L de MixdNTP 10 mM (10 mM de cada uno de los nucleótidos trifosfatos dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y agua libre de nucleasas. La mezcla fue calentada a 65°C por 5 minutos y enfriada rápidamente a 4°C. Luego se agregó 4 μ l de Buffer RT completo 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ l de DTT 0,1 M, 1 μ l de Inhibidor de Ribonucleasas y 1 μ L de M-MLV RT. El contenido de los tubos fue mezclado e incubado por 50 minutos a 37°C. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 minutos.

El 10% de ADNc generado fue usado como templado para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. En un tubo de microcentrifuga libre de nucleasas se agregaron 2,5 μ l de Buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), 1,5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ l de MixdNTP 10 mM, 0,5 μ l de partidor *Forward* de amplificación (10 μ M), 0,5 μ l de partidor *Reverse* de amplificación (10 μ M), 0,5 μ l de

Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l), 2 μ l de ADNc y 17 μ l de agua libre de nucleasas. Los partidores utilizados y las temperaturas de apareamiento están descritos en la Tabla 1. Las condiciones de PCR y los amplificados obtenidos para cada partidor, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Condiciones de PCR realizados.

Símbolo	Tamaño amplificado	ciclos	T _m
Actina	206pb	28	59°C
DMT1	201 pb	36	58°C
EPN1	198 pb	36	58°C
Hepc	190 pb	40	58°C
IL-6	614 pb	28	60°C
TNF- α	546 pb	28	59°C

El programa utilizado fue el siguiente: 2 minutos a 95°C, ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a T_m y 30 segundos a 72°C, seguido por una amplificación final de 10 minutos a 72°C. Los amplificados obtenidos fueron resueltos en u gel de agarosa al 2% y las bandas obtenidas fueron cuantificadas usando el programa Image J.

2.2.10 Detección de citoquinas

Las citoquinas IL-6 y TNF- α fueron detectadas mediante ELISA (KRC0061 para IL-6 de rata y KRC3011 para TNF- α ; Invitrogen) desde los sobrenadantes de cultivos de astrocitos o microglías tratados con 2 μ M de fibrillas de péptido A β durante 24 horas en medio MEM/F12 sin FBS 7 μ M de hierro, según instrucciones del fabricante.

2.2.11 Inyecciones estereotáxicas

Los ratones fueron anestesiados con 10 $\mu\text{L}/\text{gr}$ de peso corporal de una solución compuesta por ketamina (1 mL), xilasina (0,5 mL) y NaCl al 0,9% (8,5 mL). Una vez anestesiados, se fijaron por la cabeza a un aparato estereotáxico. Posteriormente, la piel fue abierta con un bisturí, se fijó el bregma y se realizó la inyección en el ventrículo lateral derecho del ratón utilizando las siguientes coordenadas: antero posterior (AP): -0.22 mm, medio lateral (ML): 1 mm y dorso ventral (DV): 2.5 mm. Estas coordenadas fueron corroboradas inyectando microesferas de poliestireno (beads) marcadas con Cy3 (Figura 3)

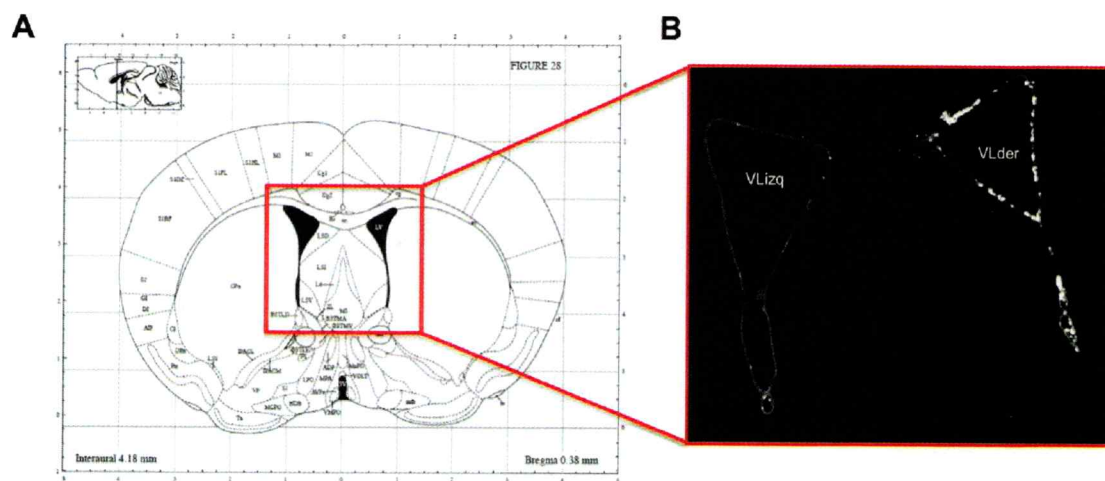


Figura 3 Inyección intracerebroventricular de Cy3-beads. Ratones de 13 semanas fueron inyectados con 2 μL de una solución salina de Cy3-beds en el ventrículo lateral derecho. Los animales fueron sacrificados a las 48 hrs. post-tratamiento por perfusión-fijación transaortica con 4%PFA. Los cerebros congelados fueron cortados en 20 μm con un micrótomos de congelación. En A se muestra una imagen de atlas estereotáxico de ratón indicando las coordenadas en la cuales se observa la imagen en B. VLizq, ventrículo lateral izquierdo y VLder, ventrículo lateral derecho.

El protocolo de administración de sustancias se detalla en la Figura 4 y corresponde a dos inyecciones de un volumen de 2 μL cada una, separadas por un intervalo de tiempo de 2 horas. Posteriormente los animales fueron dejados descansar por 72 hrs luego de la última inyección y finalmente sacrificados. La primera inyección fue realizada con 2 μL de hepcidina o salino a una velocidad de flujo de 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ mediante la utilización de una bomba de inyección. A las 2 horas post-anestesia los ratones fueron nuevamente anestesiados para realizar una segunda inyección con 2 μL de $\text{A}\beta_{1-42}$, $\text{A}\beta_{42-1}$ o salino. Para ello se utilizó una máscara de gas con isofluorano al 0.9% y a una velocidad de administración de 180 mL/min .

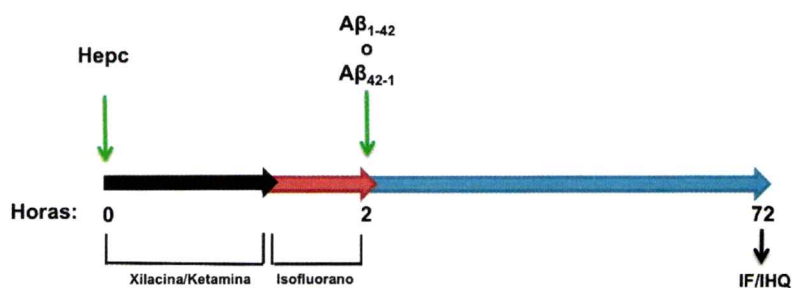


Figura 4. Protocolo de administración de sustancias. Animales de 13 semanas de edad fueron anestesiados con xilacina y ketamina para luego vía inyección icv administrarles hepcidina. 2 horas post-inyección fueron nuevamente anestesiados utilizando isofluorano y se les administro una segunda inyección icv con péptido $\text{A}\beta$. Los animales fueron sacrificados por perfusión-fijación transaórtica a las 72 horas.

Los grupos experimentales, las concentraciones y volúmenes de los diferentes compuestos inyectados se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Grupos experimentales

Grupo N°	Péptido Aβ 1-42	Péptido Aβ 42-1	Hepc	N° total de dosis	N° de ratones
	Dosis:conc./Dosis volumen (por ratón)	Dosis:conc./Dosis volumen (por ratón)	Dosis:conc./Dosis volumen (por ratón)		
1	-	-	-	1	4
2	440pmol/2 ul	-	-	1	4
3	-	-	10 ug/2 ul	1	4
4	-	440pmol/2 ul	-	1	4
5 ^a	-	440pmol/2 ul	10 ug/2 ul	1	4
6 ^a	440pmol/2 ul	-	10 ug/2 ul	1	4

a En grupos 5 y 6, hepcidina fue administrada 2 horas previo a la administración de péptido Aβ por inyección intracerebroventricular (icv)

2.2.12 Inmunofluorescencia

Los cerebros de ratones fueron fijados por perfusión transcardíaca, disectados, fijados durante 48 horas (4% paraformaldehído en 0,1 M PBS), criopreservados en 30% sacarosa y cortados en 20 μmen un micrótopo de congelación. Los cortes flotantes fueron tratados con borohidruro sódico (NaBH₄) 1mg/mL durante 10 minutos en PBS1X para eliminar la autofluorescencia (Clancy y Cauller 1998). Posteriormente el tejido fue permeabilizado con Tritón X-100 al 0.5%, bloqueado en 4% BSA e incubado con el anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-GFAP 1:500, anti-Iba1 1:500, anti-DMT1 1:500, anti-FPN1 1:250, anti-Tuj1 1:1000 y anti-HNE 1:500. La marca fue visualizada usando Alexa 488 y Alexa532 conjugado como anticuerpos secundarios a una dilución de 1:500 y TOPRO 1:500. Finalmente los cortes fueron montados y analizados a través de microscopía confocal.

2.2.13 Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, los cortes flotantes de 20 µm de espesor fueron tratados con 20% metanol para la eliminación de la actividad peroxidasa endógena. El tejido fue permeabilizado con Tritón X-100 al 0.5%, bloqueado en 4% BSA e incubado con el anticuerpo primario anti-Iba1 1:500. Posteriormente fue incubado con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo 1:250 y luego con el kit ABC (VectaStain). La marca fue revelada utilizando el substrato para la peroxidasa 3,3-diamino-benzadina (DAB). Los tejidos fueron deshidratados mediante etanol, posteriormente pasados por xileno y finalmente montados utilizando Eukitt (Flukä).

2.2.14 Programas utilizados

Para la construcción de todos los gráficos se utilizó el programa GraphPadPrism 5. En los análisis de intensidad de fluorescencia de las inmunofluorescencia en los cortes de tejido se utilizó el programa Quantity One de Biorad. En el análisis de inmunocitoquímicas y western blot se utilizó el programa Image J.

2.2.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Graph Pad InStat, utilizando un test ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía paramétrico y no paramétrico en donde

los post test empleados fueron el de Dunnett y el de Kruskal-Wallis respectivamente.
Fueron considerados significativos valores de p menores a 0.05.

3 RESULTADOS

3.1 Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en la expresión de DMT1, FPNI y hepcidina en neuronas, astrocitos y microglías

Lo primero que se realizó fue una caracterización de los cultivos primarios de neuronas hipocampales, astrocitos y microglías corticales (Figura 5).

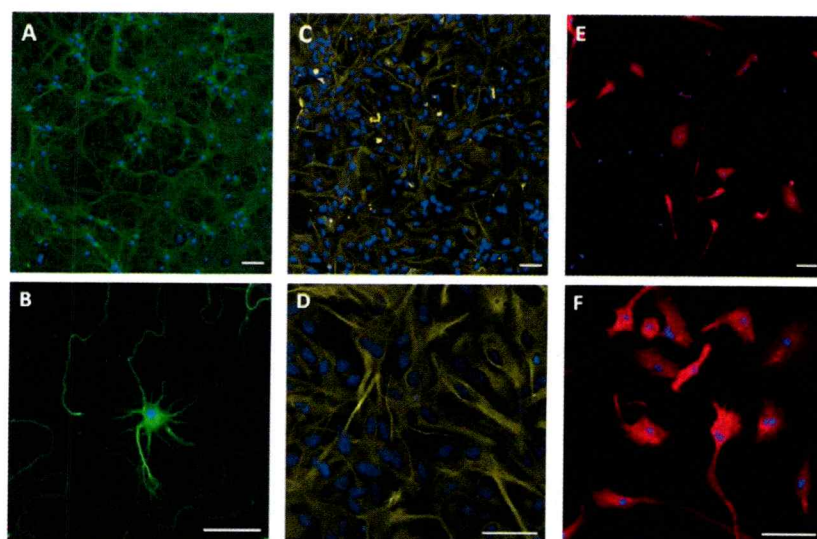


Figura 5. Inmunocitoquímica de cultivos primarios enriquecidos en neuronas, astrocitos o microglías. En 1A y 1B se muestra inmunocitoquímica de un cultivo primario de neuronas hipocampales marcados con β III-tubulina (verde). En 1C y 1D se muestra la inmunocitoquímica de un cultivo de astrocitos, teñido con su marcador específico GFAP (amarillo). En 1E y 1F se muestra la inmunocitoquímica de un cultivo de microglías, las que fueron marcadas con un anticuerpo contra Cd11b (Rojo), un marcador de células del sistema inmune. Los núcleos se marcaron con TOPRO-3 (azul). Barra = 50 μ m

En la figura 5A y 5B se observa la inmunocitoquímica de un cultivo denso (100.000 células/cm²) de neuronas de 8 DIV, las cuales fueron tratadas desde 2 DIV con AraC (4 μ M) para inhibir la proliferación celular. El 95% de las células correspondieron a

neuronas que presentaban la tinción específica para β III-tubulina (verde) y un 5% a otros tipos celulares no determinados. En la figura 5C y 5D se muestra la inmunocitoquímica de un cultivo de astrocitos, teñido con su marcador específico GFAP (amarillo). No se observó la presencia de neuronas ni microglías en estos cultivos. En 5E y 5F se muestra la inmunocitoquímica de un cultivo de microglías marcadas con un anticuerpo contra Cd11b (Rojo), lo que nos permitió determinar que la pureza de este cultivo es de un 90-95%.

Una vez caracterizados los cultivos, evaluamos el efecto de TNF- α , IL-6 o LPS sobre la expresión de DMT1 y FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías. Los cambios a nivel de proteínas a través de *western blot* e inmunocitoquímica y cambios a nivel de ARNm a través de RT-PCR fueron analizados a las 18 horas post-tratamiento.

Determinamos que TNF- α , IL-6 y LPS inducen un incremento de aproximadamente 50-67% en la expresión de DMT1 junto como un disminución en un 45-65% de los niveles de FPN1 en neuronas (Figura 6A). En astrocitos el tratamiento con TNF- α , IL-6 o LPS también indujo un incremento significativo en los niveles de proteína de DMT1, mientras que únicamente el tratamiento con LPS generó una leve disminución en los niveles de proteína de FPN1 (Figura 6B). Finalmente el tratamiento de microglías con TNF- α , IL-6 o LPS produjo un incremento significativo en los niveles expresión de DMT1 sin alterar los niveles de expresión de FPN1 (Figura 6C).

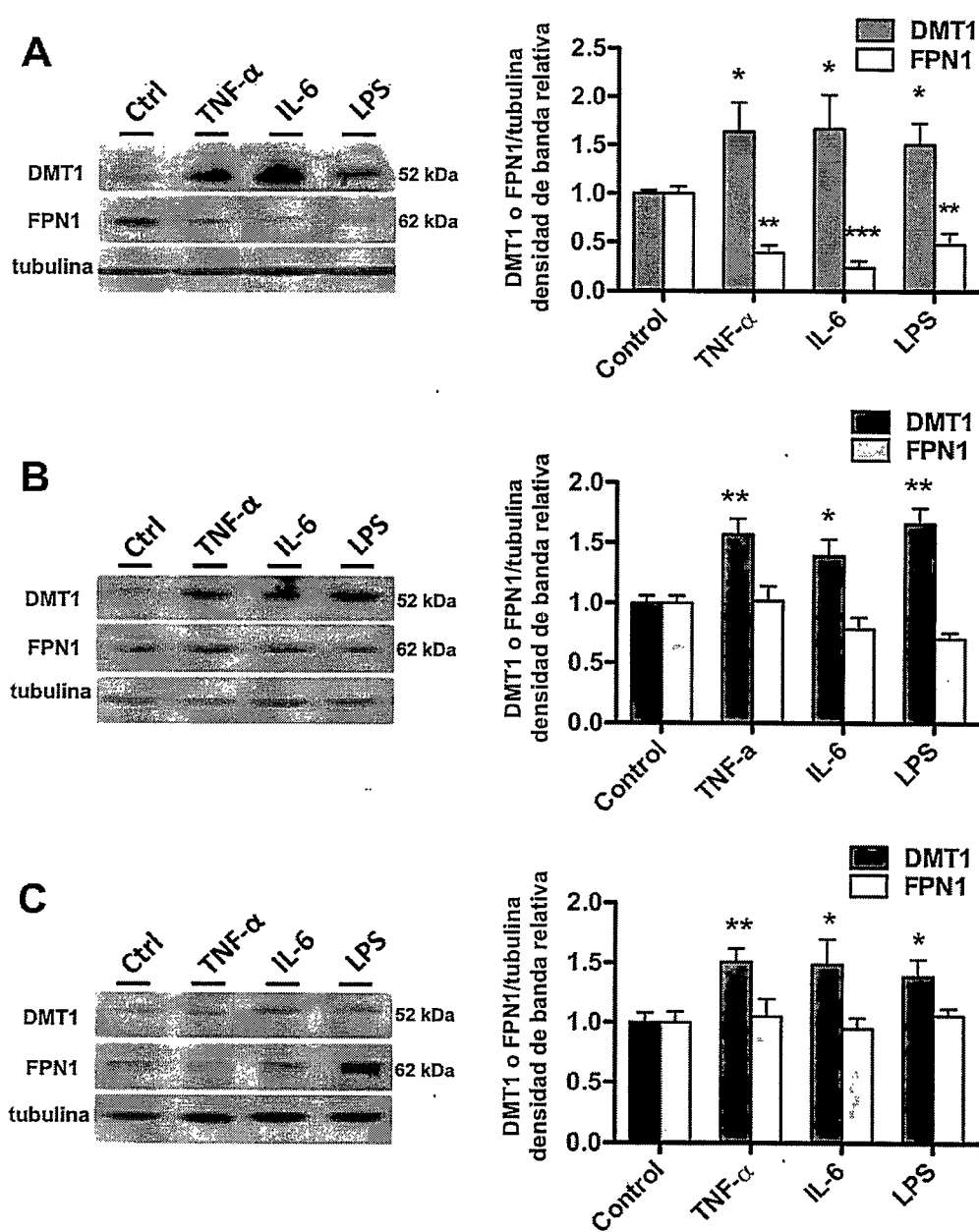


Figura 6. TNF- α , IL-6 y LPS inducen cambios en los niveles de proteína de los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC. Neuronas hipocámpicas (A), astrocitos corticales (B) y microglías corticales (C) fueron tratadas con TNF- α (50 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml) o LPS (1 μ g/ml) durante 18 hrs., los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 fueron analizados por *Western blot*. El panel de la izquierda muestra *blots* representativos y el panel derecho muestra la cuantificación de la densidad de banda. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 4). *P< 0,05; **P< 0,01 y ***P< 0,001 comparado al control. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

El análisis de la expresión de DMT1 y FPN1 a través de inmunocitoquímica mostró resultados similares. En neuronas, microglías y astrocitos se observa un incremento en la inmunotinción para DMT1 frente a todos los tratamientos, mientras que en neuronas se observa una disminución de la inmunotinción para FPN1 (Figura 7).

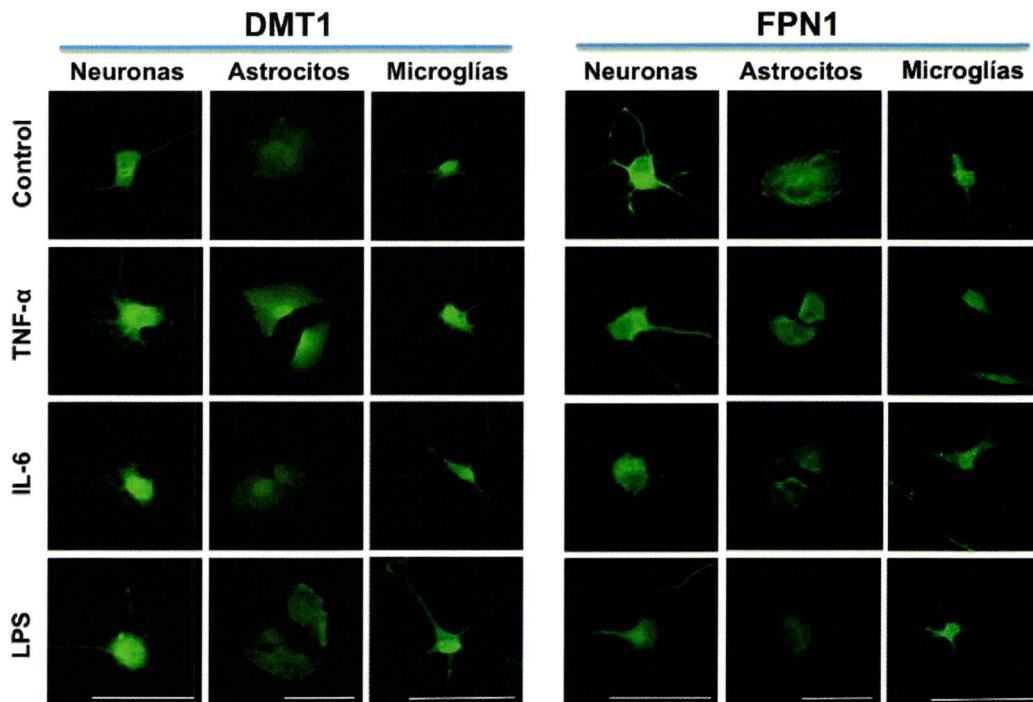


Figura 7. Expresión de DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS visualizadas por inmunocitoquímica. Neuronas hipocampales, astrocitos corticales y microglías corticales fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) o LPS (1 μ g/mL) durante 18 hrs, analizando los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 por inmunocitoquímica (verde). Para determinar el tipo celular, las células fueron co-teñidas usando marcadores específicos de linaje Tuj1 (neuronas), GFAP (astrocitos) y Cd11b (microglías) (datos no mostrados). Barra = 50 μ m. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

Con el fin de determinar si los cambios inducidos por el tratamiento con TNF- α , IL-6 o LPS en los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 se deben a cambios en la expresión, se analizaron los niveles del ARNm a través de RT-PCR, usando partidores específicos

para cada uno de ellos (Figura 8). En neuronas tanto el tratamiento con TNF- α , IL-6 o LPS incrementó los niveles del mensajero de DMT1, mientras que no se observaron diferencias en los niveles del mensajero de FPN1 (Figura 8A). En astrocitos, similar a lo observado en neuronas, los tres tratamientos generaron un incremento significativo en los niveles del mensajero de DMT1, mientras que sólo el tratamiento con LPS disminuyó los niveles del mensajero de FPN1 (Figura 8B).

Con respecto a las microglías, los tres tratamientos también generaron un incremento significativo en los niveles de ARNm para DMT1, mientras que los tratamientos con TNF- α o LPS generaron una disminución significativa en los niveles del mensajero de FPN1 (Figura 8C).

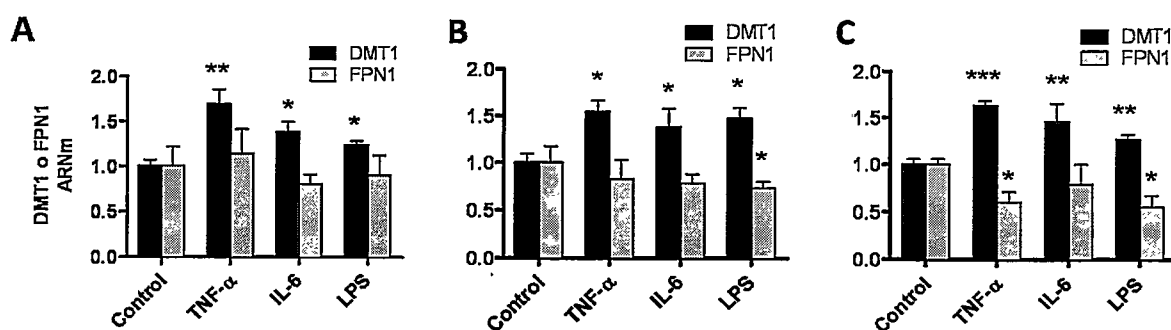


Figura 8. TNF- α , IL-6 y LPS inducen cambios en los niveles de ARNm de los transportadores de hierro DMT1 y FPN1 en células derivadas del SNC. Neuronas hipocampales (A), astrocitos corticales (B) y microglías corticales (C) fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) o LPS (1 μ g/mL) durante 18 hrs. Los cambios en los niveles de ARNm de DMT1 y FPN1 fueron analizados por RT-PCR. Los paneles muestran la cuantificación de la densidad de banda relativa al control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 4). *P < 0,05; **P < 0,01 y ***P < 0,001 comparado al control. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

Para determinar si los cambios en la expresión de los transportadores de hierro, inducidos por las citoquinas pro-inflamatorias o el LPS resultan en acumulación de hierro, se analizó el contenido total de hierro celular a través de espectroscopia de absorción atómica.

El tratamiento con TNF- α , IL-6 o LPS durante 18 horas, incrementó significativamente el contenido celular total de hierro en neuronas y microglías, pero no en astrocitos (Figura 9). Luego de los tratamientos, el contenido de hierro en microglías fue cercano a 400 ng de Fe por mg de proteína, mientras que en neuronas el contenido de hierro incremento desde 60 a 100-120 ng de Fe por mg de proteína. En astrocitos el contenido celular de hierro se mantuvo en 45-50 ng de Fe por mg de proteína.

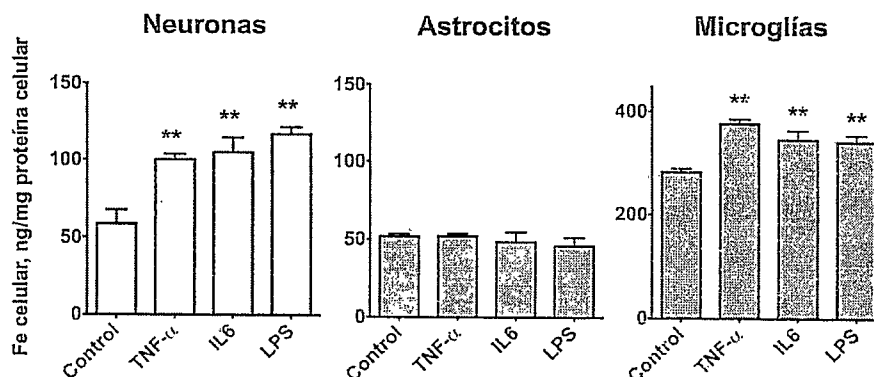


Figura 9. Estímulos inflamatorios inducen cambios en el contenido intracelular de hierro. Neuronas hipocampales, astrocitos corticales y microglías corticales fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), o LPS (1 μ g/mL) durante 18 hrs, posteriormente el contenido total de hierro fue determinado a través de espectrometría de absorción atómica. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). **P< 0,01 comparado al control correspondiente. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

Como se mencionó anteriormente hepcidina es un posible conector entre la inflamación y la homeostasis de hierro. Por lo cual nos interesó determinar el tipo celular productor de hepcidina en el cerebro, en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios y hierro (Figura 10).

Astrocitos (Figura 10A) y microglías (Figura 10B) tratados por 2 horas con IL-6, TNF- α , Fe o LPS incrementaron significativamente los niveles de ARNm de hepcidina. Tantos los niveles basales de ARNm de hepcidina como los estimulados fueron más altos en astrocitos que en microglías (Figura 10C). En neuronas no se detectó el ARNm para hepcidina tanto en condiciones basales como frente a los diferentes tratamientos (datos no mostrados).

El tratamiento con IL-6, TNF- α , hierro o LPS también incrementó los niveles de proteína para hepcidina en astrocitos y microglías, detectados a través de inmunocitoquímica contra hepcidina en los diferentes cultivos celulares (Figura 10D).



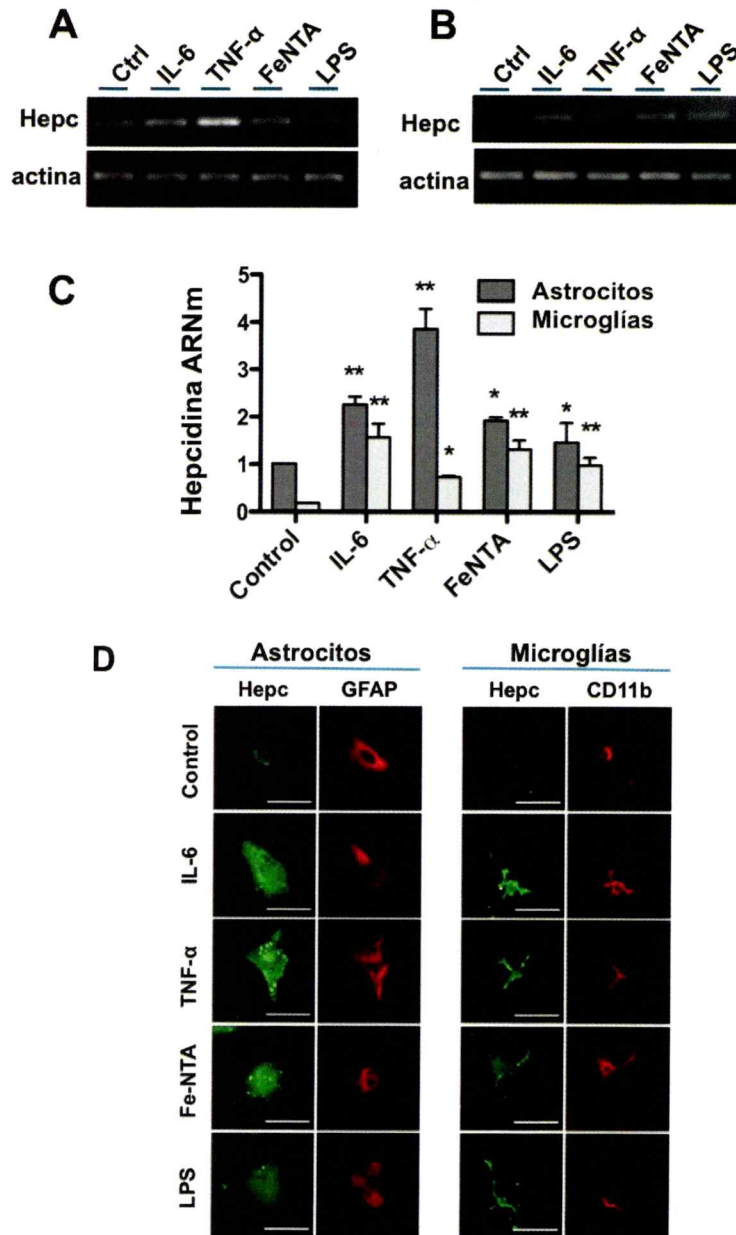


Figura 10. Estímulos inflamatorios inducen la expresión de hepcidina en astrocitos y microglías. Expresión de ARNm para hepcidina en astrocitos (A) y microglía (B) después del tratamiento con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), Fe-NTA (40 μ M) o LPS (1 μ g/mL) durante 2hrs. (C) Cuantificación de la intensidad de banda para los niveles de ARNm de hepcidina relativos a astrocitos no tratados. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P< 0,05; **P< 0,01 comparado al control. (D) Inmunofluorescencia para hepcidina (verde) en astrocitos y microglías tratados con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), Fe-NTA (40 μ M) o LPS (1 μ g/ml) durante 2 hrs. La co-tinción con GFAP o CD11b (rojo) fue utilizada para la identificación de astrocitos y microglías, respectivamente. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

Lo siguiente a evaluar fue el efecto de hepcidina sobre los niveles de expresión de DMT1 y FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías. Se desarrollo un experimento preliminar para determinar la concentración de hepcidina a utilizar y el periodo de tiempo del tratamiento, analizando su efecto en la degradación de FPN1 (Figura 11). Cultivos de neuronas hipocampales tratados durante 6 horas con hepcidina a dos concentraciones, 350 nM y 700 nM, mostraron una disminución de los niveles de FPN1 de un 50% y 65% respectivamente (Figura 11A). Se utilizó la concentración de 350 nM debido a que corresponde a un valor fisiológico observable durante inflamación (Ganz y cols. 2008).

Posteriormente se evaluó el tiempo de tratamiento en neuronas, astrocitos y microglías. Se observó que en los tres tipos celulares el máximo efecto en la disminución de FPN1 fue a las 6 horas de tratamiento, recuperándose a los niveles basales luego de 48 horas post-tratamiento (Figura 11B).

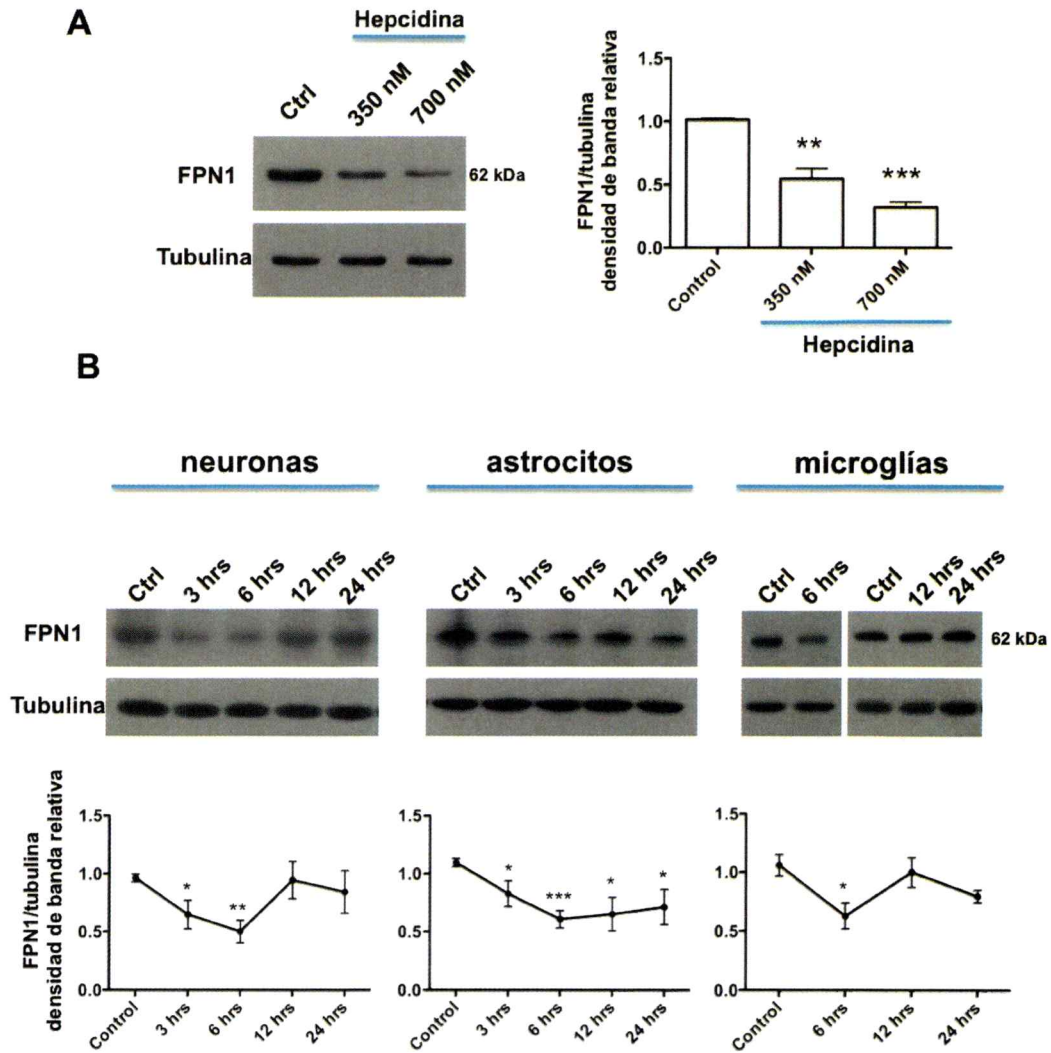


Figura 11. Dependencia del tiempo y la concentración de la disminución de FPN1 mediada por hepcidina en células derivadas del sistema nervioso central. (A) Neuronas hipocámpales fueron tratadas con hepcidina (350 or 700 nM) durante 6 h y los niveles de FPN1 fueron analizados por *western blot* (B). Neuronas hipocámpales, astrocitos corticales y microglías corticales fueron tratadas con hepcidina (350 nM) durante 3-24 hrs y los niveles de FPN1 fueron analizados por *Western blot*. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P<0,05; **P<0,01 y ***P<0,001 comparado al control. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

De acuerdo a los resultados preliminares se trataron cultivos de neuronas, astrocitos y microglías con 350 nM de hepcidina durante 6 horas y se evaluó el efecto en los transportadores de hierro FPN1 y DMT1.

El tratamiento con hepcidina indujo una reducción significativa de FPN1 de aproximadamente 50 % en neuronas (Figura 12A), astrocitos (Figura 12B) y microglías (Figura 12C). Adicionalmente, el tratamiento con hepcidina generó un incremento en los niveles de DMT1 en microglías, no así en neuronas o astrocitos.

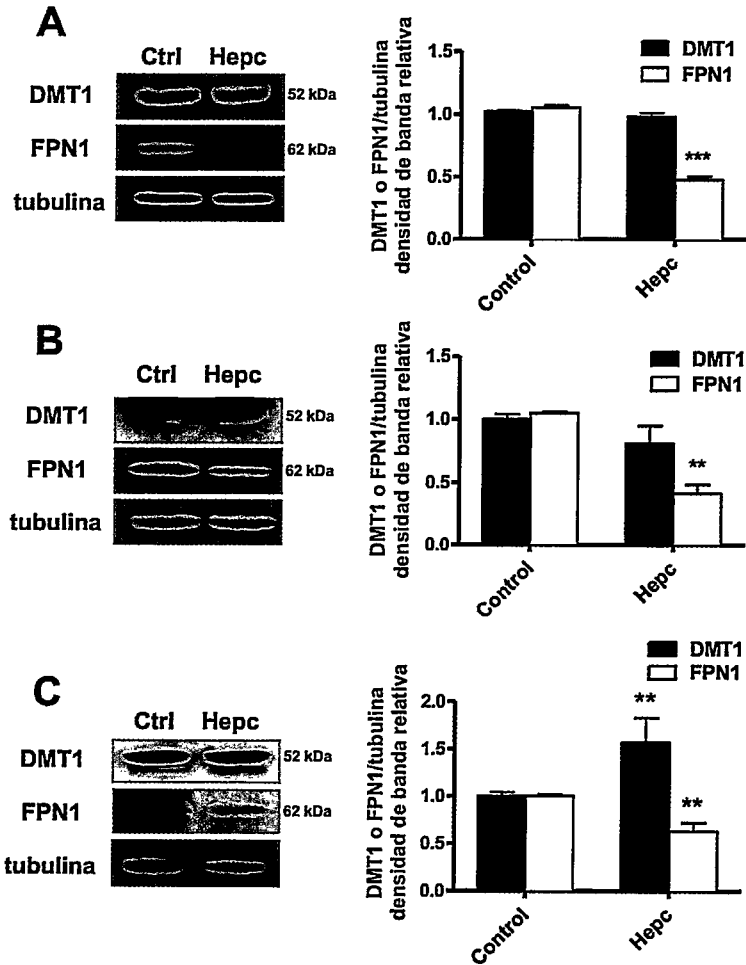


Figura 12. Hepcidina induce cambios en FPN1 en células derivadas del SNC. Neuronas hipocámpales (A), astrocitos corticales (B) y microglías corticales (C) fueron tratadas con hepcidina 350 nM durante 6 hrs, posteriormente la expresión de DMT1 y FPN1 fue analizada por *Western blot*. Los paneles de la izquierda muestran *blots* representativos de cada tipo celular y los paneles de la derecha muestran la cuantificación de la intensidad de banda de DMT1 y FPN1. Los valores representan el promedio \pm SEM ($n=6$). ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado al control. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

El análisis a través de inmunocitoquímica mostró resultados similares. El tratamiento con hepcidina reduce la inmunotinción de FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías, junto con un incremento en la inmunodetección de DMT1 en microglías (Figura 13)

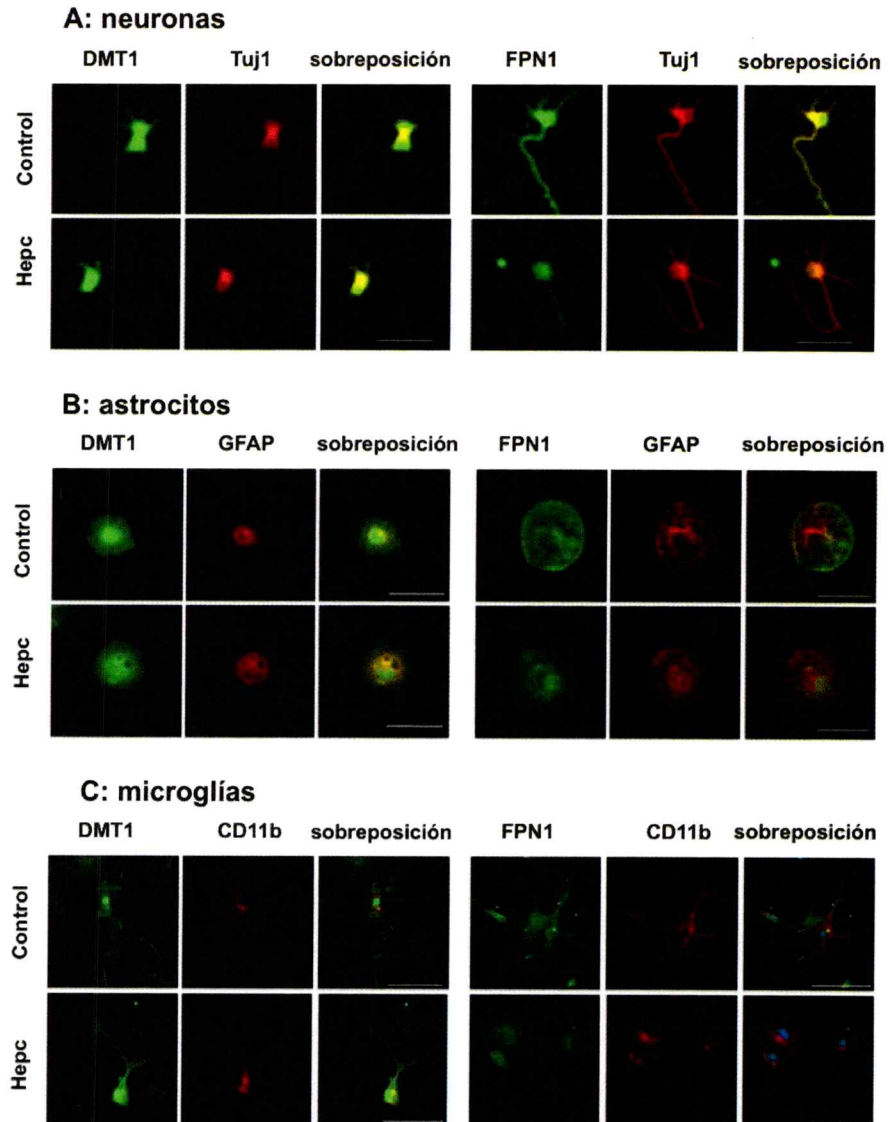


Figura 13. Inmunodetección de FPN1 y DMT1 en células derivadas del SNC tratadas con hepcidina. Neuronas hipocampales (A), astrocitos corticales (B) y microglías corticales (C) fueron tratadas con hepcidina 350 nM durante 6 hrs y posteriormente la expresión de DMT1 y FPN1 (verde) fue analizada por inmunofluorescencia. Para determinar el tipo celular, las células fueron co-teñidas usando marcadores específicos de linaje (rojo): Tuj1 (neuronas), GFAP (astrocitos) y Cd11b (microglías). TOPRO (azul) fue utilizado para marcar núcleo. Barra = 50 μ m. Modificado de (Urrutia y cols. 2014).

Estos resultados pueden ser relevantes en EA donde ha sido ampliamente reportado en pacientes un incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y una

desregulación de la homeostasis de hierro, observándose depósitos de este metal en las placas amiloides, ovillos neurofibrilares y en las regiones lesionadas (Smith y cols. 1997a, Bush 2013). Esta acumulación de hierro se cree que podría participar en la generación de estrés oxidativo lo que llevaría a producir daño celular y tisular (Rolston y cols. 2009).

Sobre la base de los antecedentes, evaluamos el efecto de las citoquinas proinflamatorias en el tono oxidativo de neuronas hipocampales. Para ello utilizamos una técnica desarrollada recientemente en donde es posible obtener la relación entre grupos tioles oxidados y reducidos presentes en proteínas utilizando maleimididas conjugadas con fluoróforos y así obtener información del estado redox de la célula (Horowitz y cols. 2011). Observamos que un tratamiento por 30 min con TNF- α , IL-6 o LPS induce un incremento en la relación de tioles oxidados/reducidos de la célula, probablemente debido a un aumento en la producción de ROS (Figura 14). Este incremento se mantuvo luego de 1 hora post-tratamiento. Estos cambios rápidos en el tono redox de la células podrían ser producto de la activación de la NADPH oxidasa (NOX), ya que se ha reportado que ciertas citoquinas como la IL-6 pueden producir ROS a través de la activación de la NOX neuronal (Dugan y cols. 2009).

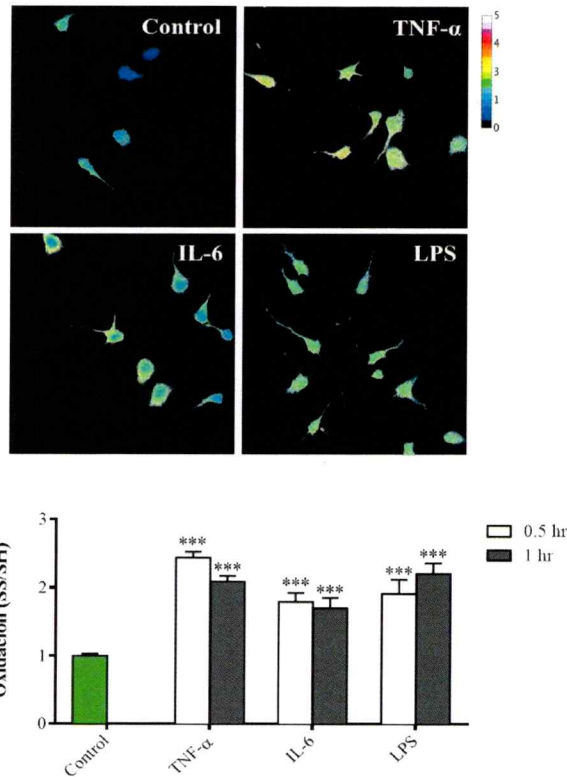


Figura 14. TNF- α , IL-6 y LPS inducen cambios en el tono redox de neuronas hipocampales. Neuronas hipocampales fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) o LPS (1 μ L/mL) durante 30 minutos o 1 hora. El estado de oxidación celular fue determinado utilizando maleimidias conjugadas con fluoróforos que reaccionan con los grupos tioles presentes en proteínas. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la intensidad de la razón de oxidación (SS/SH). En el panel inferior se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de tioles oxidados dividida por la intensidad de fluorescencia de tioles reducidos normalizado por el control. Los valores representan el promedio \pm SEM ($n=30$ por condición). *** $P < 0,001$ comparado al control.

A continuación utilizando la misma técnica se evaluó el efecto de las citoquinas TNF- α e IL-6 y de LPS en el tono redox de neuronas hipocampales luego de 18 horas de tratamiento en presencia o ausencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC), con el fin de determinar si el cambio en el tono redox se debe a la producción de ROS y si este cambio puede ser revertido con el uso de antioxidantes (Figura 15).

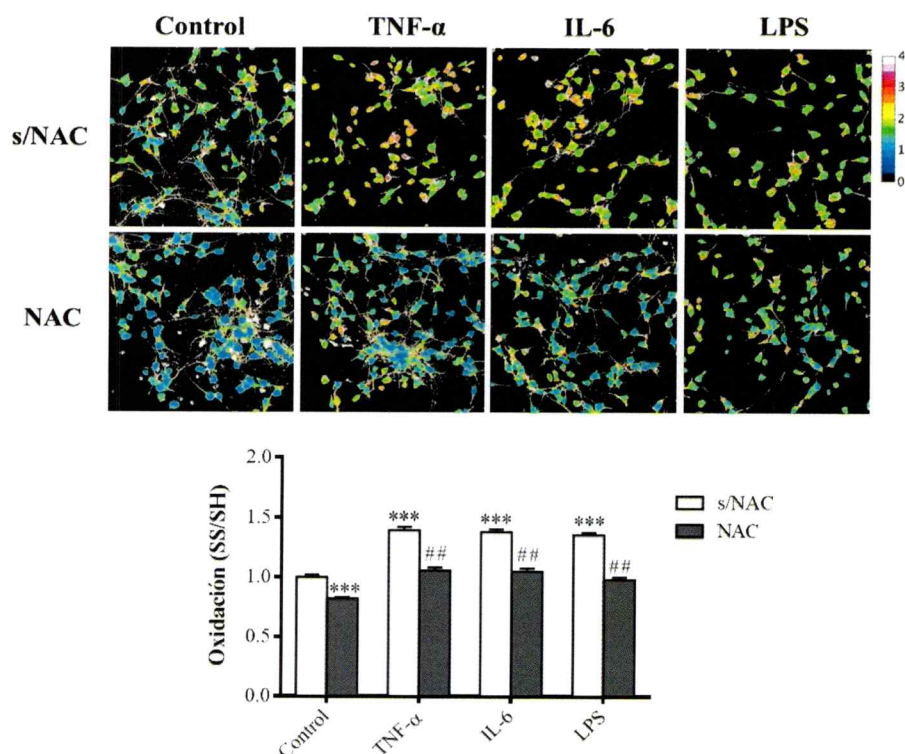


Figura 15. TNF- α , IL-6 y LPS inducen cambios en el tono redox de neuronas hipocampales. Neuronas hipocampales fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) o LPS (1 μ g/mL) durante 18 horas en presencia o ausencia de N-acetilcisteína (NAC) 0,5 mM. El estado de oxidación celular fue determinado utilizando maleimidias conjugadas con fluoróforos que reaccionan con los grupos tioles presentes en proteínas. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la intensidad de la razón de oxidación (SS/SH). En el panel inferior se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de tioles oxidados dividida por la intensidad de fluorescencia de tioles reducidos normalizado por el control. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 120 por condición). *** P<0,001 comparado al control, ### P<0,001 comparado por tratamiento en presencia y ausencia de NAC.

Se observó que TNF- α , IL-6 y LPS mantuvieron el incremento en la relación oxidado/reducido, en neuronas hipocampales luego de 18 horas de tratamiento. El tratamiento con NAC 30 minutos antes del estímulo con citoquinas, disminuyó la relación oxidado/reducido en situación control, así como también previno el incremento del estado oxidado de las células inducido por las citoquinas y el LPS.

Estos cambios en el tono redox podrían reflejar la producción de ROS inducida por hierro. Para evaluar este fenómeno, neuronas hipocámpales fueron tratadas con TNF- α , IL-6 o LPS durante 18 horas y luego cargadas con la sonda DCDHF-DA. La DCDHF-DA es hidrolizada al interior de la célula al compuesto no fluorescente 2',7'-dihidrofluoresceína el cual emite fluorescencia al ser oxidado por ROS a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). La oxidación de 2',7'-dihidrofluoresceína es llevada a cabo selectivamente por el radical hidroxilo o por peroxinitrito en tanto el superóxido y el peróxido de hidrógeno no son efectivos (Setsukinai y cols. 2003). Por lo tanto, la fluorescencia emitida por la DCF refleja probablemente la producción de radical hidroxilo mediada por la reacción de Fenton (Nunez y cols. 2004). Una vez cargadas las células con la sonda, se registró la intensidad de fluorescencia de la DCF luego de un tratamiento agudo con 20 μ M de hierro. Observamos que las células previamente tratadas con TNF- α , IL-6 o LPS, mostraban un incremento mayor en la intensidad de fluorescencia de la DCF que las células control (Figura 16A), indicando que en estas células hay una mayor producción de radical hidroxilo, en respuesta a la incorporación de hierro, a través de la reacción de Fenton. Como control se analizó la intensidad de fluorescencia de la DCF en ausencia de hierro, para diferenciar el efecto de la producción basal de radical hidroxilo por las células.

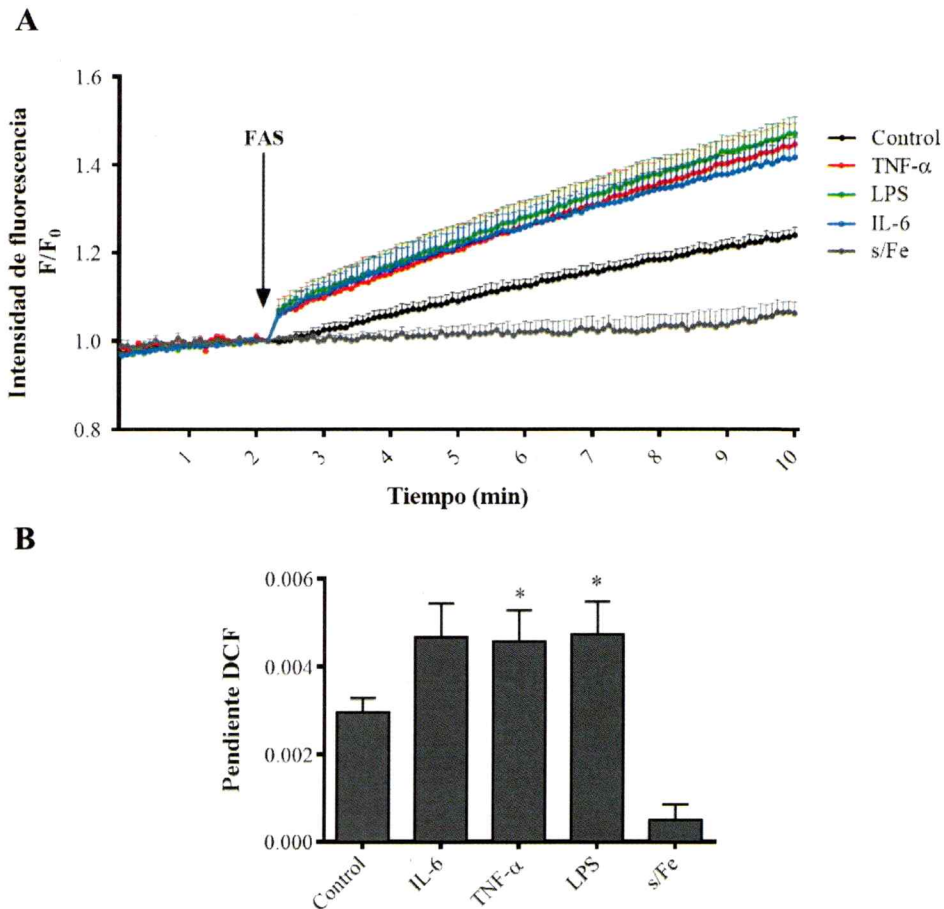


Figura 16. TNF- α , IL-6 y LPS potencian la producción de ROS generada por hierro en neuronas hipocampales. Neuronas hipocampales fueron tratadas con TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) o LPS (1 μ g/mL) durante 18 horas. Posteriormente se registró la emisión de fluorescencia de la sonda DCF inducida por el tratamiento con 20 μ M hierro FAS. Para ello se registró una línea base durante 2 minutos, tras lo cual se aplicó el hierro. En A se muestra la curva en donde cada valor de fluorescencia esta dividido por la fluorescencia inicial registrada, F/F₀. En B se muestra las pendientes de las curvas de intensidad de fluorescencia obtenidas para cada tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). *P<0,05 comparado al control.

En consecuencia, la inflamación podría inducir la producción de radical hidroxilo a través de la activación de dos vías paralelas: i) por aumento de los niveles intracelulares de hierro mediado por el incremento de la expresión de DMT1 y ii) por el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno mediados por la activación de NOX en neuronas.

Estos cambios podrían generar daño oxidativo acumulativo con el tiempo.

3.2 Efecto de hepcidina en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α inducida por el péptido β -amiloide en cultivos de astrocitos o microglías.

Recientemente se reportó una nueva función para hepcidina, relacionada a un efecto anti-inflamatorio. Por esto, se evaluó el efecto de hepcidina sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias en astrocitos o microglías tratadas con péptido $A\beta_{1-42}$. Previamente se había reportado la inducción de citoquinas pro-inflamatorias en astrocitos y microglías luego del tratamiento con $A\beta$ (Hu y cols. 1998, Floden y cols. 2005). Esta respuesta se encuentra asociada a la activación de TLR2 y TLR4, similar a lo observado para el LPS (Stewart y cols. 2010, Walter y cols. 2007, Fassbender y cols. 2004, O'Halloran y cols. 2014, Lotz y cols. 2005).

Con el fin de evaluar el rol anti-inflamatorio de hepcidina, cultivos de astrocitos corticales fueron tratados con hepcidina 350 nM, péptido $A\beta$ 2 μ g/ μ L o pre-tratados con hepcidina 2 horas y luego con $A\beta$ durante 8 horas para posteriormente analizar la expresión de IL-6 y TNF- α a través de RT-PCR (Figura 17A-B). Se utilizó como control adicional la secuencia inversa del péptido $A\beta$, denominada $A\beta_{42-1}$.

Se observó que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ aumentó significativamente (aproximadamente 4 veces) los niveles de ARNm tanto para IL-6 como para TNF- α , mientras que el tratamiento con $A\beta_{42-1}$ no generó cambios significativos en los niveles de mensajero para

IL-6 o TNF- α , comparado a la situación control, efecto que fue prevenido parcialmente por el pre-tratamiento con hepcidina.

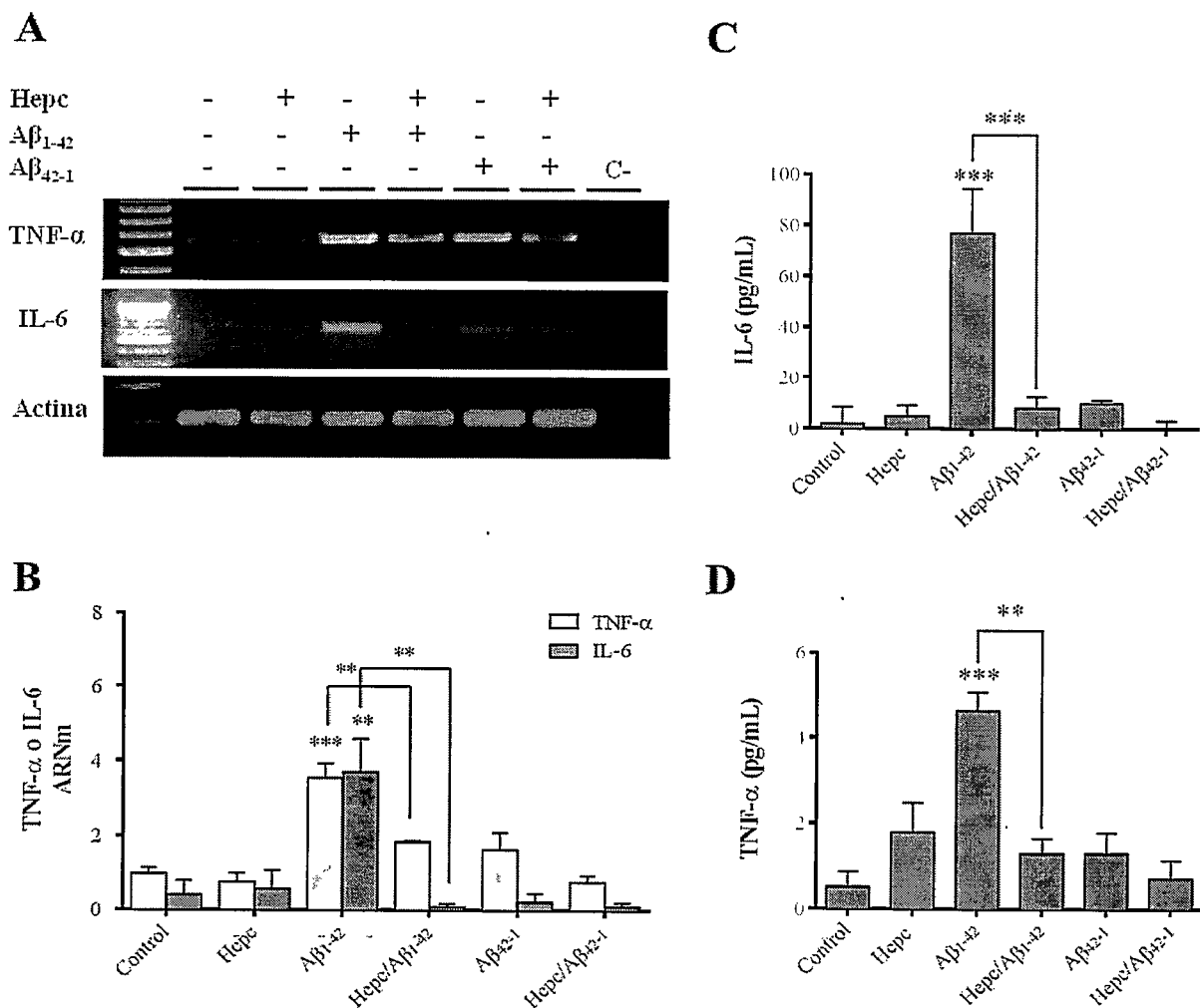


Figura 17. Hecidina reduce la expresión de TNF- α e IL-6 desde astrocitos tratados con el péptido A β . Se analizó la expresión de TNF- α e IL-6 por RT-PCR en astrocitos corticales tratados con hepcidina (350 nM), péptido A β (2 μ g/uL, 8 hrs) o pre-tratados durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 8 hrs con A β . En A se muestra una imagen representativa de la expresión de TNF- α e IL-6 a través de RT-PCR. En B se muestra la cuantificación de la intensidad de banda para los niveles de ARNm de TNF- α e IL-6. En C y D astrocitos corticales fueron tratados con hepcidina (350 nM), péptido A β (2 μ g/uL, 24 hrs) o pre-tratados durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 24 hrs con A β , la secreción de TNF- α e IL-6 fue evaluada por ELISA. En C se muestra la cuantificación de la secreción de IL-6. En D se muestra la cuantificación de la secreción de TNF- α . Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). ** P<0,01; *** P<0,001 comparado al control.

Posteriormente se evaluó la secreción de IL-6 y TNF- α mediante ELISA. Para ello, cultivos de astrocitos corticales fueron tratados con hepcidina 350 nM, péptido A β 2 μ g/ μ L o pre-tratados con hepcidina por 2 horas y luego con el péptido A β ₁₋₄₂ durante 24 horas. Los medios fueron recolectados, centrifugados y los sobrenadantes utilizados para analizar la secreción de citoquinas (Figura 17C-D). Determinamos que el péptido A β ₁₋₄₂ indujo un aumento significativo en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , mientras que el péptido A β ₄₂₋₁ no generó cambios significativos en la secreción de citoquinas comparado con la situación control. El pre-tratamiento con hepcidina redujo la secreción de citoquinas inducida por el péptido A β ₁₋₄₂.

Adicionalmente evaluamos el efecto de hepcidina sobre la expresión y secreción de IL-6 y TNF- α inducido por A β ₁₋₄₂ en cultivos primarios de microglías. Para ello, cultivos de microglías corticales fueron tratados con hepcidina 350 nM, péptido A β 2 μ g/ μ L o pre-tratados con hepcidina 2 horas y luego con A β durante 8 horas, para luego analizar la expresión de IL-6 y TNF- α a través de RT-PCR (Figura 18A-B). Similar a lo que observamos en astrocitos, las microglías tratadas con A β ₁₋₄₂ aumentaron significativamente los niveles de ARNm para IL-6 y TNF- α , mientras que A β ₄₂₋₁ no generó cambios significativos en los niveles de los mensajeros, comprado con la situación control. El pre-tratamiento con hepcidina también redujo en microglías el incremento en los niveles de expresión del mensajero para IL-6 o TNF- α inducidos por el tratamiento con A β .

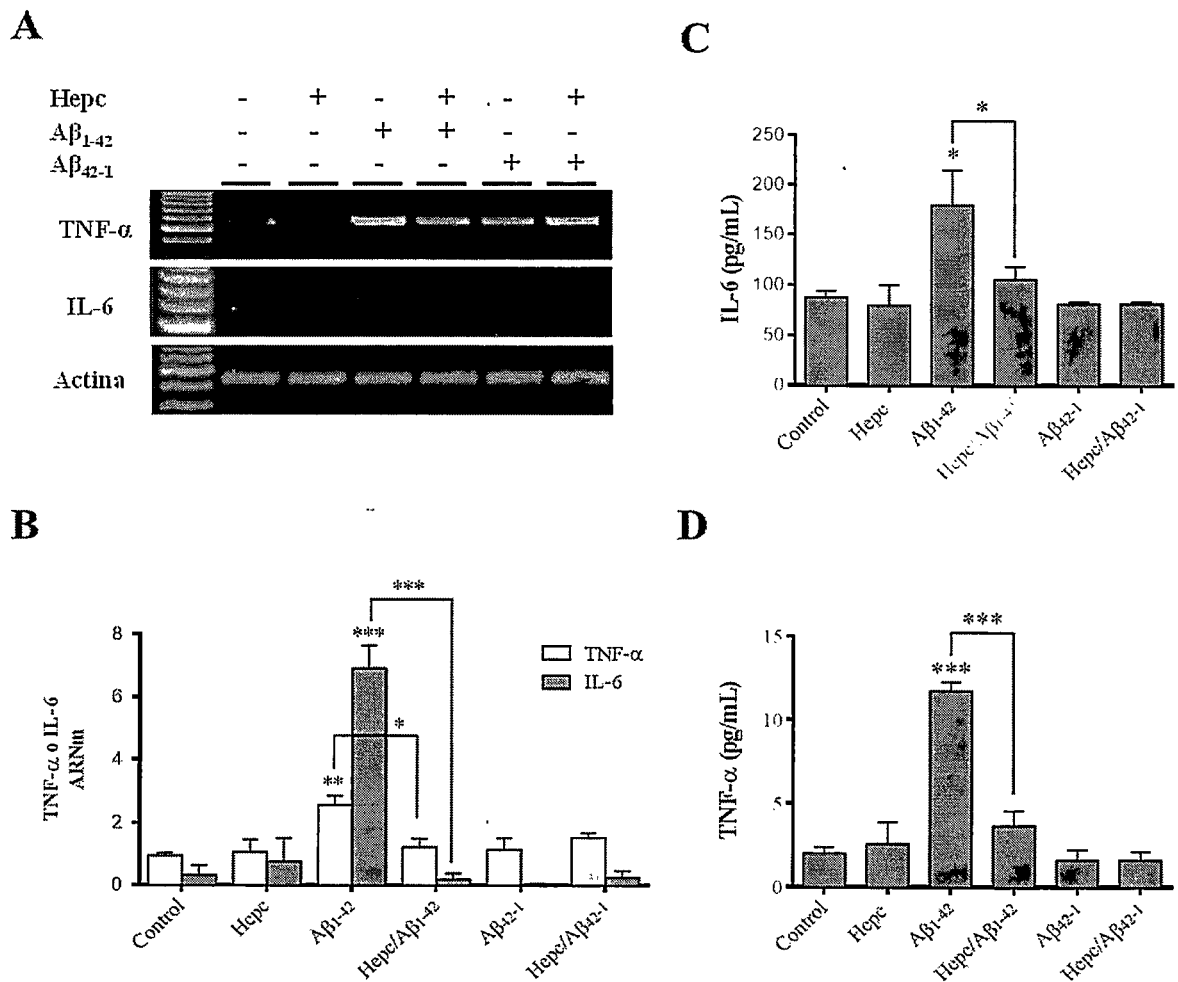


Figura 18. Hecidina reduce la expresión de TNF- α e IL-6 desde microglías tratadas con el péptido A β . En A y B microglías corticales fueron tratadas con hepcidina (350 nM), péptido A β (2 μ g/uL, 8 hrs) o pre-tratados durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 8 hrs con A β , la expresión de TNF- α e IL-6 fue evaluada por RT-PCR. En A se muestra una imagen representativa de la expresión de TNF- α e IL-6 a través de RT-PCR. En B se muestra la cuantificación de la intensidad de banda para los niveles de ARNm de TNF- α e IL-6. En C y D astrocitos corticales fueron tratadas con hepcidina (350 nM), péptido A β (2 μ g/uL, 24 hrs) o pre-tratados durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 24 hrs con A β , la secreción de TNF- α e IL-6 fue evaluada por ELISA. En C se muestra la cuantificación de la secreción de IL-6. En D se muestra la cuantificación de la secreción de TNF- α . Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 comparado al control.

Se analizó la secreción de IL-6 y TNF- α en los medios de cultivos de microglías tratadas con A β ₁₋₄₂. Se observó que los cultivos de microglías secretan basalmente

aproximadamente 80 pg/mL de IL-6. El tratamiento con A β ₁₋₄₂ incrementa este a 180 pg/mL. Con respecto a TNF- α se observó que el A β ₁₋₄₂ incrementa los niveles a 12 pg/mL. En el caso del tratamiento utilizando A β ₄₂₋₁ no se observaron diferencias significativas en la secreción tanto para IL-6 como TNF- α . El pre-tratamiento con hepcidina redujo el incremento tanto de la secreción de IL-6 como TNF- α , inducido por el tratamiento con A β ₁₋₄₂ a valores similares al control (Figura 18C-D).

En resumen, los datos indican que hepcidina reduce la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α inducida por el tratamiento con A β ₁₋₄₂ en astrocitos y microglías.

3.3 Efecto en el estrés oxidativo y muerte de neuronas expuestas a medios condicionados por glías tratadas con el péptido β -amiloide y/o hepcidina.

Lo siguiente a evaluar el efecto de los medios condicionados de astrocitos y microglías tratados con el péptido A β ₁₋₄₂ sobre la viabilidad neuronal, así como la generación de estrés oxidativo. Adicionalmente se analizó el posible rol protector de hepcidina a través de la disminución de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias. Para ello, astrocitos corticales fueron tratados con hepcidina 350 nM, péptido A β 2 μ g/ μ l o pre-tratados con hepcidina 2 horas y luego con A β durante 24 horas. Los medios condicionados recolectados fueron colocados sobre un cultivo de neuronas hipocampales de 7 DIV durante 48 horas. Se evaluó el efecto de los medios condicionados en la generación de estrés oxidativo, a través de análisis de la inmunoreactividad para 4-

hidroxi-2-nonenal (4-HNE), un hidroxialquenal α,β -insaturado que es producto de la peroxidación lipídica celular. Además, evaluamos la viabilidad neuronal (Figura 19).

Se observó que el medio condicionado obtenidos desde astrocitos corticales tratados con $A\beta_{1-42}$ indujo un incremento significativo en la inmunoreactividad contra 4-HNE (Figura 19A-B), indicando un aumento en el estrés oxidativo de las neuronas. El medio condicionado obtenido desde astrocitos tratados con $A\beta_{42-1}$ no generó cambios significativos en la inmunoreactividad contra 4-HNE. Los medios condicionados desde astrocitos que fueron pre-tratados con hepcidina y luego con $A\beta_{1-42}$ mostraron una inmunoreactividad contra 4-HNE similar a lo observado en la condición control.

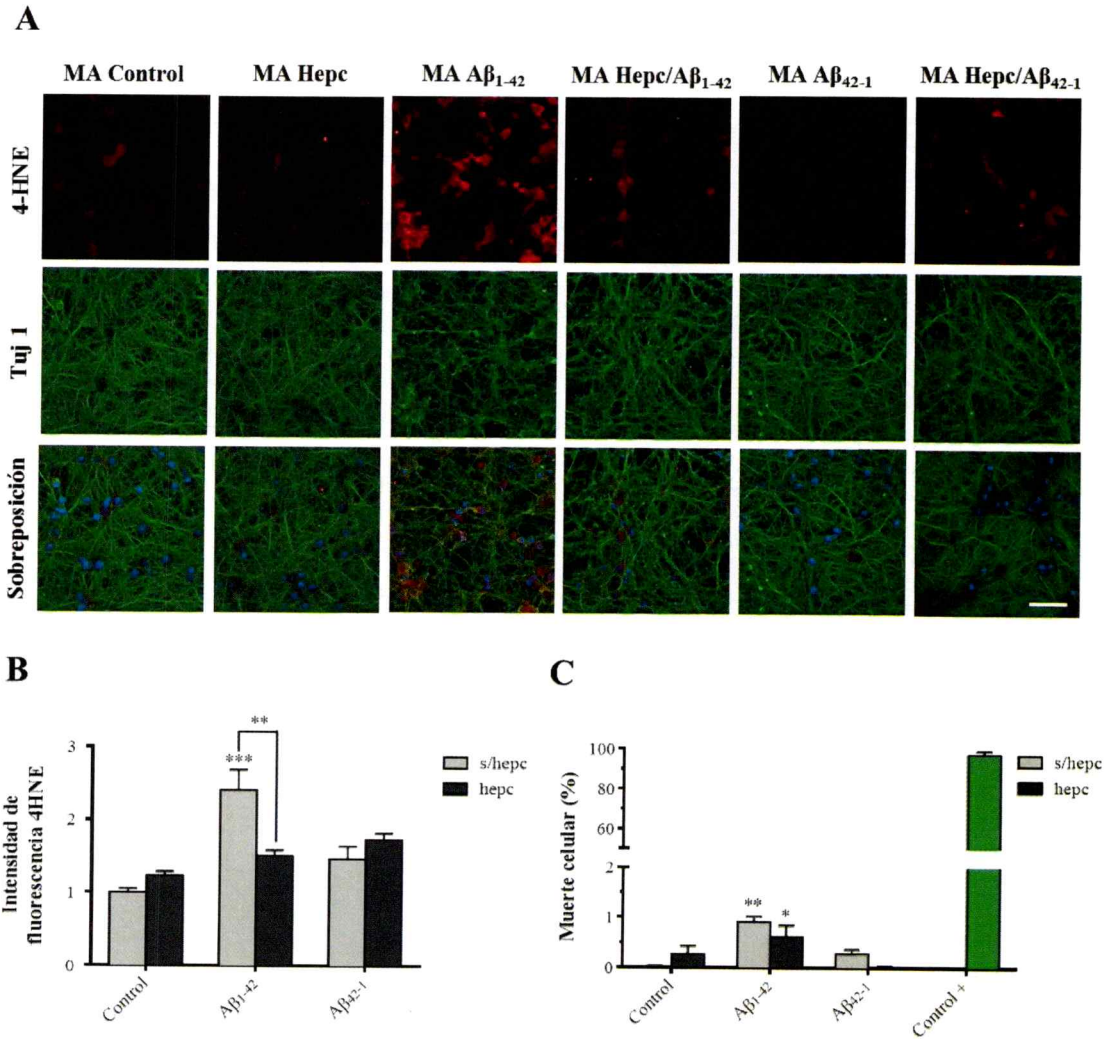


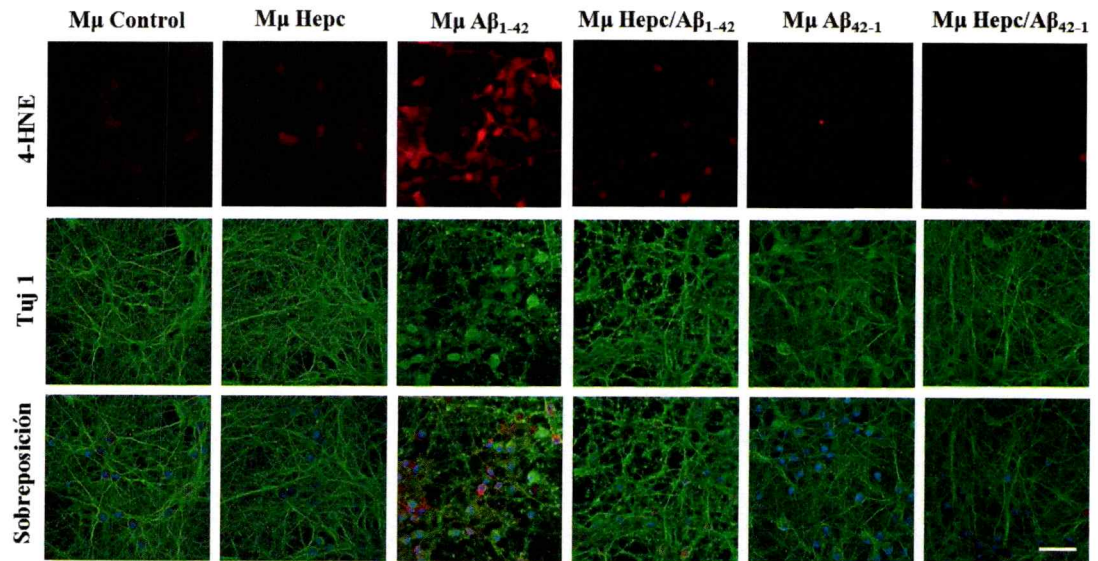
Figura 19. Hepcidina reduce el daño oxidativo en neuronas hipocámpales incubadas con el medio condicionado por astrocitos tratados con el péptido A β . Astrocitos corticales fueron tratados con hepcidina (350 nM), péptido A β (2 μ g/uL, 24 hrs) o pre-tratados durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 24 hrs con A β . Los medios obtenidos fueron centrifugados y el sobrenadante fue utilizado como medio condicionado. Neuronas hipocámpales de 7 DIV fueron incubadas con estos medios condicionados durante 48 horas. La producción de aductos de 4-HNE (peroxidación lipídica) fue analizada por inmunofluorescencia para evaluar daño oxidativo así como también la viabilidad celular luego del tratamiento. En A se muestra una imagen representativa de la inmunofluorescencia contra 4-HNE (rojo) Tuj1 (verde) y TOPRO (azul). En B se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para 4-HNE y en C se muestra la viabilidad celular a través de ensayo calceína/yoduro de propidio. Los valores representan el promedio \pm SEM (n= 3). * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 comparado al control. Barra = 50 μ m. MA= Medio condicionado de astrocitos.

Adicionalmente, las células tratadas con medios condicionados de astrocitos con $A\beta_{1-42}$, mostraron una morfología alterada en donde se pueden apreciar la pérdida de neuritas así como también la presencia de vesiculaciones (Figura 19A). Este fenómeno es menor en células tratadas con los medios condicionados de astrocitos con $A\beta_{1-42}$ y hepcidina.

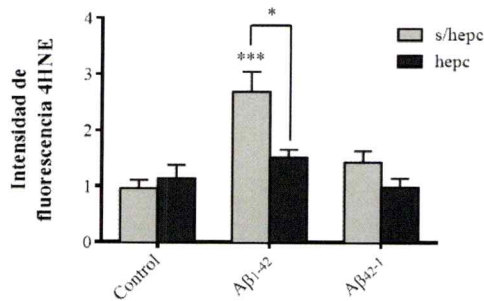
Con respecto a la viabilidad celular, se observó un leve porcentaje, 1%, de muerte neuronal producida por la incubación de medios condicionados de astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$, así como también la incubación con medios condicionados de astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$ y hepcidina mostraron el mismo porcentaje de muerte neuronal (Figura 19C).

Paralelamente se analizó el efecto de medios condicionados de microglías tratadas con $A\beta$. Microglías corticales fueron tratadas con hepcidina 350 nM, péptido $A\beta$ 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o pre-tratadas con hepcidina 2 horas y luego con $A\beta$ durante 24 horas. Los medios condicionados recolectados fueron colocados sobre un cultivo de neuronas hipocampales de 7 DIV durante 48 horas. Se analizó inmunoreactividad para 4-HNE a través de inmunocitoquímica y muerte celular a través de calceína y yoduro de propidio (Figura 20).

A



B



C

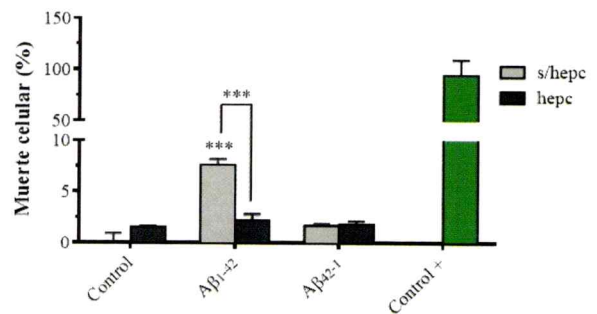


Figura 20. Hepcidina reduce el daño oxidativo en neuronas hipocampales incubadas con el medio condicionado por microglías tratadas con el péptido Aβ. Microglías corticales fueron tratadas con hepcidina (350 nM), péptido Aβ (2 μg/μl, 24 hrs) o pre-tratadas durante 2 hrs con hepcidina y luego durante 24 hrs con β-amiloide. Los medios obtenidos fueron centrifugados y el sobrenadante fue utilizado como medio condicionado. Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron incubadas con estos medios condicionados durante 48 horas. La producción de aductos de 4-HNE (peroxidación lipídica) fue analizada por inmunofluorescencia para evaluar daño oxidativo así como también la viabilidad celular luego del tratamiento. En A se muestra una imagen representativa de la inmunofluorescencia contra 4-HNE (rojo) Tuj1 (verde) y TOPRO (azul). En B se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para 4-HNE y en C se muestra la viabilidad celular a través de ensayo calceína/yoduro de propidio. Los valores representan el promedio ± SEM (n= 3). * P<0,05 y *** P<0,001 comparado al control. Barra = 50 μm. Mμ = Medio condicionado de microglías

Similar a lo observado anteriormente, se determinó que el medio condicionado obtenidos desde microglías corticales tratadas con $A\beta_{1-42}$ induce un incremento significativo en la inmunoreactividad contra 4-HNE (Figura 20A-B) y por tanto un aumento en el estrés oxidativo. Mientras que el medio condicionado obtenidos desde microglías tratadas con $A\beta_{42-1}$ no generó cambios significativos en la intensidad de fluorescencia para 4-HNE (Figura 20A-B). Así mismo los medios condicionados obtenidos desde astrocitos que fueron pre-tratados con hepcidina y luego con $A\beta_{1-42}$ mostraron una inmunoreactividad menor contra 4-HNE, similar a lo observado con el medio condicionado control.

Además las células incubadas con medios condicionados de microglías tratadas con $A\beta_{1-42}$, mostraron una morfología alterada en donde se pudo apreciar la pérdida de neuritas así como también la presencia de vesiculaciones (Figura 20A). Este fenómeno fue mayor que el observado en los medios condicionados de astrocitos, indicando un mayor daño celular. La pérdida de neuritas así como también la presencia de vesiculaciones es reducida en los medios condicionados de microglías tratados con $A\beta_{1-42}$ y hepcidina.

Con respecto a la viabilidad, se observó que la incubación con medios condicionados desde microglías tratadas con $A\beta_{1-42}$ produjo 8% de muerte neuronal, un porcentaje mayor que los medios condicionados de astrocitos. El medio condicionado de microglías tratadas con $A\beta_{1-42}$ y hepcidina produjo una muerte celular menor, de aproximadamente un 2%. Por lo tanto, hepcidina reduce la toxicidad de los medios condicionados de astrocitos y microglías tratadas con el péptido $A\beta$, probablemente a través de la

disminución de la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias que alteran la homeostasis de hierro y el estado redox celular generando daño oxidativo.

3.4 Efecto de hepcidina en la activación glial, estrés oxidativo y dishomeostasis de hierro en cerebros inyectados con péptido β -amiloide.

De acuerdo a los datos obtenidos en células, en donde encontramos que hepcidina reduce la expresión y secreción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL6 desde astrocitos y microglías tratados con A β ₁₋₄₂, así como también reduce el daño oxidativo de neuronas tratadas con estos medios condicionados, procedimos a evaluar el efecto del péptido A β ₁₋₄₂ y hepcidina en la activación glial, estrés oxidativo y dishomeostasis de hierro *in vivo*. Los experimentos correspondientes a este objetivo se realizaron en el laboratorio de Terapia Experimental de la Neurodegeneración a cargo del Dr. Etienne Hirsch en el Centro de Investigación del Instituto del Cerebro y la Médula Espinal, Hospital de la Salpêtrière, Paris, Francia. Para ello se inyectó en el ventrículo lateral derecho fibrillas del péptido A β ₁₋₄₂ sin o con hepcidina en ratones machos de 13 semanas de edad (ver Tabla 3). Se utilizó como control una inyección únicamente con la solución salina, vehículo del resto de las inyecciones y un control adicional en donde se utilizó el péptido inverso A β ₄₂₋₁.

Lo primero a evaluar fue el efecto de hepcidina sobre la expresión de GFAP en cerebros de ratones inyectados con β -amiloide a través de inmunofluorescencia (Figura 21). Se analizó la expresión de GFAP en 3 regiones del hipocampo de los ratones inyectados,

que denominamos U1, U2 y U3 (Figura 21B). U1 corresponde a una región ubicada en la zona CA1 del hipocampo. U2 corresponde a la región donde se ubica la fisura hipocámpal y U3 corresponde a la capa polimorfa del giro dentado. Se observó que aumenta la inmunoreactividad para GFAP en todas las regiones analizadas de los animales inyectados con $A\beta_{1-42}$, no así en los ratones inyectados con $A\beta_{42-1}$, indicando así la presencia de astrocitos reactivos (Figura 21A).

Así mismo se observó que el tratamiento con hepcidina también induce un aumento en la inmunoreactividad para GFAP en todas las regiones analizadas, pero este aumento es mucho menor que el observado con la inyección de $A\beta_{1-42}$. Interesantemente el pre-tratamiento con hepcidina redujo significativamente el incremento de la expresión de GFAP en la región U2, generado por la inyección con $A\beta_{1-42}$. Además, se observó una tendencia no significativa de disminución de la marca de GFAP en las regiones U1 y U3 (Figura 21C)

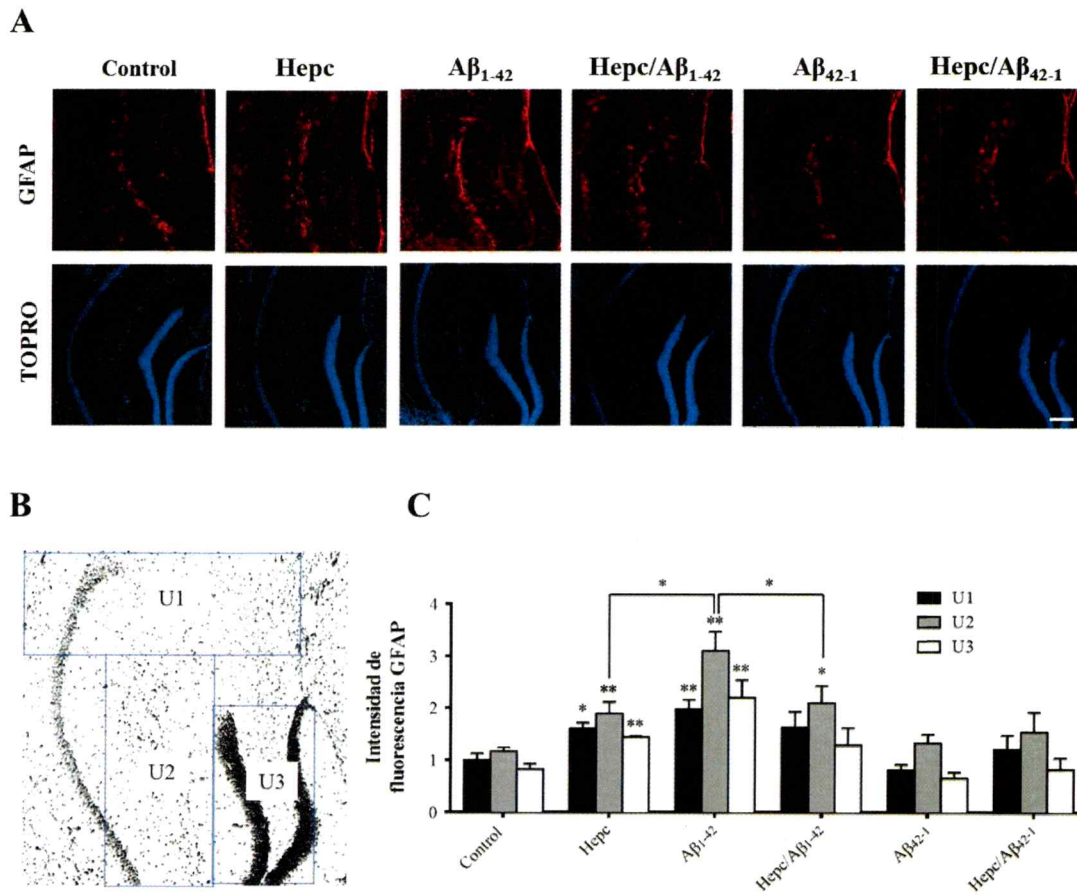


Figura 21. Hepsidina reduce la expresión de GFAP inducida por la inyección del péptido Aβ. Ratones fueron inyectados con 400 pmol de Aβ, 10 μg de hepsidina o 10 μg de hepsidina/400 pmol de Aβ en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. post-tratamiento por perfusión-fijación transaórtica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μm del hipocampo, teñido contra GFAP (astrocitos) en rojo y TOPRO (núcleo) en azul. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la tinción, en el panel inferior izquierdo se muestran las 3 áreas (U1, U2 y U3) donde fue cuantificada la intensidad de fluorescencia de la tinción. En el panel inferior derecho se muestra la cuantificación de la densidad de fluorescencia para GFAP. Los valores representan el promedio ± SEM (n= 4). *P< 0,05 comparado al control. Barra = 200 μm.

A continuación se analizó el efecto de hepcidina sobre el número de microglías Iba⁺ en cerebros de ratones inyectados con A β (Figura 22). Para este propósito, se seleccionaron dos regiones para analizar: A1 y A2, ambas ubicadas en la fisura hipocampal, ya que es la zona en donde se observaron más diferencias en cuanto a la expresión de GFAP (Figura 22B). El tratamiento con A β_{1-42} indujo un leve incremento en el número de células Iba1⁺ en la región A2, no así en región A1. Adicionalmente se observó que la inyección de A β_{42-1} también generó un leve incremento en número de células Iba1⁺, pero este no alcanzó a ser significativo comparado con el control (Figura 22A y 22C). El pretratamiento con hepcidina contrarrestó el incremento en el número de células Iba1⁺ generado por el A β_{1-42} en la región A2.

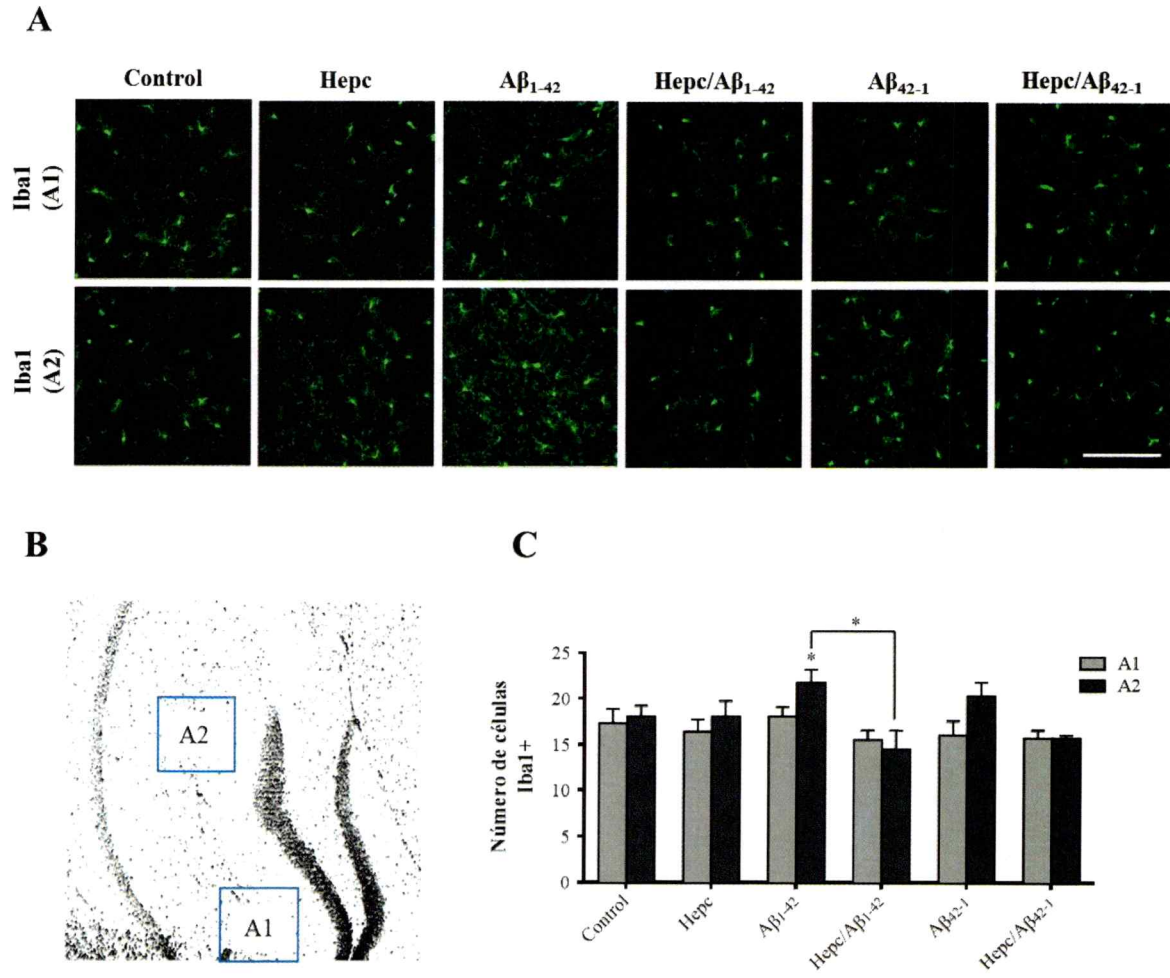


Figura 22. Hepsidina disminuye el número de microglías en cerebros de ratones inyectados con péptido Aβ. Ratones fueron inyectados con 400 pmol de Aβ, 10 μg de hepcidina o 10 μg de hepcidina/400 pmol de Aβ en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. post-tratamiento por perfusión-fijación transaórtica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μm del hipocampo, teñido contra Iba1 (microglías) en verde. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la tinción en dos áreas A1 y A2. En B se muestra la ubicación de las regiones donde fue cuantificada la intensidad de fluorescencia de la tinción. En C se muestra la cuantificación. Los valores representan el promedio ± SEM (n=4). *P<0,05 comparado al control. Barra = 100 μm.

Sobre la base de los resultados anteriores se analizó la morfología de las células Iba1⁺ en esta región, para determinar si existe activación glial en respuesta a la inyección de A β ₁₋₄₂ y si hepcidina es capaz de revertir este fenómeno. Para esto, se realizó un inmunohistoquímica utilizando DAB, el cual al oxidarse forma un precipitado insoluble sobre el tejido, proporcionando una imagen muy nítida (Figura 23).

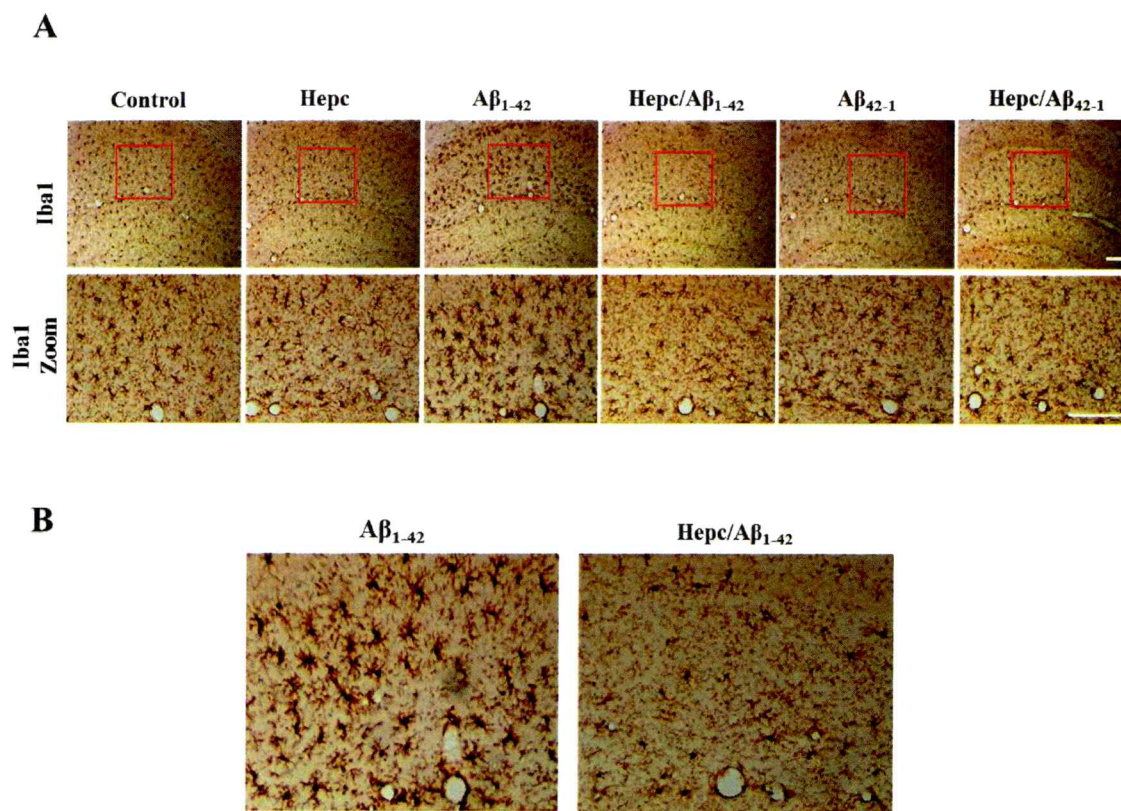


Figura 23. Hecidina reduce la activación de microglías en cerebros de ratones inyectados con péptido A β . Ratones fueron inyectados con 400 pmol de A β , 10 μ g de hepcidina o 10 μ g de hepcidina/400 pmol de A β en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. post-tratamiento por perfusión-fijación transaortica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μ m del hipocampo, teñido contra Iba1 (microglías) utilizando DAB. En A, el panel superior muestra una imagen representativa de la tinción en el hipocampo y el panel inferior se muestra un zoom de la imagen superior. En B se muestra un aumento digital de las condiciones A β ₁₋₄₂ y hepc/ A β ₁₋₄₂. (n=4) Barra = 100 μ m.

Apoyando a lo encontrado con inmunofluorescencia, se observó que la inyección intracerebroventricular con $A\beta_{1-42}$ altera la morfología de células $Iba1^+$, presentando éstas un mayor número de prolongaciones y de mayor grosor que las células $Iba1^+$ observadas en los ratones control (Figura 23A). El pre-tratamiento con hepcidina revirtió el fenómeno observado con la inyección de $A\beta_{1-42}$ (Figura 23B).

Se determinó si los cambios observados anteriormente podrían influir en la generación de estrés oxidativo en estas regiones. Para ello se analizó la inmunoreactividad para 4-HNE en el hipocampo en la región que abarca desde el giro dentado hasta la región CA1 (Figura 24). Se determinó que en hipocampo de animales inyectados con $A\beta_{1-42}$ se indujo un aumento significativo en la inmunoreactividad para 4-HNE en toda la región analizada, no así en los animales inyectados con $A\beta_{42-1}$. La inmunoreactividad para 4-HNE se observó en células que morfológicamente parecen ser neuronas. Interesantemente la inyección, sólo con hepcidina produjo un incremento no significativo, en la inmunoreactividad para 4-HNE. Similar a lo observado con la activación glial, el pre-tratamiento con hepcidina suprimió la peroxidación lipídica en los animales inyectados con $A\beta_{1-42}$.



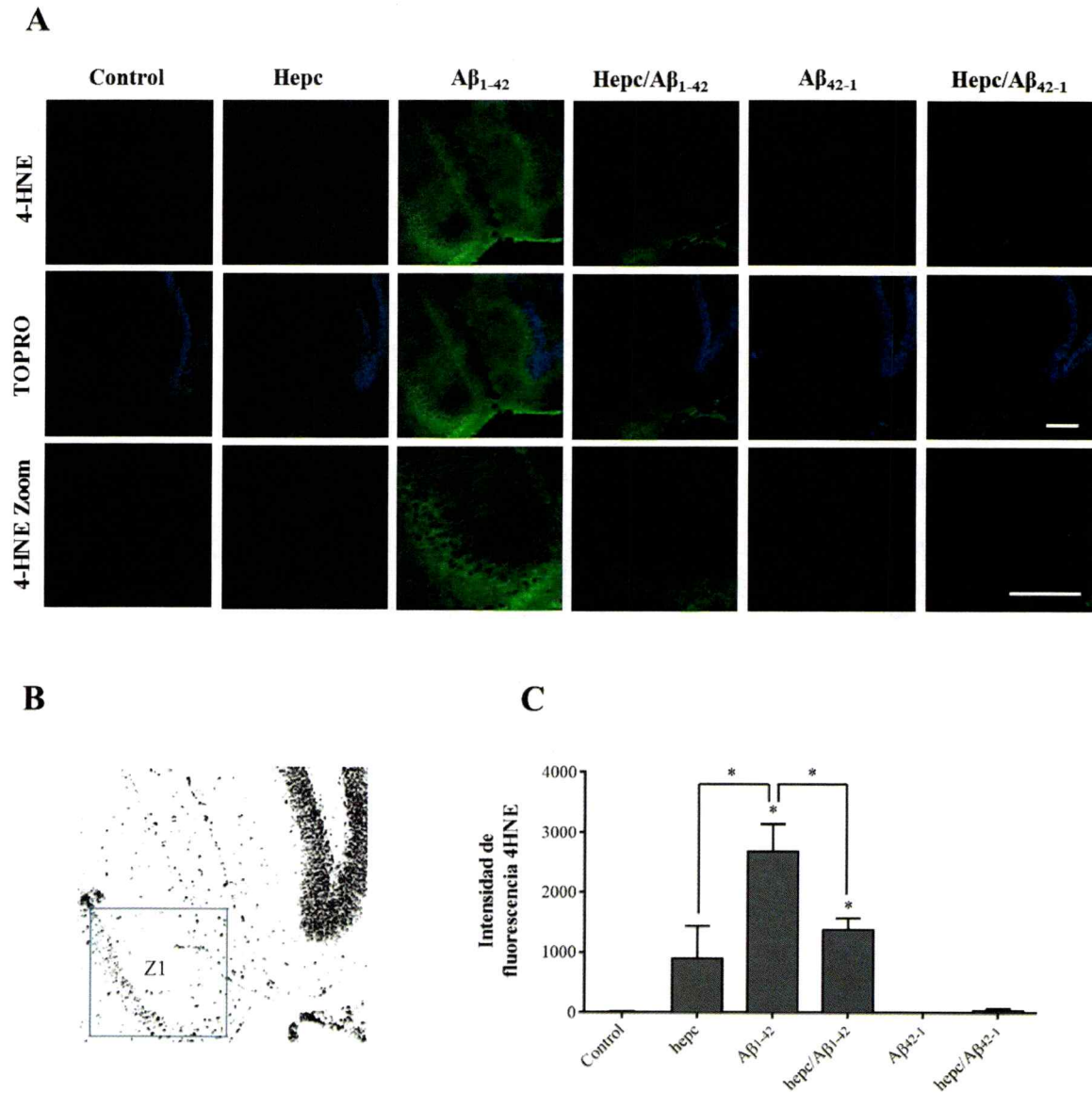
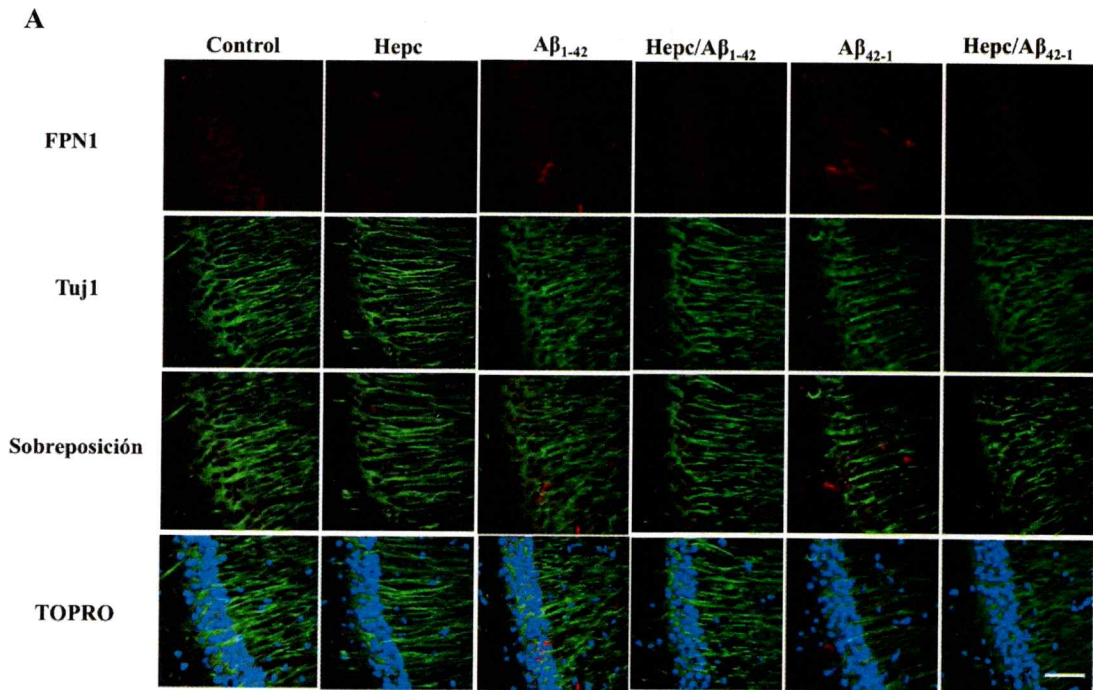


Figura 24. Hecpidina reduce el estrés oxidativo inducido por la inyección de péptido A β . Ratonos fueron inyectados con 400 pmol de A β , 10 μ g de hepcidina o 10 μ g de hepcidina/400 pmol de A β en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. Post tratamiento por perfusión-fijación transaórtica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μ m del hipocampo, teñido contra 4-HNE (peroxidación lipídica) en verde y TOPRO (núcleo) en azul. En A se muestra una imagen representativa de la tinción, en B se muestran el área donde fue cuantificada la intensidad de fluorescencia de la tinción. En C se muestra la cuantificación de la densidad de fluorescencia para 4-HNE. Los valores representan el promedio + SEM (n=4). *P<0,05 comparado al control. Barra = 100 μ m.

En conjunto, estos resultados sugieren que hepcidina reduce la activación de astrocitos y microglías así como la generación de estrés oxidativo en neuronas generado por la inyección de péptido $A\beta_{1-42}$.

A continuación se analizó el efecto del péptido $A\beta$ y hepcidina sobre la homeostasis de hierro.

El blanco molecular de hepcidina es el transportador de hierro FPN1. Por lo tanto lo primero a evaluar fue la presencia de FPN1 mediante inmunofluorescencia en la región CA1 del hipocampo de ratones inyectados con $A\beta_{1-42}$ y/o hepcidina (Figura 25A). La inyección con $A\beta_{1-42}$ generó un incremento no significativo en la intensidad de fluorescencia para FPN1, en neuronas y otros tipos celulares. Por el contrario, la inyección con $A\beta_{42-1}$ mostró resultados similares a los observados en la situación control. El tratamiento únicamente con hepcidina no generó diferencias en la inmunoreactividad de FPN1, en tanto que el pre-tratamiento con hepcidina redujo el leve incremento en la inmunoreactividad de FPN1 inducida por la inyección de $A\beta_{1-42}$.



B

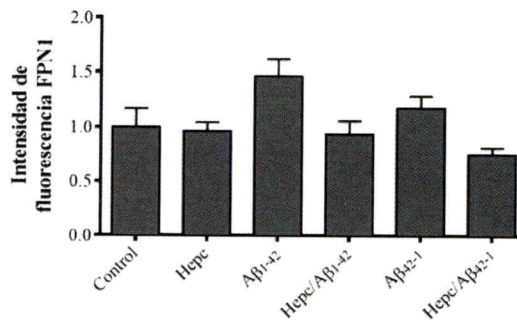


Figura 25 Hecpidina disminuye la expresión de FPN1 en cerebros de ratones inyectados con péptido A β . Ratones fueron inyectados con 400 pmol de A β , 10 μ g de hepcidina o 10 μ g de hepcidina/400 pmol de A β en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. Post tratamiento por perfusión-fijación transaórtica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μ m del hipocampo teñido contra FPN1 en rojo, Tuj1 en verde y TOPRO (núcleo) en azul. En A se muestra una imagen representativa de las tres tinciones y la sobreposición de ellas. En B se muestran la cuantificación de la densidad de fluorescencia para FPN1. Los valores representan el promedio \pm SEM (n=4). Barra = 50 μ m.

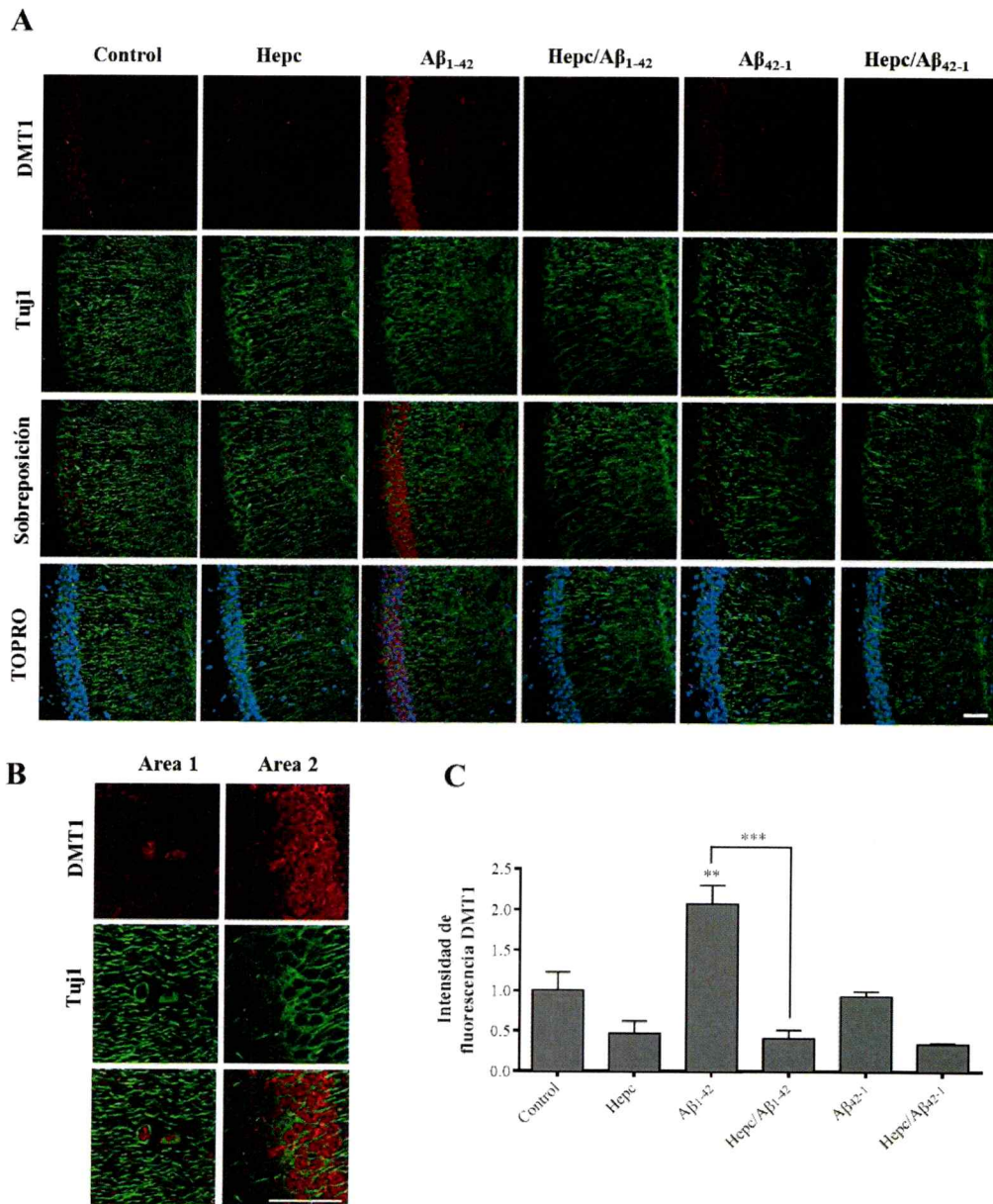


Figura 26. Hepcidina disminuye la expresión de DMT1 en cerebros de ratones inyectados con péptido A β . Ratones fueron inyectados con 400 pmol de A β , 10 μ g de hepcidina o 10 μ g de hepcidina/400 pmol de A β en una solución salina. Los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. Post tratamiento por perfusión-fijación transaortica con 4% PFA. La imagen corresponde a un corte de 20 μ m del hipocampo teñido contra panDMT1 en rojo, Tuj1 en verde y TOPRO (núcleo) en azul. En A se muestra una imagen representativa de las tres tinciones y la sobreposición de ellas. En B se muestra en detalle la expresión de DMT1 en el hipocampo de ratones inyectados con A β_{1-42} . En C se muestra la cuantificación de la densidad de fluorescencia para DMT1. Los valores representan el promedio \pm SEM (n=4). **P< 0,01; ***P<0,001 comparado al control. Barra = 50 μ m

A continuación se analizó la expresión de DMT1. Para ello se utilizó un anticuerpo, que detecta todas las isoformas del transportador (Figura 26A). Se determinó que la inyección con $A\beta_{1-42}$ indujo un aumento significativo de la expresión de DMT1 en la región CA1 del hipocampo de los ratones inyectados. DMT1 está presente tanto en neuronas, determinado por la co-tinción contra Tuj1, así como también en otros tipos celulares (Figura 26B). Adicionalmente, la inyección con hepcidina indujo una leve disminución en la inmunoreactividad de DMT1, pero esta diferencia no alcanzó a ser significativa (Figura 26C). La inyección con $A\beta_{42-1}$ no generó cambios en la expresión de DMT1, siendo los niveles de inmunoreactividad similares a lo observado en la situación control. Por otra parte, el pre-tratamiento con hepcidina redujo significativamente el incremento de la expresión de DMT1 generado por el $A\beta_{1-42}$.

En resumen, se determinó que el péptido $A\beta_{1-42}$ induce la activación de astrocitos y microglías en el hipocampo, así como también aumenta el estrés oxidativo, la expresión de FPN1 y DMT1. El pre-tratamiento con hepcidina revirtió este efecto y por tanto genera protección frente al péptido β -amiloide.

4 .DISCUSIÓN

Los procesos inflamatorios activos y la acumulación de hierro son características patognomónicas de una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA. En la EA, la inflamación es mediada por la presencia de microglías ameboides y astrocitos reactivos en la proximidad de las placas seniles, así como también por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, y TNF- α , entre otros mediadores. La desregulación de la homeostasis de hierro ha sido observada en animales transgénicos usados como modelo de la enfermedad y en tejido post-mortem de pacientes con EA. Esta desregulación se caracteriza por la acumulación de hierro en la corteza e hipocampo y por la desregulación de sus transportadores celulares. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que relacionan ambos procesos durante la neurodegeneración. En esta tesis se analizó la relación entre estímulos inflamatorios y la desregulación de la homeostasis del hierro en células del SNC, así como también el papel de hepcidina en este proceso. Adicionalmente, se evaluó el efecto del péptido A β 1-42 en la generación de citoquinas pro-inflamatorias en neuronas, astrocitos y microglías, y el rol de hepcidina como modulador de la respuesta inflamatoria inducida por A β 1-42.

Se determinó que las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , así como también el agonista de TLR-4 LPS, ejercen un profundo efecto en la homeostasis de hierro, incrementando la expresión de DMT1 y la acumulación intracelular de hierro. Se

encontró que hepcidina es expresada por astrocitos y microglías en respuesta a estímulos inflamatorios y que actúa disminuyendo la expresión de FPN1.

Adicionalmente se observó que el A β induce la producción y secreción de IL-6 y TNF- α en astrocitos y microglías. A su vez estos medios condicionados generan estrés oxidativo en neuronas, respuesta que es suprimida por hepcidina.

4.1 Relación entre la inflamación y la homeostasis de hierro.

La relación entre la inflamación y la homeostasis de hierro, evaluada a través del tratamiento *in vitro* con citoquinas pro-inflamatorias y LPS mostró ser célula-específica.

Efecto de TNF- α , IL-6 y LPS sobre DMT1. En neuronas, astrocitos y microglías el tratamiento con TNF- α , IL-6 o LPS generó un incremento de los niveles tanto proteicos como de ARNm para DMT1. Este incremento se debe probablemente, en parte, a la activación de vías de señalización que inducen la transcripción de DMT1. Previamente se ha descrito que TNF- α , IL-1 β y LPS inducen la translocación nuclear y activación del factor de transcripción NF- κ B (Hanke y Kielian 2011a, Wajant y Scheurich 2011, Pugazhenthii y cols. 2013, Yao y cols. 2014, Jeong y cols. 2014). NF- κ B ha sido reportado como un activador transcripcional de DMT1 en varios tipos celulares incluyendo neuronas (Paradkar y Roth 2006b, Paradkar y Roth 2006a, Xu y cols. 2010, Ingrassia y cols. 2012). Por lo tanto es posible que la citoquinas pro-inflamatorias a

través de la activación de NF- κ B regulen la expresión transcripcional de DMT1 en los tres tipos celulares.

El aumento de la expresión de DMT1 luego del tratamiento con citoquinas o LPS, puede deberse también a un aumento en la actividad de IRP1. En células de astrocitoma humano se ha observado que el tratamiento con IL-1 β incrementa la asociación de IRP1 al ARNm. Estos cambios no se deben a un alteración en los niveles de expresión de IRP1, sino mas bien a un aumento de su actividad IRP y una disminución su actividad aconitasa (Pintero y cols. 2000b). En macrófagos la estimulación con IFN- γ , TNF- α y LPS produce un incremento en la capacidad de unión de IRP1 e IRP2 incrementando la expresión de DMT1 (Wardrop y Richardson 2000, Yang y cols. 2002, Ludwiczek y cols. 2003, Wang y cols. 2005). Adicionalmente, el tratamiento con IL-1 β o TNF- α de cultivos primarios mesencefálicos induce un incremento en la expresión de DMT1 y TfR1 junto con una disminución de la expresión de FPN1 a través de un incremento en la niveles y la activación de IRP1 (Wang y cols. 2013). Por lo tanto la activación de IRP1 o IRP2 mediada por las citoquinas pro-inflamatorias aumentaría la traducción de DMT1 a través de la estabilización del ARNm por unión al sitio IRE en el extremo 3'UTR del mensajero.

La acumulación de hierro en neuronas y microglías ha sido ampliamente reportado en varias enfermedades neurodegenerativas. El mecanismo subyacente, podría estar asociado al aumento en los niveles de expresión de DMT1 inducido por las citoquinas pro-inflamatorias tal como sugieren los resultados de esta tesis.

El análisis de tejido post-mortem de pacientes con EP ha revelado altos niveles de expresión del receptor de TNF (TNFR) (Boka et al., 1994), en conjunto con un incremento tanto en la inmunoreactividad nuclear de NF- κ B (Hunot et al., 1997), como en los niveles de expresión de DMT1 (Salazar y cols. 2008). Sobre esta base se ha propuesto que en el desarrollo de la EP, la activación de NF- κ B podría cumplir un rol significativo en acumulación de hierro por las neuronas dopaminérgicas de la SN a través de la regulación sobre DMT1 (Kostrzewa). En la EA, también se ha observado un aumento de la translocación nuclear de NF- κ B en glías y neuronas colinérgicas (Boissiere et al., 1997) junto con un incremento de los niveles de expresión de DMT1 (Zheng et al., 2009) y el contenido de hierro (Tao et al., 2014). Más aún, se ha observado que DMT1 colocaliza con el A β presente en las placas seniles en tejido postmortem de pacientes con EA (Zheng y cols. 2009) y, en el modelo murino de EA APP/PS1, se ha observado un aumento en la expresión de DMT1 en corteza e hipocampo (Zheng y cols. 2009). Por lo tanto, en EA y PD la activación de la vía de señalización asociada a NF- κ B por mediadores inflamatorios podría ser responsable de la acumulación de hierro a través de la regulación de la expresión de DMT1.

Por otro lado, dentro de los factores que podrían influenciar la activación de IRP1 esta la producción de ROS. En la literatura está ampliamente descrito que ciertas citoquinas y el LPS pueden inducir la producción de ROS en células a través de la activación de la NADPH oxidasa y la inducción de la expresión de la iNOS (Pawate y cols. 2004, Clement y cols. 2010, Qin y cols. 2013). Recientemente, en microglías ha sido reportado

que el ROS mitocondrial también podría contribuir a la señalización mediada por LPS (Park y cols. 2015). ROS y NO están descritos como reguladores de la activación de IRP (Mueller 2005). En varios tipos celulares el tratamiento con H₂O₂ exógeno induce un aumento en la actividad de IRP1 (Martins y cols. 1995, Pantopoulos y cols. 1996), incrementando la expresión de TfR y disminuyendo la de ferritina (Caltagirone y cols. 2001). Por otra parte el NO también induce la activación de IRP1 y en menor medida la de IRP2 (Pantopoulos y cols. 1996). La regulación de las ROS y el NO sobre IRP1 se postula que es a través de su *cluster* 4Fe-4S. El H₂O₂ daña y oxida el complejo 4Fe-4S convirtiéndolo en 3Fe-4S, generando la pérdida de la actividad aconitasa y potenciando su actividad de IRP. Mientras que NO reacciona con el complejo 4Fe-4S transformándolo en [(NO)₂Fe(SR)₂] el cual tampoco es funcional como aconitasa (Urrutia y cols. 2014, Fillebeen y Pantopoulos 2002). El efecto del NO sobre IRP2 aún no está claro, aunque se ha observado que estabiliza su ARNm (Fillebeen y Pantopoulos 2002). En este sentido se ha reportado que la estimulación de macrófagos con IFN-γ y LPS produce un incremento en la actividad de unión a los sitios IRE de IRP1 y IRP2, aumentando los niveles de expresión de DMT1 (Wardrop y Richardson 2000). Por lo tanto es posible que las citoquinas regulen la expresión de DMT1 a través de la activación de IRP1 mediada por la producción de ROS.

Tanto en la EA como en la EP se ha observado un aumento en la producción de ROS asociado a la activación de procesos inflamatorios (Glass y cols. 2010). Adicionalmente, en EA se ha observado aumento de la inmunoreactividad de IRP2 en las neuronas remanentes que presentan lesiones neurofibrilares (Smith y cols. 1998). Más aún, en

algunos tejidos obtenidos desde pacientes con EA también se han observado alteraciones en la interacción IRE/IRP. Esta alteración podría ser la responsable del aumento de la expresión de TfR sin cambios en los niveles de ferritina (Pinero y cols. 2000a).

Por lo tanto durante el desarrollo de la EP y EA, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias regularía la expresión de DMT1 a través de la activación transcripcional de NF- κ B así como también a través de la activación de IRP1 mediada por ROS. Este incremento en los niveles de expresión de DMT1 podrían resultar en un incremento en la incorporación de hierro en células favoreciendo su acumulación. Nuestros datos indican que microglías y neuronas pueden llevar a cabo este proceso.

Efecto de las citoquinas y LPS sobre FPN1. El tratamiento tanto con TNF- α , IL-6 o LPS generó una reducción en los niveles proteicos de FPN1 en neuronas sin alterar los niveles de ARNm. Este efecto puede deberse a la degradación lisosomal del transportador, así como también a una reducción en la traducción del ARNm. En varios tipos celulares ha sido demostrado que la señal que gatilla la degradación de FPN1 es hepcidina. Sin embargo en este trabajo se demostró que hepcidina no es expresada en neuronas (ver más adelante), por lo tanto no podría estar involucrada en este proceso. Con respecto a la reducción en la traducción del ARNm de FPN1, es factible de que se deba a la desregulación de la actividad de IRP. El mensajero de FPN1 posee sitios IRE en el extremo 5'UTR, que permiten la unión de IRP reduciendo la traducción del ARNm y por lo tanto disminuyendo los niveles proteicos, sin alterar los niveles de ARNm (Wilkinson y Pantopoulos 2014). Como se menciona anteriormente es posible regular la

activación de IRP12 a través de la producción de ROS. Por lo tanto es posible que la regulación de FPN1 en neuronas sea mediada por la producción de ROS inducida por los tratamientos con las citoquinas o el LPS.

En astrocitos y microglías se observaron cambios en el ARNm de FPN1, sin alteraciones en los niveles de proteína. En astrocitos, el tratamiento con LPS generó una disminución del ARNm de FPN1, efecto que en microglías fue adicionalmente reproducido por el tratamiento con TNF- α . Previamente ha sido reportado en macrófagos una disminución de los niveles de mensajero de FPN1 luego del tratamiento con LPS, sin embargo el mecanismo por el cual LPS podría generar este efecto aun no ha sido estudiado (Harada y cols. 2011, Nguyen y cols. 2006). Los cambios observados en el ARNm de FPN1 pueden corresponder a un evento temprano que aún no se ve reflejado en una variación de los niveles de proteína. Por tanto es de esperar que a mayores tiempos de tratamiento con LPS se observara también una reducción en los niveles proteicos de FPN1.

Efecto de las citoquinas y LPS sobre el contenido de hierro. Los cambios en la expresión de DMT1 y FPN1 en neuronas se asociaron a un incremento en el contenido intracelular de hierro, duplicándose a las 18 horas de tratamiento. Un incremento de los niveles de hierro en neuronas en conjunto con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias ha sido observado en varias enfermedades neurodegenerativas, por lo tanto estas citoquinas podrían ser responsables de este incremento a través de la modificación de los transportadores de hierro (Urrutia y cols. 2013, Thomsen y cols. 2015). Así mismo el aumento de los niveles de hierro, principalmente de hierro redox activo, ha sido asociado

a la producción de ROS a través de la reacción de Fenton, generando daño oxidativo (Kruszewski 2003, Spink 1990, Mena y cols. 2015). En concordancia con esto, en esta tesis se reportó que la producción de ROS en neuronas, inducida por el hierro, es mayor en las células que fueron previamente incubadas con citoquinas o LPS durante 18 horas. Por lo tanto las citoquinas generan cambios celulares que potencian la producción de ROS asociada a la presencia de hierro.

Previamente se ha reportado que las citoquinas pueden inducir la producción de ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa (Barth y cols. 2009). De acuerdo a ello se analizó el efecto de las citoquinas y el LPS sobre el estado redox celular. Observamos que tanto el tratamiento con citoquinas así como también con el LPS desde 30 minutos hasta 18 horas aumentó la oxidación de tioles en proteínas, producto de la producción de ROS. En consecuencia, la inflamación podría inducir la producción de ROS a través de la activación de dos vías confluyentes: i) por aumento de los niveles intracelulares de hierro mediado por el incremento de la expresión de DMT1 y ii) por el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno mediados por la activación de NOX en neuronas. Estos cambios favorecerían la generación del radical hidroxilo y el consecuente daño oxidativo acumulativo con el tiempo.

Interesantemente, en astrocitos los cambios observados en los transportadores no alteraron significativamente el contenido intracelular de hierro. Una mayor actividad transportadora podría dar cuenta de este efecto, que compensaría la disminución en el número de transportadores. Un comportamiento similar fue observado en astrocitos

tratados con TNF- α , en donde un incremento en la actividad exportadora de hierro compensó por la disminución de la expresión de FPN1 (Rathore y cols. 2012). Este fenómeno al parecer es particular para los astrocitos, ya que utilizando un modelo de enfermedad autoinmune, la encefalomielitis autoinmune experimental cerebral, se observó un incremento en el contenido de hierro en microglías reactivas pero no en astrocitos (Williams y cols. 2011b)

En microglías los cambios en los transportadores provocaron un incremento de un 30% del contenido intracelular de hierro. Interesantemente se ha demostrado que la salida de hierro es mayor en astrocitos que microglías (Rathore y cols. 2012) lo cual podría explicar que a pesar de no haber cambios en los niveles proteicos de FPN1, el aumento en la expresión de DMT1 es suficiente para inducir un incremento en los niveles de hierro. Esta capacidad de acumular hierro de las microglías, superior a las neuronas y astrocitos le permitiría a estas células actuar como “esponjas de hierro” disminuyendo su disponibilidad en neuronas reduciendo la generación de estrés oxidativo.

En resumen, la inflamación y la acumulación de hierro parecen estar íntimamente relacionados y la alteración de la homeostasis de hierro producto de mediadores inflamatorios sería en parte responsable de la neurodegeneración a través de la generación de estrés oxidativo. Un claro ejemplo de ello puede ser observado en la EA, donde la producción del péptido A β genera la activación de la respuesta inmune inicialmente mediada por astrocitos y microglías y posteriormente por otros elementos del sistema inmune incluyendo macrófagos y linfocitos. Las microglías y astrocitos

inician la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y ROS, los cuales impactan sobre la neurona y las células gliales, alterando la homeostasis celular de hierro por desregulación de sus transportadores. La alteración en la homeostasis de hierro conlleva a la acumulación de este metal y a la generación de daño oxidativo produciéndose así la muerte neuronal.

4.2 Rol de hepcidina en la homeostasis de hierro.

La primera evidencia acerca de la expresión de hepcidina en el SNC aparece el año 2006 (Zechel y cols. 2006), observándose una distribución amplia de hepcidina a lo largo del SNC, presentándose en estructuras tan variadas como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo, el cerebelo, el cordón espinal así como también el ganglio de la raíz dorsal del sistema nervioso periférico. Este trabajo no logró clarificar el tipo celular responsable de su expresión, reportándose su expresión tanto en neuronas como en células GFAP positivas. Sin embargo, debido a que hepcidina puede ingresar a las células tras unirse e inducir la endocitosis de FPN1, es difícil aseverar si alguna de dichas células es la productora de hepcidina o sólo la célula blanco. Por lo tanto en esta tesis se analizó la expresión de hepcidina en cultivos enriquecidos en neuronas, astrocitos y microglías para identificar las células responsables de su síntesis.

La expresión de hepcidina en cerebro es regulada por estímulos inflamatorios de manera similar a lo que sucede en el hígado. Particularmente, la inyección intraperitoneal de

LPS induce un incremento significativo en el ARNm de hepcidina tanto en corteza como en sustancia nigra (Ge y cols. 2009). Sobre la base de estos antecedentes, se analizó el efecto de diferentes estímulos inflamatorios en la expresión de hepcidina por astrocitos, microglías y neuronas. Se determinó que hepcidina es expresada tanto en astrocitos como microglías, siendo mayor en los primeros. Adicionalmente, estímulos inflamatorios como TNF- α , IL-6 y LPS produjeron un incremento en los niveles proteicos y de ARNm de hepcidina tanto en astrocitos como microglías, siendo estas últimas las que generan una mayor inducción. No encontramos expresión de hepcidina en neuronas hipocampales lo que indica que en estas células, hepcidina actúa de forma paracrina y endocrina.

Paralelamente se evaluó el efecto del hierro sobre los niveles de hepcidina, ya que previamente ha sido reportado que este también es capaz de regular su expresión. Interesantemente la incubación con 50 μ M de hierro indujo un incremento rápido (luego de 2 hrs de tratamiento) en la expresión de hepcidina. Los efectos de los estímulos inflamatorios y el hierro sobre la expresión de hepcidina fueron transitorios. A las 18 horas de tratamiento los niveles de ARNm para hepcidina fueron similares a los observados en la situación control (datos no mostrados). Esta regulación transitoria sobre hepcidina había sido previamente reportada en macrófagos (Nguyen y cols. 2006).

El efecto de los estímulos inflamatorios sobre la expresión de hepcidina ha sido reportado ampliamente en diferentes tipos celulares (Qian y cols. 2014, Nguyen y cols. 2006, Villarroel y cols. 2012, Frazier y cols. 2011, Wu y cols. 2012, Ge y cols. 2009,

Gnana-Prakasam y cols. 2008, Kemna y cols. 2005, Lee y cols. 2004). Nuestros experimentos determinaron por primera vez que en el SNC los astrocitos y microglías son productores de hepcidina. También observamos por primera vez que el hierro induce transitoriamente su expresión. Este efecto podría ser mediado por la producción de ROS, ya que en hepatocitos, el tratamiento con concentraciones sub-micromolares de H_2O_2 , induce un incremento en la expresión de hepcidina a través de la activación de STAT3 (Millonig y cols. 2012). Previamente ha sido reportado que la exposición de neuronas hipocampales a $100 \mu M$ Fe-NTA por 20 minutos, produce un rápido incremento en el LIP en conjunto con un aumento en la producción de ROS (Muñoz y cols. 2011). La activación de STAT3 se ha visto regulada por los ROS (Yoon y cols. 2010). Por lo tanto es posible que el hierro genere un aumento de la expresión de hepcidina a través de la activación de STAT3 mediante la producción de ROS.

Si bien en este trabajo se demostró que las células gliales son capaces de producir hepcidina localmente, recientemente se reportó que hepcidina también es producida por células endoteliales de los vasos sanguíneos. Adicionalmente se detectó la presencia de la proteína para hepcidina en todas las capas de las paredes de los vasos sanguíneos sugiriendo que esta puede atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto parte de la hepcidina presente en el SNC provendría de la producción sistémica que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Raha-Chowdhury y cols. 2015). De esta forma hepcidina en el cerebro podría regular la expresión de los transportadores de hierro de manera autocrina y paracrina (secretada por astrocitos, microglías y célula endoteliales) y endocrina (secretada al torrente sanguíneo principalmente por hepatocitos).

Similarmente a lo descrito para macrófagos y otros tipos celulares (Ganz y Nemeth 2012), hepcidina induce una disminución de los niveles proteicos de FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías, posiblemente provocando su internalización y degradación lisosomal (De Domenico y cols. 2007). Por tanto, hepcidina podría contribuir a la acumulación de hierro disminuyendo la salida mediada por FPN1. Adicionalmente, encontramos que el efecto de hepcidina es transitorio, ya que a las 24 horas de tratamiento los niveles de FPN1 alcanzan valores similares a los de células controles. Este efecto transitorio ya ha sido reportado previamente en varias líneas celulares incluyendo células epiteliales (CaCo2), macrófagos (THP-1 y J774), cardiomiocitos (H9C2), así como también en células intestinales y hepatocitos (Yeh y cols. 2004, Chaston y cols. 2008, Mena y cols. 2008, Ge y cols. 2009, Du y cols. 2012). Sin embargo una producción continua de hepcidina podría mantener bajos los niveles de FPN1 a lo largo del tiempo y por tanto generar acumulación de hierro.

Interesantemente, el tratamiento de microglías con hepcidina indujo un aumento inesperado de los niveles de expresión de DMT1. Similarmente, se ha reportado que la inyección estereotáxica de hepcidina en el ventrículo lateral izquierdo en ratas induce, 12 horas post-inyección, un incremento en el ARNm de DMT1 en neuronas de corteza e hipocampo (Li y cols. 2011). De esta forma hepcidina podría aumentar el contenido intracelular de hierro a través de dos mecanismos sinérgicos: la disminución de FPN1 y el aumento de DMT1. La acumulación de hierro en neuronas sería altamente perjudicial ya que potenciaría la generación de estrés oxidativo y daño celular. Sin embargo, en

microglías podría ser favorable, ya que estas, a diferencia de la neuronas, expresan mayores niveles de la proteína de almacenaje ferritina (Connor y cols. 1994, Han y cols. 2002), lo que las vuelve más resistentes a los efectos de altos niveles de hierro. La capacidad de acumular hierro de las microglías podría reducir su biodisponibilidad para los otros tipos celulares, incluyendo las neuronas, ejerciendo un efecto protector. Sin embargo, este efecto protector podría ser sobrepasado por un excesivo incremento del estrés y daño oxidativo (Mehlhase y cols. 2005, Mehlhase y cols. 2006).

In vivo observamos que la inyección de hepcidina no alteró los niveles de expresión de FPN1 probablemente debido a que los tejidos se analizaron 72 horas post-inyección y por lo tanto los niveles de FPN1 volvieron a alcanzar niveles similares a lo observado en la situación control. Sin embargo, detectamos una tendencia de disminución de los niveles de FPN1 producida por hepcidina, en los tejidos de ratones inyectados con $A\beta_{1-42}$. Con respecto a DMT1, observamos que la inyección de hepcidina induce una disminución no significativa de sus niveles. Esto se contradice con lo reportado por (Li y cols. 2011) ya que ellos observan un aumento del ARNm de DMT1 luego de la inyección de hepcidina. Una posible explicación a estas diferencias es la cantidad de hepcidina utilizada y el tiempo de tratamiento. Mientras nosotros utilizamos 10 μ g de hepcidina por animal y se analizaron los cerebros 72 horas post-inyección, mientras que ellos utilizaron 30 μ g y los cerebros fueron analizados 12 horas post-inyección. En los tratamientos de los cultivos neuronales tampoco observamos variación en DMT1 luego del tratamiento con hepcidina a pesar de que utilizamos tiempos de tratamientos más cortos. Interesantemente observamos que hepcidina reduce significativamente los

niveles de DMT1 inducidos por la inyección de $A\beta_{1-42}$. Este resultado se discutirá más adelante.

En resumen hepcidina podría inducir acumulación de hierro en neuronas, astrocitos y microglías a través de la disminución de FPN1, pero en microglías el efecto de hepcidina podría ser aún mayor ya que adicionalmente aumenta la expresión de DMT1, reduciendo así la biodisponibilidad de hierro para los otros tipos celulares.

4.3 Rol de hepcidina en la modulación de la respuesta inflamatoria mediada por el péptido $A\beta_{1-42}$

Recientemente se ha reportado que hepcidina puede actuar como un supresor de la respuesta inflamatoria. En ratones, la inyección de hepcidina es capaz de reducir la respuesta inflamatoria inducida por el LPS, disminuyendo la mortalidad asociada a esta (De Domenico y cols. 2010, Huang y cols. 2012).

Se han planteado diferentes mecanismos de acción de hepcidina en la reducción de la respuesta inflamatoria. En (De Domenico y cols. 2010), se propone que el mecanismo es mediado por la activación de la vía de señalización asociada a STAT-3. En este mecanismo, la unión de hepcidina a su receptor FPN1 induce la fosforilación de este y el reclutamiento de la proteína adaptadora JAK-2 y STAT3, el cual es fosforilado en la tirosina 705 generando su dimerización y translocación al núcleo, donde induce la transcripción de SOCS3, un regulador negativo de la transducción de señales asociadas a la activación de receptores de citoquinas y TLRs (De Domenico y cols. 2009). En este trabajo, se reporta que el uso de un ARN interferente contra Socs3, elimina el efecto de

hepcidina en la reducción de la expresión de TNF- α e IL-6 inducida por el LPS en macrófagos aislados de la médula ósea. La supresión de la respuesta inflamatoria a través de la activación de STAT3 e inducción de la expresión SOCS3, ha sido postulado como el mecanismo por el cual la IL-10, una citoquina anti-inflamatoria, ejerce su acción en células del sistema inmune (Murray 2006).

En (Pagani y cols. 2011) también se evaluó el rol antiinflamatorio de hepcidina. Encontraron que hepcidina reduce la expresión de TNF- α e IL-6 inducida por el tratamiento con LPS en macrófagos aislados desde el bazo, en conjunto con una acumulación de hierro en estas células. Determinaron que el efecto antiinflamatorio no es producto de una regulación sobre la homeostasis de hierro utilizando un ratón *knockdown* para *Tmprss6*, caracterizado por presentar altos niveles sanguíneos de hepcidina y deficiencia severa de hierro en los tejidos y bazo. Este ratón genera una respuesta inflamatoria menor que los ratones silvestres, al ser expuestos al LPS, indicando que son los niveles altos de hepcidina, independiente de los niveles de hierro, los que reducen la inflamación *in vivo*. En este trabajo también se propuso que el mecanismo por el cual hepcidina regula la inflamación es a través de la activación de STAT-3, pero no realizaron experimentos para evaluar esta posibilidad.

Un tercer grupo evaluó el rol antiinflamatorio de hepcidina en un modelo murino de ictericia obstructiva expuesto al LPS (Huang y cols. 2012). En este trabajo se reportó que el pre-tratamiento con hepcidina redujo la expresión de TNF- α , IL-1 β y MCP-1 en el hígado de ratones con hepatitis colestásica inducida por el LPS. Adicionalmente

observaron que hepcidina aumentó la expresión de la LC3B-II y redujo los niveles de la caspasa-3 activa. Estos cambios sugieren que en el hígado, hepcidina induce la autofagia y reduce la apoptosis. Se ha reportado previamente que la autofagia puede regular la secreción de ciertas citoquinas como la IL-1 β (Harris y cols. 2011). Por tanto se propone que hepcidina podría reducir la secreción de esta citoquina por medio de la activación de la autofagia.

Apoyando a lo reportado acerca del rol de hepcidina promoviendo autofagia y reduciendo la apoptosis, recientemente se reportó que en cardiomiocitos humanos hepcidina reduce la apoptosis inducida por hierro a través de la regulación de GATA-4/Bcl-2 e inhibición de la vía extrínseca apoptótica (Hsieh y cols. 2014). Por lo tanto, es posible que este mecanismo sea responsable de la reducción de los niveles de IL-1 β , pero no los cambios en la expresión de las otras citoquinas.

Considerando esta evidencia, evaluamos el efecto de hepcidina sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 inducidas por el péptido A β . El péptido A β induce la activación de astrocitos y microglías a través de receptores TLR (Walter y cols. 2007, Udan y cols. 2008, Terrill-Usery y cols. 2014, O'Halloran y cols. 2014, Gambuzza y cols. 2014, Costello y cols. 2015) similar a lo que sucede con LPS. Por ello se utilizó el péptido A β ₁₋₄₂ como un inductor de inflamación en astrocitos y microglías, emulando lo que sucede en la EA. Hecpidina redujo la expresión y secreción de TNF- α e IL-6 inducida por el tratamiento con A β ₁₋₄₂ en astrocitos y microglías cultivadas *in vitro*, ejerciendo un rol antiinflamatorio similar a los reportado en macrófagos tratados con

LPS. Mientras que *in vivo* la inyección estereotáxica de hepcidina redujo la activación glial, el aumento de la expresión de DMT1 y la peroxidación lipídica inducida por el $A\beta_{1-42}$. Estos resultados indicarían que hepcidina tiene un efecto antiinflamatorio en astrocitos y microglías tratados con $A\beta_{1-42}$, suprimiendo la respuesta inmune, revirtiendo la alteración de la homeostasis celular de hierro y disminuyendo el daño oxidativo.

Durante el desarrollo de esta tesis se evaluó la posibilidad de que la activación de STAT3 fuese el mecanismo por el cual hepcidina suprimiera la respuesta inflamatoria en astrocitos y microglías. Datos preliminares no reportados, sugieren que en astrocitos el mecanismo de activación de STAT3 no es el responsable de supresión de la respuesta inflamatoria. Contrario a lo reportado anteriormente, se observó una disminución de la fosforilación de STAT-3 en astrocitos, luego de la incubación con hepcidina durante 1 hora. Adicionalmente a las 2 horas de incubación se observó una reducción en los niveles de ARNm para SOCS3, sugiriendo un mecanismo diferente por el cuál hepcidina ejerce su acción antiinflamatoria en astrocitos.

Existe un tercer mecanismo por el cual hepcidina podría ejercer una respuesta antiinflamatoria. En todos los trabajos mencionados hepcidina es administrada 2 horas previas a la administración de LPS. En el desarrollo de esta tesis se incubó hepcidina en conjunto con LPS y no se observó una acción antiinflamatoria (datos no mostrados), lo que indica que para ejercer su función antiinflamatoria hepcidina debe estar presente previo a la presencia del estímulo inflamatorio. Esta condición nos hace pensar en el mecanismo de activación de NF- κ B mediada por ROS. NF- κ B es el factor de

transcripción esencial en las señalizaciones asociadas a la respuesta inmune (Hayden y Ghosh 2014, Gasparini y Feldmann 2012, Newton y Dixit 2012). NF- κ B se activa por la orquestación entre la activación de receptores de citoquinas y TLRs y la producción de ROS (Figura 30).

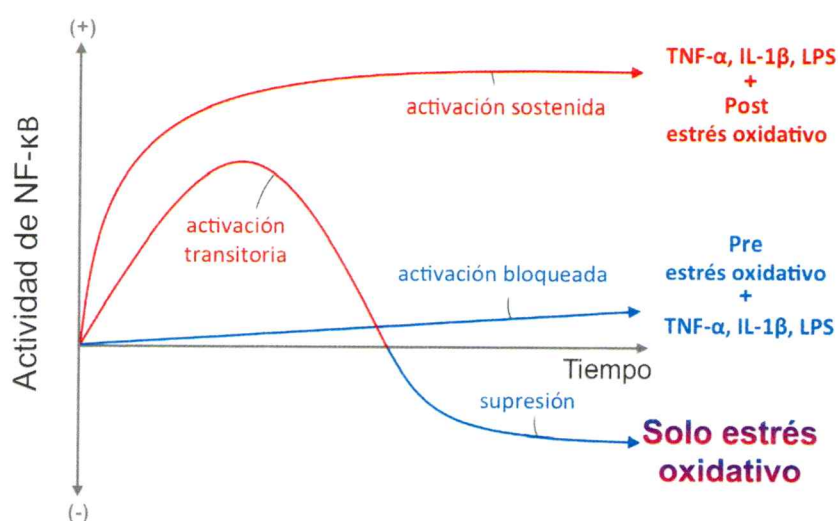


Figura 27. Cinética de la actividad de NF- κ B mediada por ROS. ROS induce la activación transitoria de NF-kappa B en una fase temprana. Posteriormente, tanto la activación basal como la inducible de NF- κ B se suprimen debido a una disminución de Akt y/o a la oxidación del complejo IKK en la última fase (línea azul). La post-exposición de las células a ROS induce la activación sostenida de NF- κ B mediada por estímulos inflamatorios como el TNF- α , IL-1 β y LPS (línea roja). La pre-exposición de las células a ROS inhibe la activación inducida por citoquinas de NF- κ B. Modificado de (Nakajima y Kitamura 2013)

Si bien existe bastante evidencia acerca de la activación de NF- κ B por ROS, recientemente han empezado a aparecer otras que indican que los ROS también suprimen la activación de NF κ B (Kil y cols. 2008, Wu y cols. 2009, Morgan y Liu 2011). Se ha propuesto que el tipo de regulación (positiva o negativa) depende de la temporalidad de la producción de ROS, pudiendo permitir o bloquear la activación de

NF-kB mediante citoquinas o LPS (Nakajima and Kitamura, 2013). El estrés oxidativo bloquea la activación NF-kB mediada por citoquinas inflamatorias cuando es generado previo al estímulo inflamatorio. Sin embargo cuando el estrés oxidativo es generado posterior a la activación de la vía, permite una mayor activación de NF-kB sostenida en el tiempo. Hecpídina al ser inyectada 2 horas antes que el insulto, podría generar un leve estrés oxidativo a través de un aumento en el contenido de hierro celular producto de la disminución de FPN1. Esto generaría que las células entrasen en un estado refractario, en que el estímulo posterior con péptido A β no podría activar a NF-kB, generándose así una disminución en la respuesta inflamatoria. Una evidencia que apoya esta hipótesis es nuestro descubrimiento que la inyección de hepcídina en ratones muestra una tendencia a reducir los niveles de DMT1, un gen blanco de NF-kB.

Los datos anteriores indican que hepcídina podría actuar como un agente protector durante neurodegeneración reduciendo la respuesta inflamatoria. Apoyando esta idea, encontramos que el uso de medios condicionados de microglías o astrocitos tratados con A β ₁₋₄₂ induce un incremento en el daño oxidativo en neuronas, así como también altera la morfología de estas. El pre-tratamiento de los astrocitos y microglías con hepcídina suprime el efecto producido por el A β ₁₋₄₂. Las neuronas tratadas con estos medios condicionados presentan una disminución del daño oxidativo así como también una menor alteración en su morfología.

La activación de astrocitos y microglías conlleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias entre ellas TNF- α e IL-6, así como también ROS y NO (Glass y cols.

2010, Akiyama y cols. 2000, Hu y cols. 1998). De acuerdo a lo reportado en este trabajo, estas citoquinas alteran la homeostasis de hierro en neuronas, promoviendo la acumulación de este. El incremento del hierro y la producción de ROS, particularmente peróxido de hidrógeno, provocaría un incremento en el daño oxidativo de las neuronas a través de la reacción de Fenton. Este daño oxidativo acumulativo finalmente desencadenaría la muerte neuronal (Urrutia y cols. 2014).

La expresión de hepcidina aumenta con la edad y en respuesta a inflamación (Wang y cols. 2008, Wang y cols. 2010b). Por lo tanto es factible pensar que en la EA sus niveles también deberían estar incrementados, producto del contexto inflamatorio que acompaña al desarrollo de la enfermedad y de la edad avanzada en que se presenta la patología (Glass y cols. 2010). Sin embargo en el único trabajo publicado a la fecha en que se evalúa la expresión de hepcidina en cerebros obtenidos desde pacientes con EA (Raha y cols. 2013), se reporta que, comparados con cerebros de pacientes envejecidos, tanto hepcidina como su receptor, el transportador FPN1, se encuentran disminuidos en el hipocampo, corteza entorinal y giro frontal superior. La disminución de la expresión de hepcidina indicaría la presencia de un fenómeno inflamatorio no contrarrestado por mecanismos anti-inflamatorios endógenos (como hepcidina). Por otro lado, la disminución de la expresión de FPN1 podría contribuir a la acumulación de hierro.

Para considerar a hepcidina como un posible candidato terapéutico en la EA, por su función anti-inflamatoria, hay que tener presente su otra función que es la regulación de la homeostasis de hierro. La expresión de hepcidina por tiempos prolongados conlleva a

la anemia con acumulación de hierro en tejidos (Ganz 2011). Por lo tanto la expresión prolongada de hepcidina en cerebro, además de su efecto antiinflamatorio, podría inducir la acumulación de hierro tanto en neuronas como en astrocitos y microglías. La acumulación de hierro en astrocitos y microglías eventualmente podría ser beneficioso para las neuronas, pues reduciría la disponibilidad de este metal. Sin embargo, a largo plazo, la acumulación de hierro en neuronas podría ser altamente perjudicial, ya que promovería la generación de ROS y el daño oxidativo. Considerando estas dos propiedades de hepcidina, efecto anti-inflamatorio e inductora de la acumulación de hierro, será interesante evaluar el efecto de hepcidina sobre el daño oxidativo en neuronas en períodos prolongados. Es posible que a los beneficios anti-inflamatorios iniciales podría seguir, en el largo plazo, la acumulación de hierro y el daño oxidativo.

Los datos obtenidos en esta tesis pueden ser resumidos el siguiente diagrama

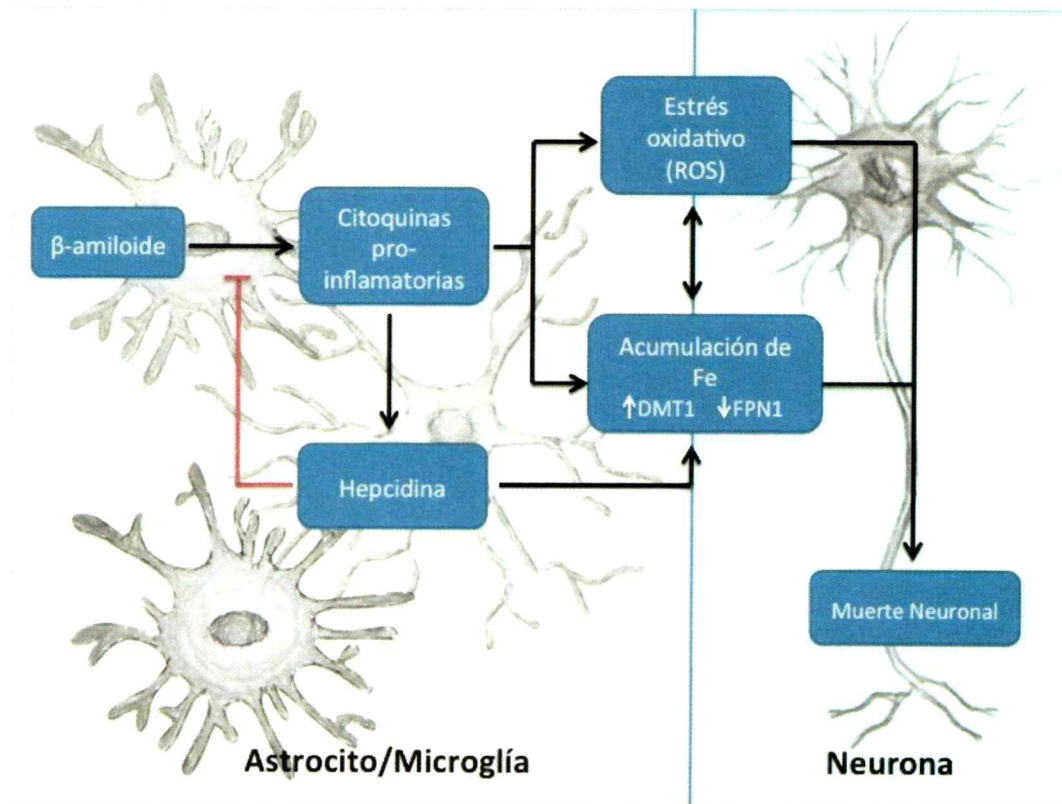


Figura 28. Representación esquemática de la relación entre la inflamación y la acumulación de hierro en la enfermedad de Alzheimer. Inicialmente el péptido β -amiloide induce la activación de astrocitos y microglías generando la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 . Las citoquinas pro-inflamatorias, por un lado inducen la producción de ROS mediante la activación de la NOX y la iNOS y por otro alteran la homeostasis celular de hierro a través de una desregulación de los transportadores de hierro, generando la acumulación de este metal en neuronas y microglías. Adicionalmente, las citoquinas pro-inflamatorias inducen la expresión de hepcidina en astrocitos y microglías, cumpliendo un rol regulatorio fundamental. Por un lado, hepcidina genera un bucle de retroalimentación negativa suprimiendo la producción de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 inducida por el péptido β -amiloide, regulando así la homeostasis de hierro indirectamente. Por otra parte, hepcidina induce la degradación de FPN1 en astrocitos, microglías y neuronas alterando la homeostasis de hierro directamente. La acumulación de hierro y la producción de ROS se potencian entre sí favoreciendo la generación de daño oxidativo en neuronas, lo finalmente desencadena la muerte neuronal.

5 CONCLUSIONES

1.- El LPS y las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6, alteran la homeostasis de hierro en neuronas, astrocitos y microglías, a través del aumento de la expresión de DMT1 y disminución de la expresión de FPN1. Los cambios en la expresión de los transportadores se asocian a una acumulación de hierro tanto en neuronas como microglías en cultivo.

2.- Las citoquinas pro-inflamatorias y el LPS inducen un aumento en la oxidación de grupos tioles de neuronas hipocampales y potencian la generación de ROS inducida por hierro.

3.- En respuesta a los estímulos inflamatorios, los astrocitos y las microglías inducen la expresión de hepcidina. Basalmente los astrocitos expresan mayores niveles de hepcidina que las microglías.

4.- Hepcidina reduce la expresión de FPN1 en neuronas, astrocitos y microglías. Adicionalmente, en microglías hepcidina induce un aumento de la expresión de DMT1, probablemente favoreciendo la acumulación de hierro en estas células.

5.- El péptido A β induce la expresión y secreción de TNF- α e IL-6 en astrocitos y microglías. El pre-tratamiento con hepcidina reduce tanto la expresión como la secreción de estas citoquinas inducidas por el péptido A β en ambos tipos celulares.

6.- El medio condicionado obtenido de astrocitos o microglías tratados con el péptido A β , induce alteraciones morfológicas y daño oxidativo en neuronas hipocampales en cultivo. El pre-tratamiento con hepcidina reduce el efecto generado por el péptido A β .

7.- La inyección estereotáxica con el péptido A β produce en el hipocampo de los ratones: (i) un aumento de la expresión de GFAP en astrocitos, (ii) alteración en la morfología e incremento discreto en el número de las microglías, (iii) aparición de marcadores de daño oxidativo y (iv) incremento de la expresión de DMT1. Estos efectos son reducidos con el pre-tratamiento con hepcidina.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la hipótesis que en neuronas, astrocitos y microglías, hepcidina reduce la respuesta inflamatoria inducida por el péptido A β y modula la homeostasis de hierro, directamente a través de FPN1 e indirectamente a través de la modulación de la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Son necesarios futuros experimentos para evaluar la vía de señalización asociada al efecto anti-inflamatorio de hepcidina, así como también estudios a largo plazo para discernir si el efecto beneficioso anti-inflamatorio de hepcidina resulta enmascarado por la potencialmente perniciosa acumulación de hierro gatillada por los cambios en el transportador de hierro FPN1.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abboud, S. y Haile, D. J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **275**, 19906-19912.
- Abramov, A. Y., Canevari, L. y Duchen, M. R. (2004) Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 81-87.
- Abramov, A. Y. y Duchen, M. R. (2005) The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **360**, 2309-2314.
- Agarwal, K. N. (2001) Iron and the brain: neurotransmitter receptors and magnetic resonance spectroscopy. *Br J Nutr*, **85 Suppl 2**, S147-150.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. y Wyss-Coray, T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **21**, 383-421.
- Alarcon, R., Fuenzalida, C., Santibanez, M. y von Bernhardt, R. (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem*, **280**, 30406-30415.
- Alberghini, A., Recalcati, S., Tacchini, L., Santambrogio, P., Campanella, A. y Cairo, G. (2005) Loss of the von Hippel Lindau tumor suppressor disrupts iron homeostasis in renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, **280**, 30120-30128.
- Aliev, G., Palacios, H. H., Lipsitt, A. E., Fischbach, K., Lamb, B. T., Obrenovich, M. E., Morales, L., Gasimov, E. y Bragin, V. (2009) Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. *Neurotox Res*, **16**, 293-305.
- Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J., McKay, I. C. y Brock, J. H. (1989) Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest*, **61**, 319-322.
- Amit, T., Avramovich-Tirosh, Y., Youdim, M. B. y Mandel, S. (2008) Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *FASEB J*, **22**, 1296-1305.
- Andrasi, E., Farkas, E., Scheibler, H., Reffy, A. y Bezur, L. (1995) Al, Zn, Cu, Mn and Fe levels in brain in Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr*, **21**, 89-97.
- Antharam, V., Collingwood, J. F., Bullivant, J. P., Davidson, M. R., Chandra, S., Mikhaylova, A., Finnegan, M. E., Batich, C., Forder, J. R. y Dobson, J. (2012) High field magnetic resonance microscopy of the human hippocampus in

- Alzheimer's disease: quantitative imaging and correlation with iron. *Neuroimage*, **59**, 1249-1260.
- Araujo, D. M. y Cotman, C. W. (1992) Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res*, **569**, 141-145.
- Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S. y Kim, S. (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, **9**, 535-551.
- Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J. W. y Vercellotti, G. M. (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*, **267**, 18148-18153.
- Ballatore, C., Lee, V. M. y Trojanowski, J. Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 663-672.
- Barrientos, R. M., Kitt, M. M., Watkins, L. R. y Maier, S. F. (2015) Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*.
- Barth, B. M., Stewart-Smeets, S. y Kuhn, T. B. (2009) Proinflammatory cytokines provoke oxidative damage to actin in neuronal cells mediated by Rac1 and NADPH oxidase. *Mol Cell Neurosci*, **41**, 274-285.
- Beard, J. (2003) Iron deficiency alters brain development and functioning. *J Nutr*, **133**, 1468S-1472S.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. y Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, **77**, 817-827.
- Benkovic, S. A. y Connor, J. R. (1993) Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol*, **338**, 97-113.
- Benseny-Cases, N., Klementieva, O. y Cladera, J. (2012) In vitro oligomerization and fibrillogenesis of amyloid-beta peptides. *Subcell Biochem*, **65**, 53-74.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. y Edelstein, S. J. (1996) *Protein methods*. Wiley-Liss, New York.
- Braak, H. y Braak, E. (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, **53**, 127-140.
- Bruce, A. J., Malfroy, B. y Baudry, M. (1996) beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2312-2316.
- Burdo, J. R., Menzies, S. L., Simpson, I. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Dolan, K. G., Haile, D. J., Beard, J. L. y Connor, J. R. (2001) Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res*, **66**, 1198-1207.
- Busciglio, J., Yeh, J. y Yankner, B. A. (1993) beta-Amyloid neurotoxicity in human cortical culture is not mediated by excitotoxins. *J Neurochem*, **61**, 1565-1568.
- Bush, A. I. (2013) The metal theory of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **33 Suppl 1**, S277-281.
- Butterfield, D. A., Reed, T. T., Perluigi, M., De Marco, C., Coccia, R., Keller, J. N., Markesbery, W. R. y Sultana, R. (2007) Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications

- for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res*, **1148**, 243-248.
- Caltagirone, A., Weiss, G. y Pantopoulos, K. (2001) Modulation of cellular iron metabolism by hydrogen peroxide. Effects of H₂O₂ on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 19738-19745.
- Chaston, T., Chung, B., Mascarenhas, M., Marks, J., Patel, B., Srai, S. K. y Sharp, P. (2008) Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut*, **57**, 374-382.
- Chen, Q. X., Song, S. W., Chen, Q. H., Zeng, C. L., Zheng, X., Wang, J. L. y Fang, X. M. (2014) Silencing airway epithelial cell-derived hepcidin exacerbates sepsis induced acute lung injury. *Crit Care*, **18**, 470.
- Clancy, B. y Cauller, L. J. (1998) Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods*, **83**, 97-102.
- Clarris, H. J., Key, B., Beyreuther, K., Masters, C. L. y Small, D. H. (1995) Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res*, **88**, 87-95.
- Clement, H. W., Vazquez, J. F., Sommer, O., Heiser, P., Morawietz, H., Hopt, U., Schulz, E. y von Dobschutz, E. (2010) Lipopolysaccharide-induced radical formation in the striatum is abolished in Nox2 gp91phox-deficient mice. *J Neural Transm*, **117**, 13-22.
- Collingwood, J. F., Mikhaylova, A., Davidson, M., Batich, C., Streit, W. J., Terry, J. y Dobson, J. (2005) In situ characterization and mapping of iron compounds in Alzheimer's disease tissue. *J Alzheimers Dis*, **7**, 267-272.
- Connor, J. R., Boeshore, K. L., Benkovic, S. A. y Menzies, S. L. (1994) Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J Neurosci Res*, **37**, 461-465.
- Connor, J. R., Menzies, S. L., St Martin, S. M. y Mufson, E. J. (1990) Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res*, **27**, 595-611.
- Connor, J. R., Menzies, S. L., St Martin, S. M. y Mufson, E. J. (1992a) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res*, **31**, 75-83.
- Connor, J. R., Snyder, B. S., Arosio, P., Loeffler, D. A. y LeWitt, P. (1995) A quantitative analysis of isoferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains. *J Neurochem*, **65**, 717-724.
- Connor, J. R., Snyder, B. S., Beard, J. L., Fine, R. E. y Mufson, E. J. (1992b) Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, **31**, 327-335.
- Costello, D. A., Carney, D. G. y Lynch, M. A. (2015) alpha-TLR2 antibody attenuates the Abeta-mediated inflammatory response in microglia through enhanced expression of SIGIRR. *Brain Behav Immun*.



- Crespo, A. C., Silva, B., Marques, L., Marcelino, E., Maruta, C., Costa, S., Timoteo, A., Vilares, A., Couto, F. S., Faustino, P., Correia, A. P., Verdelho, A., Porto, G., Guerreiro, M., Herrero, A., Costa, C., de Mendonca, A., Costa, L. y Martins, M. (2014) Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol Aging*, **35**, 777-785.
- De Domenico, I., Lo, E., Ward, D. M. y Kaplan, J. (2009) Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3800-3805.
- De Domenico, I., McVey Ward, D. y Kaplan, J. (2008) Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 72-81.
- De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. I., Ganz, T., Musci, G. y Kaplan, J. (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*, **18**, 2569-2578.
- De Domenico, I., Zhang, T. Y., Koenig, C. L., Branch, R. W., London, N., Lo, E., Daynes, R. A., Kushner, J. P., Li, D., Ward, D. M. y Kaplan, J. (2010) Heparin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*, **120**, 2395-2405.
- de la Monte, S. M. y Wands, J. R. (2006) Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **9**, 167-181.
- Ding, H., Yan, C. Z., Shi, H., Zhao, Y. S., Chang, S. Y., Yu, P., Wu, W. S., Zhao, C. Y., Chang, Y. Z. y Duan, X. L. (2011) Heparin is involved in iron regulation in the ischemic brain. *PLoS One*, **6**, e25324.
- Du, F., Qian, C., Qian, Z. M., Wu, X. M., Xie, H., Yung, W. H. y Ke, Y. (2011) Heparin directly inhibits transferrin receptor 1 expression in astrocytes via a cyclic AMP-protein kinase A pathway. *Glia*, **59**, 936-945.
- Du, F., Qian, Z. M., Gong, Q., Zhu, Z. J., Lu, L. y Ke, Y. (2012) The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells. *J Nutr Biochem*, **23**, 1694-1700.
- Du, F., Qian, Z. M., Luo, Q., Yung, W. H. y Ke, Y. (2014) Heparin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport Proteins in Iron-Overloaded Rats. *Mol Neurobiol*.
- Dugan, L. L., Ali, S. S., Shekhtman, G., Roberts, A. J., Lucero, J., Quick, K. L. y Behrens, M. M. (2009) IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic interneurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One*, **4**, e5518.
- Dzikaite, V., Holmstrom, P., Stal, P., Eckes, K., Hagen, K., Eggertsen, G., Gafvels, M., Melefors, O. y Hultcrantz, R. (2006) Regulatory effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on HAMP expression in iron loaded rat hepatocytes. *J Hepatol*, **44**, 544-551.

- Fahmy, M. y Young, S. P. (1993) Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines: changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA. *Biochem J*, **296** (Pt 1), 175-181.
- Fang, F., Lue, L. F., Yan, S., Xu, H., Lüddy, J. S., Chen, D., Walker, D. G., Stern, D. M., Schmidt, A. M., Chen, J. X. y Yan, S. S. (2010) RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, **24**, 1043-1055.
- Fassbender, K., Walter, S., Kuhl, S., Landmann, R., Ishii, K., Bertsch, T., Stalder, A. K., Muehlhauser, F., Liu, Y., Ulmer, A. J., Rivest, S., Lentschat, A., Gulbins, E., Jucker, M., Staufenbiel, M., Brechtel, K., Walter, J., Multhaup, G., Penke, B., Adachi, Y., Hartmann, T. y Beyreuther, K. (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*, **18**, 203-205.
- Fillebeen, C. y Pantopoulos, K. (2002) Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep*, **7**, 15-22.
- Floden, A. M., Li, S. y Combs, C. K. (2005) Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci*, **25**, 2566-2575.
- Floyd, R. A. (1999) Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med*, **26**, 1346-1355.
- Forloni, G., Mangiarotti, F., Angeretti, N., Lucca, E. y De Simoni, M. G. (1997) Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF-alpha secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine*, **9**, 759-762.
- Frazier, M. D., Mamo, L. B., Ghio, A. J. y Turi, J. L. (2011) Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon-gamma. *Respir Res*, **12**, 100.
- Gallagher, J. J., Finnegan, M. E., Grehan, B., Dobson, J., Collingwood, J. F. y Lynch, M. A. (2012) Modest amyloid deposition is associated with iron dysregulation, microglial activation, and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*, **28**, 147-161.
- Gambuzza, M. E., Sofo, V., Salmeri, F. M., Soraci, L., Marino, S. y Bramanti, P. (2014) Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **13**, 1542-1558.
- Ganz, T. (2011) Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, **117**, 4425-4433.
- Ganz, T. y Nemeth, E. (2012) Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1434-1443.
- Ganz, T., Olbina, G., Girelli, D., Nemeth, E. y Westerman, M. (2008) Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*, **112**, 4292-4297.
- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A. S. y Enns, C. A. (2009) Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*, **9**, 217-227.

- Garrick, M. D. y Garrick, L. M. (2009) Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 309-325.
- Gasparini, C. y Feldmann, M. (2012) NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des*, **18**, 5735-5745.
- Ge, X. H., Wang, Q., Qian, Z. M., Zhu, L., Du, F., Yung, W. H., Yang, L. y Ke, Y. (2009) The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem*, **20**, 860-865.
- Giedraitis, V., Sundelof, J., Irizarry, M. C., Garevik, N., Hyman, B. T., Wahlund, L. O., Ingelsson, M. y Lannfelt, L. (2007) The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **427**, 127-131.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. y Gage, F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, **140**, 918-934.
- Glennner, G. G. y Wong, C. W. (1984a) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **122**, 1131-1135.
- Glennner, G. G. y Wong, C. W. (1984b) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **120**, 885-890.
- Gnana-Prakasam, J. P., Martin, P. M., Mysona, B. A., Roon, P., Smith, S. B. y Ganapathy, V. (2008) Hepcidin expression in mouse retina and its regulation via lipopolysaccharide/Toll-like receptor-4 pathway independent of Hfe. *Biochem J*, **411**, 79-88.
- Goodman, L. (1953) Alzheimer's disease; a clinico-pathologic analysis of twenty-three cases with a theory on pathogenesis. *J Nerv Ment Dis*, **118**, 97-130.
- Grzybicki, D., Gebhart, G. F. y Murphy, S. (1996) Expression of nitric oxide synthase type II in the spinal cord under conditions producing thermal hyperalgesia. *J Chem Neuroanat*, **10**, 221-229.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. y Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488.
- Guo, R. B., Wang, G. F., Zhao, A. P., Gu, J., Sun, X. L. y Hu, G. (2012) Paeoniflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats via inhibiting MAPKs/NF-kappaB-mediated inflammatory responses. *PLoS One*, **7**, e49701.
- Haass, C. y Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 101-112.
- Hanke, M. L. y Kielian, T. (2011a) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, **121**, 367-387.
- Hanke, M. L. y Kielian, T. (2011b) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, **121**, 367-387.
- Harada, N., Kanayama, M., Maruyama, A., Yoshida, A., Tazumi, K., Hosoya, T., Mimura, J., Toki, T., Maher, J. M., Yamamoto, M. y Itoh, K. (2011) Nrf2

- regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch Biochem Biophys*, **508**, 101-109.
- Harding, C., Heuser, J. y Stahl, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, **97**, 329-339.
- Hardy, J. (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, **110**, 1129-1134.
- Hardy, J. y Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S. G., O'Shea, A., Sharp, F. A., Lambe, E. M., Creagh, E. M., Golenbock, D. T., Tschopp, J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K. A. y Lavelle, E. C. (2011) Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem*, **286**, 9587-9597.
- Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A. y Carney, J. M. (1995) Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*, **131**, 193-202.
- Harrison, P. M. y Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 161-203.
- Harry, G. J. (2013) Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther*, **139**, 313-326.
- Hayden, M. S. y Ghosh, S. (2014) Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol*, **26**, 253-266.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. y Kummer, M. P. (2015a) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, **14**, 388-405.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. y Kummer, M. P. (2015b) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, **14**, 388-405.
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T. y Latz, E. (2015c) Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol*, **16**, 229-236.
- Heneka, M. T. y O'Banion, M. K. (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, **184**, 69-91.

- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. y Floyd, R. A. (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*,**28**, 1456-1462.
- Hewett, J. A. y Hewett, S. J. (2012) Induction of nitric oxide synthase-2 expression and measurement of nitric oxide production in enriched primary cortical astrocyte cultures. *Methods Mol Biol*,**814**, 251-263.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. y Goate, A. M. (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*,**3**, 77sr71.
- Horowitz, M. P., Milanese, C., Di Maio, R., Hu, X., Montero, L. M., Sanders, L. H., Tapias, V., Sepe, S., van Cappellen, W. A., Burton, E. A., Greenamyre, J. T. y Mastroberardino, P. G. (2011) Single-cell redox imaging demonstrates a distinctive response of dopaminergic neurons to oxidative insults. *Antioxid Redox Signal*,**15**, 855-871.
- Hsieh, Y. P., Huang, C. H., Lee, C. Y., Lin, C. Y. y Chang, C. C. (2014) Silencing of hepcidin enforces the apoptosis in iron-induced human cardiomyocytes. *J Occup Med Toxicol*,**9**, 11.
- Hu, J., Akama, K. T., Krafft, G. A., Chromy, B. A. y Van Eldik, L. J. (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*,**785**, 195-206.
- Huang, X., Atwood, C. S., Moir, R. D., Hartshorn, M. A., Tanzi, R. E. y Bush, A. I. (2004) Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A β peptides. *J Biol Inorg Chem*,**9**, 954-960.
- Huang, Y. H., Yang, Y. L., Tiao, M. M., Kuo, H. C., Huang, L. T. y Chuang, J. H. (2012) Hepcidin protects against lipopolysaccharide-induced liver injury in a mouse model of obstructive jaundice. *Peptides*,**35**, 212-217.
- Ingrassia, R., Lanzillotta, A., Sarnico, I., Benarese, M., Blasi, F., Borgese, L., Bilo, F., Depero, L., Chiarugi, A., Spano, P. F. y Pizzi, M. (2012) 1B/(-)IRE DMT1 expression during brain ischemia contributes to cell death mediated by NF-kappaB/RelA acetylation at Lys310. *PLoS One*,**7**, e38019.
- Jeong, J. W., Lee, H. H., Han, M. H., Kim, G. Y., Kim, W. J. y Choi, Y. H. (2014) Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chem Biol Interact*,**212**, 30-39.
- Jin, J. J., Kim, H. D., Maxwell, J. A., Li, L. y Fukuchi, K. (2008) Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*,**5**, 23.
- Kaech, S. y Banker, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*,**1**, 2406-2415.
- Kaisho, T. y Akira, S. (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*,**117**, 979-987; quiz 988.
- Kanfer, J. N., Sorrentino, G. y Sitar, D. S. (1998) Phospholipases as mediators of amyloid beta peptide neurotoxicity: an early event contributing to

- neurodegeneration characteristic of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*,**257**, 93-96.
- Kar, S., Seto, D., Gaudreau, P. y Quirion, R. (1996) Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci*,**16**, 1034-1040.
- Kawamoto, E. M., Lima, L. S., Munhoz, C. D., Yshii, L. M., Kinoshita, P. F., Amara, F. G., Pestana, R. R., Orellana, A. M., Cipolla-Neto, J., Britto, L. R., Avellar, M. C., Rossoni, L. V. y Scavone, C. (2012) Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kappaB in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*,**90**, 213-228.
- Kemna, E., Pickkers, P., Nemeth, E., van der Hoeven, H. y Swinkels, D. (2005) Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*,**106**, 1864-1866.
- Kemna, E. H., Tjalsma, H., Willems, H. L. y Swinkels, D. W. (2008) Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*,**93**, 90-97.
- Kil, I. S., Kim, S. Y. y Park, J. W. (2008) Glutathionylation regulates IkappaB. *Biochem Biophys Res Commun*,**373**, 169-173.
- Kim, H. S., Cho, J. Y., Kim, D. H., Yan, J. J., Lee, H. K., Suh, H. W. y Song, D. K. (2004) Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. *Biol Pharm Bull*,**27**, 120-121.
- King, M. M. y Huang, C. Y. (1984) The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *J Biol Chem*,**259**, 8847-8856.
- Kitazawa, M., Cheng, D., Tsukamoto, M. R., Koike, M. A., Wes, P. D., Vasilevko, V., Cribbs, D. H. y LaFerla, F. M. (2011) Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol*,**187**, 6539-6549.
- Koenig, C. L., Miller, J. C., Nelson, J. M., Ward, D. M., Kushner, J. P., Bockenstedt, L. K., Weis, J. J., Kaplan, J. y De Domenico, I. (2009) Toll-like receptors mediate induction of hepcidin in mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Blood*,**114**, 1913-1918.
- Koorts, A. M. y Viljoen, M. (2007) Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem*,**113**, 30-54.
- Kostrzewa, R. M. *Handbook of neurotoxicity*.
- Kovtunovych, G., Eckhaus, M. A., Ghosh, M. C., Ollivierre-Wilson, H. y Rouault, T. A. (2010) Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*,**116**, 6054-6062.
- Kruszewski, M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*,**531**, 81-92.

- LaFerla, F. M. y Oddo, S. (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*, **11**, 170-176.
- Landreth, G. E. y Reed-Geaghan, E. G. (2009) Toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, **336**, 137-153.
- Lavigne, M. C., Malech, H. L., Holland, S. M. y Leto, T. L. (2001) Genetic requirement of p47phox for superoxide production by murine microglia. *FASEB J*, **15**, 285-287.
- Lazarowski, E. R., Winegar, D. A., Nolan, R. D., Oberdisse, E. y Lapetina, E. G. (1990) Effect of protein kinase A on inositide metabolism and rap 1 G-protein in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, **265**, 13118-13123.
- Lee, J. A. y Cole, G. J. (2007) Generation of transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under control of zebrafish amyloid precursor protein gene regulatory elements. *Zebrafish*, **4**, 277-286.
- Lee, P., Peng, H., Gelbart, T. y Beutler, E. (2004) The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9263-9265.
- Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L. y Beutler, E. (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1906-1910.
- Lee, Y. J., Han, S. B., Nam, S. Y., Oh, K. W. y Hong, J. T. (2010) Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, **33**, 1539-1556.
- Leitner, D. F. y Connor, J. R. (2012) Functional roles of transferrin in the brain. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 393-402.
- Levi, S., Yewdall, S. J., Harrison, P. M., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A. y Arosio, P. (1992) Evidence of H- and L-chains have cooperative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J*, **288 (Pt 2)**, 591-596.
- Li, L., Holscher, C., Chen, B. B., Zhang, Z. F. y Liu, Y. Z. (2011) Hepcidin treatment modulates the expression of divalent metal transporter-1, ceruloplasmin, and ferroportin-1 in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Biol Trace Elem Res*, **143**, 1581-1593.
- Lis, A., Paradkar, P. N., Singleton, S., Kuo, H. C., Garrick, M. D. y Roth, J. A. (2005) Hypoxia induces changes in expression of isoforms of the divalent metal transporter (DMT1) in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Biochem Pharmacol*, **69**, 1647-1655.
- Liu, B., Moloney, A., Meehan, S., Morris, K., Thomas, S. E., Serpell, L. C., Hider, R., Marciniak, S. J., Lomas, D. A. y Crowther, D. C. (2011) Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation. *J Biol Chem*, **286**, 4248-4256.
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X. y Guo, H. (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol*, **7**, 8342-8355.

- Loeffler, D. A., Connor, J. R., Juneau, P. L., Snyder, B. S., Kanaley, L., DeMaggio, A. J., Nguyen, H., Brickman, C. M. y LeWitt, P. A. (1995) Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. *J Neurochem*, **65**, 710-724.
- Lossinsky, A. S. y Shivers, R. R. (2004) Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol*, **19**, 535-564.
- Lotz, M., Ebert, S., Esselmann, H., Iliev, A. I., Prinz, M., Wiazewicz, N., Wiltfang, J., Gerber, J. y Nau, R. (2005) Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. *J Neurochem*, **94**, 289-298.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L. y Markesbery, W. R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*, **158**, 47-52.
- Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I. y Weiss, G. (2003) Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, **101**, 4148-4154.
- Lymboussaki, A., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Haile, D. J. y Pietrangelo, A. (2003) The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol*, **39**, 710-715.
- Macco, R., Pelizzoni, I., Consonni, A., Vitali, I., Giacalone, G., Martinelli Boneschi, F., Codazzi, F., Grohovaz, F. y Zacchetti, D. (2013) Astrocytes acquire resistance to iron-dependent oxidative stress upon proinflammatory activation. *J Neuroinflammation*, **10**, 130.
- Malik, I. A., Naz, N., Sheikh, N., Khan, S., Moriconi, F., Blaschke, M. y Ramadori, G. (2011) Comparison of changes in gene expression of transferrin receptor-1 and other iron-regulatory proteins in rat liver and brain during acute-phase response. *Cell Tissue Res*, **344**, 299-312.
- Malkin, R. y Rabinowitz, J. C. (1967) Nonheme iron electron-transfer proteins. *Annu Rev Biochem*, **36**, 113-148.
- Mantyh, P. W., Ghilardi, J. R., Rogers, S., DeMaster, E., Allen, C. J., Stimson, E. R. y Maggio, J. E. (1993) Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem*, **61**, 1171-1174.
- Marques, F., Falcao, A. M., Sousa, J. C., Coppola, G., Geschwind, D., Sousa, N., Correia-Neves, M. y Palha, J. A. (2009) Altered iron metabolism is part of the choroid plexus response to peripheral inflammation. *Endocrinology*, **150**, 2822-2828.
- Martins, E. A., Robalinho, R. L. y Meneghini, R. (1995) Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 128-134.
- Masters, C. L. y Beyreuther, K. (2006) Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the Abeta amyloid pathway. *Brain*, **129**, 2823-2839.

- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. y Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4245-4249.
- Matak, P., Chaston, T. B., Chung, B., Srai, S. K., McKie, A. T. y Sharp, P. A. (2009) Activated macrophages induce hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells. *Haematologica*, **94**, 773-780.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. y Rydel, R. E. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, **12**, 376-389.
- Mattson, M. P., Tomaselli, K. J. y Rydel, R. E. (1993) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res*, **621**, 35-49.
- McGeer, P. L. y McGeer, E. G. (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, **21**, 195-218.
- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W. y Simpson, R. J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, **5**, 299-309.
- Meadowcroft, M. D., Connor, J. R., Smith, M. B. y Yang, Q. X. (2009) MRI and histological analysis of beta-amyloid plaques in both human Alzheimer's disease and APP/PS1 transgenic mice. *J Magn Reson Imaging*, **29**, 997-1007.
- Mehlhase, J., Gieche, J., Widmer, R. y Grune, T. (2006) Ferritin levels in microglia depend upon activation: modulation by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 854-859.
- Mehlhase, J., Sandig, G., Pantopoulos, K. y Grune, T. (2005) Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic Biol Med*, **38**, 276-285.
- Mena, N. P., Esparza, A., Tapia, V., Valdes, P. y Nunez, M. T. (2008) Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **294**, G192-198.
- Mena, N. P., Urrutia, P. J., Lourido, F., Carrasco, C. M. y Nunez, M. T. (2015) Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion*, **21C**, 92-105.
- Michell-Robinson, M. A., Touil, H., Healy, L. M., Owen, D. R., Durafourt, B. A., Bar-Or, A., Antel, J. P. y Moore, C. S. (2015) Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, **138**, 1138-1159.
- Millonig, G., Ganzleben, I., Peccerella, T., Casanovas, G., Brodziak-Jarosz, L., Breitkopf-Heinlein, K., Dick, T. P., Seitz, H. K., Muckenthaler, M. U. y Mueller, S. (2012) Sustained submicromolar H₂O₂ levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem*, **287**, 37472-37482.

- Moos, T. y Rosengren Nielsen, T. (2006) Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron. *Semin Pediatr Neurol*,**13**, 149-157.
- Morgan, M. J. y Liu, Z. G. (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*,**21**, 103-115.
- Morimoto, K., Yoshimi, K., Tonohiro, T., Yamada, N., Oda, T. y Kaneko, I. (1998) Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neuroscience*,**84**, 479-487.
- Muckenthaler, M. U., Galy, B. y Hentze, M. W. (2008) Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*,**28**, 197-213.
- Mueller, S. (2005) Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors*,**24**, 171-181.
- Mulero, V. y Brock, J. H. (1999) Regulation of iron metabolism in murine J774 macrophages: role of nitric oxide-dependent and -independent pathways following activation with gamma interferon and lipopolysaccharide. *Blood*,**94**, 2383-2389.
- Munoz, P., Humeres, A., Elgueta, C., Kirkwood, A., Hidalgo, C. y Nunez, M. T. (2011) Iron mediates N-methyl-D-aspartate receptor-dependent stimulation of calcium-induced pathways and hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem*,**286**, 13382-13392.
- Mura, E., Zappettini, S., Preda, S., Biundo, F., Lanni, C., Grilli, M., Cavallero, A., Olivero, G., Salamone, A., Govoni, S. y Marchi, M. (2012) Dual effect of beta-amyloid on alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One*,**7**, e29661.
- Murray, P. J. (2006) Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*,**6**, 379-386.
- Nakajima, S. y Kitamura, M. (2013) Bidirectional regulation of NF-kappaB by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic Biol Med*,**65**, 162-174.
- Namgaladze, D., Hofer, H. W. y Ullrich, V. (2002) Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem*,**277**, 5962-5969.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K. y Ganz, T. (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*,**113**, 1271-1276.
- Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A. y Ganz, T. (2003) Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*,**101**, 2461-2463.
- Newton, K. y Dixit, V. M. (2012) Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,**4**.

- Nguyen, N. B., Callaghan, K. D., Ghio, A. J., Haile, D. J. y Yang, F. (2006) Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **291**, L417-425.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. y Vaulont, S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8780-8785.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A. y Vaulont, S. (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, **110**, 1037-1044.
- Noh, K. M. y Koh, J. Y. (2000) Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*, **20**, RC111.
- Nunan, J. y Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*, **483**, 6-10.
- Nunez, M. T., 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 Radic Biol Med*, **37**, 953-960.
- Nunez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V. y Salazar, J. (2012) Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, **25**, 761-776.
- O'Halloran, S., O'Leary, A., Kuijper, T. y Downer, E. J. (2014) MyD88 acts as an adaptor protein for inflammatory signalling induced by amyloid-beta in macrophages. *Immunol Lett*, **162**, 109-118.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P. y LaFerla, F. M. (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 1063-1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. y LaFerla, F. M. (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, **39**, 409-421.
- Oliveira, S. J., Pinto, J. P., Picarote, G., Costa, V. M., Carvalho, F., Rangel, M., de Sousa, M. y de Almeida, S. F. (2009) ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBP α activity. *PLoS One*, **4**, e6618.
- Pagani, A., Nai, A., Corna, G., Bosurgi, L., Rovere-Querini, P., Camaschella, C. y Silvestri, L. (2011) Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*, **118**, 736-746.
- Pantopoulos, K., Weiss, G. y Hentze, M. W. (1996) Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol*, **16**, 3781-3788.
- Paradkar, P. N. y Roth, J. A. (2006a) Nitric oxide transcriptionally down-regulates specific isoforms of divalent metal transporter (DMT1) via NF-kappaB. *J Neurochem*, **96**, 1768-1777.

- Paradkar, P. N. y Roth, J. A. (2006b) Post-translational and transcriptional regulation of DMT1 during P19 embryonic carcinoma cell differentiation by retinoic acid. *Biochem J*, **394**, 173-183.
- Park, J., Min, J. S., Kim, B., Chae, U. B., Yun, J. W., Choi, M. S., Kong, I. K., Chang, K. T. y Lee, D. S. (2015) Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-kappaB pathways. *Neurosci Lett*, **584**, 191-196.
- Park, L., Zhou, P., Pitstick, R., Capone, C., Anrather, J., Norris, E. H., Younkin, L., Younkin, S., Carlson, G., McEwen, B. S. y Iadecola, C. (2008) Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1347-1352.
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F. y Bhat, N. R. (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res*, **77**, 540-551.
- Pelizzoni, I., Zacchetti, D., Campanella, A., Grohovaz, F. y Codazzi, F. (2013) Iron uptake in quiescent and inflammation-activated astrocytes: a potentially neuroprotective control of iron burden. *Biochim Biophys Acta*, **1832**, 1326-1333.
- Perez-Severiano, F., Salvatierra-Sanchez, R., Rodriguez-Perez, M., Cuevas-Martinez, E. Y., Guevara, J., Limon, D., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J. y Santamaria, A. (2004) S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol*, **489**, 197-202.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A. y Holmes, C. (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, **6**, 193-201.
- Peyssonaux, C., Zinkernagel, A. S., Datta, V., Lauth, X., Johnson, R. S. y Nizet, V. (2006) TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, **107**, 3727-3732.
- Phani, S., Loike, J. D. y Przedborski, S. (2012) Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **18 Suppl 1**, S207-209.
- Piaceri, I., Nacmias, B. y Sorbi, S. (2013) Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, **5**, 167-177.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. y Loreal, O. (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*, **276**, 7811-7819.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. y Cotman, C. W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci*, **13**, 1676-1687.
- Pinero, D. J., Hu, J. y Connor, J. R. (2000a) Alterations in the interaction between iron regulatory proteins and their iron responsive element in normal and Alzheimer's diseased brains. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 761-776.

- Pinero, D. J., Hu, J., Cook, B. M., Scaduto, R. C., Jr. y Connor, J. R. (2000b) Interleukin-1beta increases binding of the iron regulatory protein and the synthesis of ferritin by increasing the labile iron pool. *Biochim Biophys Acta*, **1497**, 279-288.
- Pomara, N. y Sidtis, J. J. (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **362**, 1844; author reply 1844-1845.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A. y Herms, J. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, **26**, 7212-7221.
- Pugazhenthii, S., Zhang, Y., Bouchard, R. y Mahaffey, G. (2013) Induction of an inflammatory loop by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha involves NF-kB and STAT-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. *PLoS One*, **8**, e69585.
- Qian, Z. M., He, X., Liang, T., Wu, K. C., Yan, Y. C., Lu, L. N., Yang, G., Luo, Q. Q., Yung, W. H. y Ke, Y. (2014) Lipopolysaccharides upregulate hepcidin in neuron via microglia and the IL-6/STAT3 signaling pathway. *Mol Neurobiol*, **50**, 811-820.
- Qin, L., Liu, Y., Cooper, C., Liu, B., Wilson, B. y Hong, J. S. (2002) Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem*, **83**, 973-983.
- Qin, L., Liu, Y., Hong, J. S. y Crews, F. T. (2013) NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia*, **61**, 855-868.
- Querfurth, H. W. y LaFerla, F. M. (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **362**, 329-344.
- Raha, A. A., Vaishnav, R. A., Friedland, R. P., Bomford, A. y Raha-Chowdhury, R. (2013) The systemic iron-regulatory proteins hepcidin and ferroportin are reduced in the brain in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, **1**, 55.
- Raha-Chowdhury, R., Raha, A. A., Forostyak, S., Zhao, J. W., Stott, S. R. y Bomford, A. (2015) Expression and cellular localization of hepcidin mRNA and protein in normal rat brain. *BMC Neurosci*, **16**, 24.
- Rathnasamy, G., Ling, E. A. y Kaur, C. (2011) Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligodendrocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species. *J Neurosci*, **31**, 17982-17995.
- Rathore, K. I., Redensek, A. y David, S. (2012) Iron homeostasis in astrocytes and microglia is differentially regulated by TNF-alpha and TGF-beta1. *Glia*, **60**, 738-750.
- Ridder, D. A. y Schwaninger, M. (2009) NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience*, **158**, 995-1006.

- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. y Wenger, R. H. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*,**272**, 20055-20062.
- Rolston, R. K., Perry, G., Zhu, X., Castellani, R. J., Dwyer, B. E., Lee, H. G., Petersen, R. B. y Smith, M. A. (2009) Iron: A Pathological Mediator of Alzheimer Disease? *Agro Food Ind Hi Tech*,**19**, 33-36.
- Rothwell, N. J. y Luheshi, G. N. (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*,**23**, 618-625.
- Ruiz-Munoz, A. M., Nieto-Escamez, F. A., Aznar, S., Colomina, M. T. y Sanchez-Santed, F. (2011) Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic Abeta(1-42) infusions in Wistar rats. *Neurotoxicology*,**32**, 836-844.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L. M., Nunez, M. T., Garrick, M. D., Raisman-Vozari, R. y Hirsch, E. C. (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**105**, 18578-18583.
- Salgado, J. C., Olivera-Nappa, A., Gerdtzen, Z. P., Tapia, V., Theil, E. C., Conca, C. y Nunez, M. T. (2010) Mathematical modeling of the dynamic storage of iron in ferritin. *BMC Syst Biol*,**4**, 147.
- Salminen, A., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. y Suuronen, T. (2009) Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol*,**87**, 181-194.
- Sareila, O., Kelkka, T., Pizzolla, A., Hultqvist, M. y Holmdahl, R. (2011) NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal*,**15**, 2197-2208.
- Sasaki, N., Toki, S., Chowei, H., Saito, T., Nakano, N., Hayashi, Y., Takeuchi, M. y Makita, Z. (2001) Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res*,**888**, 256-262.
- Sayre, L. M., Perry, G., Harris, P. L., Liu, Y., Schubert, K. A. y Smith, M. A. (2000) In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*,**74**, 270-279.
- Scamuffa, N., Basak, A., Lalou, C., Wargnier, A., Marcinkiewicz, J., Siegfried, G., Chretien, M., Calvo, F., Seidah, N. G. y Khatib, A. M. (2008) Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PC5, PACE4 and PC7. *Gut*,**57**, 1573-1582.
- Schubert, D. y Chevion, M. (1995) The role of iron in beta amyloid toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*,**216**, 702-707.
- Schulz, K., Kroner, A. y David, S. (2012) Iron efflux from astrocytes plays a role in remyelination. *J Neurosci*,**32**, 4841-4847.

- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J. y Nagano, T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*, **278**, 3170-3175.
- Seyidova, D., Aliyev, A., Rzayev, N., Obrenovich, M., Lamb, B. T., Smith, M. A., de la Torre, J. C., Perry, G. y Aliev, G. (2004) The role of nitric oxide in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease. *In Vivo*, **18**, 325-333.
- Shearman, M. S., Ragan, C. I. y Iversen, L. L. (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1470-1474.
- Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Nunomura, A., Chiba, S., Perry, G., Smith, M. A. y Fujimoto, S. (2000) Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 5-9.
- Skalnik, D. G., Strauss, E. C. y Orkin, S. H. (1991) CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J Biol Chem*, **266**, 16736-16744.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Moir, R., Michaelson, S., Monard, D., Beyreuther, K. y Masters, C. L. (1992) Association and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from chick brain extracellular matrix. *J Neurosci*, **12**, 4143-4150.
- Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K. y Banik, N. L. (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*, **87**, 10-20.
- Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M. y Perry, G. (1997a) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9866-9868.
- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S. y Perry, G. (1997b) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **17**, 2653-2657.
- Smith, M. A., Wehr, K., Harris, P. L., Siedlak, S. L., Connor, J. R. y Perry, G. (1998) Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res*, **788**, 232-236.
- Song, N., Wang, J., Jiang, H. y Xie, J. (2010) Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, **48**, 332-341.
- Song, Y., Qu, R., Zhu, S., Zhang, R. y Ma, S. (2012) Rhynchophylline attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of MAPK/NF-kappaB signaling pathways in primary microglia. *Phytother Res*, **26**, 1528-1533.
- Sow, F. B., Florence, W. C., Satoskar, A. R., Schlesinger, L. S., Zwilling, B. S. y Lafuse, W. P. (2007) Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol*, **82**, 934-945.

- Spink, K. S. (1990) Psychological characteristics of male gymnasts: differences between competitive levels. *J Sports Sci*, **8**, 149-157.
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T. y Moore, K. J. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, **11**, 155-161.
- Stine, W. B., Jungbauer, L., Yu, C. y LaDu, M. J. (2011) Preparing synthetic Abeta in different aggregation states. *Methods Mol Biol*, **670**, 13-32.
- Sui, X., Liu, J. y Yang, X. (2014) Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, **30**, 233-242.
- Tabata, H. (2015) Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*, **9**, 114.
- Taylor, M., Qu, A., Anderson, E. R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F. J. y Shah, Y. M. (2011) Hypoxia-inducible factor-2alpha mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*, **140**, 2044-2055.
- Teeuwssen, V. J., Schalken, J. J., van der Groen, G., van de Akker, R., Goudsmit, J. y Osterhaus, A. D. (1991) An inhibition enzyme immunoassay using a human monoclonal antibody (K14) reactive with gp41 of HIV-1 for the serology of HIV-1 infections. *AIDS*, **5**, 893-896.
- Terrill-Usery, S. E., Mohan, M. J. y Nichols, M. R. (2014) Amyloid-beta(1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1beta despite significant intracellular IL-1beta accumulation in microglia. *Biochim Biophys Acta*, **1842**, 2276-2285.
- Thannickal, V. J. y Fanburg, B. L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L1005-1028.
- Theurl, I., Theurl, M., Seifert, M., Mair, S., Nairz, M., Rumpold, H., Zoller, H., Bellmann-Weiler, R., Niederegger, H., Talasz, H. y Weiss, G. (2008) Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*, **111**, 2392-2399.
- Thomsen, M. S., Andersen, M. V., Christoffersen, P. R., Jensen, M. D., Lichota, J. y Moos, T. (2015) Neurodegeneration with inflammation is accompanied by accumulation of iron and ferritin in microglia and neurons. *Neurobiol Dis*.
- Tobon-Velasco, J. C., Limon-Pacheco, J. H., Orozco-Ibarra, M., Macias-Silva, M., Vazquez-Victorio, G., Cuevas, E., Ali, S. F., Cuadrado, A., Pedraza-Chaverri, J. y Santamaria, A. (2013) 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-kappaB factors. *Toxicology*, **304**, 109-119.
- Tsukuda, K., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L. J., Sakata, A., Jing, F., Iwai, M. y Horiuchi, M. (2009) Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension*, **54**, 782-787.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. y Abraham, W. C. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*,**70**, 1-32.
- Udan, M. L., Ajit, D., Crouse, N. R. y Nichols, M. R. (2008) Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem*,**104**, 524-533.
- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M. y Yodoi, J. (2002) Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*,**4**, 405-414.
- Urrutia, P., Aguirre, P., Esparza, A., Tapia, V., Mena, N. P., Arredondo, M., Gonzalez-Billault, C. y Nunez, M. T. (2013) Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J Neurochem*,**126**, 541-549.
- Urrutia, P. J., Mena, N. P. y Nunez, M. T. (2014) The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol*,**5**, 38.
- Uusimaki, T., Margaris, G., Trohidou, K., Granitzer, P., Rumpf, K., Sezen, M. y Kothleitner, G. (2013) Three dimensional quantitative characterization of magnetite nanoparticles embedded in mesoporous silicon: local curvature, demagnetizing factors and magnetic Monte Carlo simulations. *Nanoscale*,**5**, 11944-11953.
- Vaucher, E., Aumont, N., Pearson, D., Rowe, W., Poirier, J. y Kar, S. (2001) Amyloid beta peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *J Chem Neuroanat*,**21**, 323-329.
- Verga Falzacappa, M. V., Vujic Spasic, M., Kessler, R., Stolte, J., Hentze, M. W. y Muckenthaler, M. U. (2007) STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*,**109**, 353-358.
- Villarreal, P., Le Blanc, S. y Arredondo, M. (2012) Interleukin-6 and lipopolysaccharide modulate hepcidin mRNA expression by HepG2 cells. *Biol Trace Elem Res*,**150**, 496-501.
- Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F. y Sporn, M. B. (1996) Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med*,**184**, 1425-1433.
- Volke, M., Gale, D. P., Maegdefrau, U., Schley, G., Klanke, B., Bosserhoff, A. K., Maxwell, P. H., Eckardt, K. U. y Warnecke, C. (2009) Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS One*,**4**, e7875.
- Wajant, H. y Scheurich, P. (2011) TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J*,**278**, 862-876.
- Wallace, M. N., Geddes, J. G., Farquhar, D. A. y Masson, M. R. (1997) Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol*,**144**, 266-272.

- Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schuffer, W. y Fassbender, K. (2007) Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, **20**, 947-956.
- Wang, D., Wang, L. H., Zhao, Y., Lu, Y. P. y Zhu, L. (2010a) Hypoxia regulates the ferrous iron uptake and reactive oxygen species level via divalent metal transporter 1 (DMT1) Exon1B by hypoxia-inducible factor-1. *IUBMB Life*, **62**, 629-636.
- Wang, J., Song, N., Jiang, H. y Xie, J. (2013) Pro-inflammatory cytokines modulate iron regulatory protein 1 expression and iron transportation through reactive oxygen/nitrogen species production in ventral mesencephalic neurons. *Biochim Biophys Acta*, **1832**, 618-625.
- Wang, Q., Du, F., Qian, Z. M., Ge, X. H., Zhu, L., Yung, W. H., Yang, L. y Ke, Y. (2008) Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology*, **149**, 3920-3925.
- Wang, S. M., Fu, L. J., Duan, X. L., Crooks, D. R., Yu, P., Qian, Z. M., Di, X. J., Li, J., Rouault, T. A. y Chang, Y. Z. (2010b) Role of hepcidin in murine brain iron metabolism. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 123-133.
- Wang, X., Garrick, M. D., Yang, F., Dailey, L. A., Piantadosi, C. A. y Ghio, A. J. (2005) TNF, IFN-gamma, and endotoxin increase expression of DMT1 in bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **289**, L24-33.
- Ward, D. M. y Kaplan, J. (2012) Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1426-1433.
- Wardrop, S. L. y Richardson, D. R. (2000) Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur J Biochem*, **267**, 6586-6593.
- Wilkinson, N. y Pantopoulos, K. (2014) The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol*, **5**, 176.
- Williams, J. H., Wilcock, G. K., Seeburger, J., Dallob, A., Laterza, O., Potter, W. y Smith, A. D. (2011a) Non-linear relationships of cerebrospinal fluid biomarker levels with cognitive function: an observational study. *Alzheimers Res Ther*, **3**, 5.
- Williams, K., Wilson, M. A. y Bressler, J. (2000) Regulation and developmental expression of the divalent metal-ion transporter in the rat brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 563-571.
- Williams, R., Rohr, A. M., Wang, W. T., Choi, I. Y., Lee, P., Berman, N. E., Lynch, S. G. y LeVine, S. M. (2011b) Iron deposition is independent of cellular inflammation in a cerebral model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci*, **12**, 59.
- Wisniewski, T. y Goni, F. (2015) Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron*, **85**, 1162-1176.
- Wrighting, D. M. y Andrews, N. C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, **108**, 3204-3209.

- Wu, M., Bian, Q., Liu, Y., Fernandes, A. F., Taylor, A., Pereira, P. y Shang, F. (2009) Sustained oxidative stress inhibits NF-kappaB activation partially via inactivating the proteasome. *Free Radic Biol Med*, **46**, 62-69.
- Wu, S., Zhang, K., Lv, C., Wang, H., Cheng, B., Jin, Y., Chen, Q., Lian, Q. y Fang, X. (2012) Nuclear factor-kappaB mediated lipopolysaccharide-induced mRNA expression of hepcidin in human peripheral blood leukocytes. *Innate Immun*, **18**, 318-324.
- Xu, H., Jiang, H., Wang, J. y Xie, J. (2010) Rg1 protects the MPP+-treated MES23.5 cells via attenuating DMT1 up-regulation and cellular iron uptake. *Neuropharmacology*, **58**, 488-494.
- Yamamoto, A., Shin, R. W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F. y Kitamoto, T. (2002) Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **82**, 1137-1147.
- Yan, Y. y Wang, C. (2006) Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. *J Mol Biol*, **364**, 853-862.
- Yang, C. S., Kim, J. J., Lee, S. J., Hwang, J. H., Lee, C. H., Lee, M. S. y Jo, E. K. (2013) TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1. *J Immunol*, **190**, 6368-6377.
- Yang, C. S., Shin, D. M., Kim, K. H., Lee, Z. W., Lee, C. H., Park, S. G., Bae, Y. S. y Jo, E. K. (2009) NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J Immunol*, **182**, 3696-3705.
- Yang, F., Liu, X. B., Quinones, M., Melby, P. C., Ghio, A. y Haile, D. J. (2002) Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J Biol Chem*, **277**, 39786-39791.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. y Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, **250**, 279-282.
- Yao, C., Yang, D., Wan, Z., Wang, Z., Liu, R., Wu, Y., Yao, S., Yuan, S. y Shang, Y. (2014) Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response in primary astrocytes. *Int Immunopharmacol*, **18**, 85-89.
- Yeh, K. Y., Yeh, M. y Glass, J. (2004) Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **286**, G385-394.
- Yoon, S., Woo, S. U., Kang, J. H., Kim, K., Kwon, M. H., Park, S., Shin, H. J., Gwak, H. S. y Chwae, Y. J. (2010) STAT3 transcriptional factor activated by reactive oxygen species induces IL6 in starvation-induced autophagy of cancer cells. *Autophagy*, **6**, 1125-1138.
- Zakin, M. M. (1992) Regulation of transferrin gene expression. *FASEB J*, **6**, 3253-3258.

- Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R. y Crichton, R. R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*,**5**, 863-873.
- Zechel, S., Huber-Wittmer, K. y von Bohlen und Halbach, O. (2006) Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J Neurosci Res*,**84**, 790-800.
- Zhang, F. y Jiang, L. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*,**11**, 243-256.
- Zhang, F., Zhou, H., Wilson, B. C., Shi, J. S., Hong, J. S. y Gao, H. M. (2012a) Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord*,**18 Suppl 1**, S213-217.
- Zhang, W., Wang, L. Z., Yu, J. T., Chi, Z. F. y Tan, L. (2012b) Increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*,**315**, 67-71.
- Zhang, Z., Hou, L., Song, J. L., Song, N., Sun, Y. J., Lin, X., Wang, X. L., Zhang, F. Z. y Ge, Y. L. (2014) Pro-inflammatory cytokine-mediated ferroportin down-regulation contributes to the nigral iron accumulation in lipopolysaccharide-induced Parkinsonian models. *Neuroscience*,**257**, 20-30.
- Zheng, W., Xin, N., Chi, Z. H., Zhao, B. L., Zhang, J., Li, J. Y. y Wang, Z. Y. (2009) Divalent metal transporter 1 is involved in amyloid precursor protein processing and Abeta generation. *FASEB J*,**23**, 4207-4217.
- Zigler, J. S., Jr., Jernigan, H. M., Jr., Garland, D. y Reddy, V. N. (1985) The effects of "oxygen radicals" generated in the medium on lenses in organ culture: inhibition of damage by chelated iron. *Arch Biochem Biophys*,**241**, 163-172.

ORIGINAL
ARTICLE

Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells

Pamela Urrutia,* Pabla Aguirre,* Andrés Esparza,* Victoria Tapia,* Natalia P. Mena,* Miguel Arredondo,† Christian González-Billault* and Marco T. Núñez*

*Department of Biology, Faculty of Sciences, Universidad de Chile and Research Ring on Oxidative Stress in the Nervous System, Santiago, Chile

†Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Abstract

Inflammation and iron accumulation are present in a variety of neurodegenerative diseases that include Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The study of the putative association between inflammation and iron accumulation in central nervous system cells is relevant to understand the contribution of these processes to the progression of neuronal death. In this study, we analyzed the effects of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) and of lipopolysaccharide on total cell iron content and on the expression and abundance of the iron transporters divalent metal transporter 1 (DMT1) and Ferroportin 1 (FPN1) in neurons, astrocytes and microglia obtained from rat brain. Considering previous reports indicating that inflammatory stimuli induce the systemic synthesis of the master iron regulator hepcidin, we identified brain cells that produce hepcidin in response to inflammatory stimuli, as well as

hepcidin-target cells. We found that inflammatory stimuli increased the expression of DMT1 in neurons, astrocytes, and microglia. Inflammatory stimuli also induced the expression of hepcidin in astrocytes and microglia, but not in neurons. Incubation with hepcidin decreased the expression of FPN1 in the three cell types. The net result of these changes was increased iron accumulation in neurons and microglia but not in astrocytes. The data presented here establish for the first time a causal association between inflammation and iron accumulation in brain cells, probably promoted by changes in DMT1 and FPN1 expression and mediated in part by hepcidin. This connection may potentially contribute to the progression of neurodegenerative diseases by enhancing iron-induced oxidative damage.

Keywords: DMT1, FPN1, hepcidin, inflammation, iron accumulation, neurodegeneration.

J. Neurochem. (2013) **126**, 541–549.

Active inflammatory processes and iron accumulation are hallmarks of a variety of neurodegenerative diseases that include Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) (Hunot and Hirsch 2003; Ong and Farooqui 2005; Cahill *et al.* 2009; Sian-Hulsmann *et al.* 2011; von Bernhardi and Eugenin 2012). Inflammation is mediated by reactive microglia and astrocytes that become neurotoxic through the secretion of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF- α (Kaushal and Schlichter 2008; Lee *et al.* 2010; Smith *et al.* 2012). Indeed, the brains of PD patients contain elevated levels of cytokines, including IL1- β , IL2, IL4, IL-6, and TNF- α (Mogi *et al.* 1994a, b, 1996), while in AD microglia surrounding A β plaques show increased secretion of

Received January 4, 2013; revised manuscript received February 27, 2013; accepted March 1, 2013.

Address correspondence and reprint requests to Marco T. Núñez, Department of Biology, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Santiago, Chile. E-mail: mnunez@uchile.cl

Abbreviations used: CD11b, Cluster of differentiation molecule 11B; CMF-HBSS, Calcium- and magnesium-free Hank's buffered salt solution; CNS, Central nervous system; DIV, Days *in vitro*; DMT1, Divalent metal transporter 1; FBS, Fetal bovine serum; FPN1, Ferroportin 1; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; IL-6, Interleukin 6; INF- γ , Interferon-gamma; LPS, Lipopolysaccharide; MEM, Minimum essential medium; NF- κ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NTA, Nitrilotriacetic acid; RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction; TGF- β 1, Transforming growth factor beta 1; TNF- α , Tumor necrosis factor alpha; Tuj1, Neuron-specific class III beta-tubulin.

IL-1, IL-6, and TNF- α (Rogers and Lue 2001; Lee *et al.* 2010).

Iron is an intrinsic producer of reactive oxygen species through connected processes including hydroxyl radical formation, glutathione consumption, protein aggregation, lipid peroxidation, and nucleic acid modification (Jomova and Valko 2011; Núñez *et al.* 2012). Cellular iron homeostasis is regulated by the iron transporters DMT1 and FPN1 and by the iron storage protein ferritin. The main iron uptake transporter is DMT1, while FPN1 functions essentially as an iron efflux transporter (Anderson and Vulpe 2009). In multiple cell types, diverse cytokines modify DMT1 expression. As an example, INF- γ and TNF- α up-regulate the expression of DMT1 and increase iron uptake into bronchial epithelial cells (Wang *et al.* 2005). Similarly, DMT1 expression is transcriptionally enhanced by nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) (Paradkar and Roth 2006), which is activated downstream of many cytokine receptors including the receptors for TNF- α , lipopolysaccharide (LPS), and IL-1 (Hanke and Kielian 2011; Wajant and Scheurich 2011).

Hepcidin, a small polypeptide synthesized and secreted by the liver, is considered a master regulator of body iron homeostasis. The physiological function of hepcidin is to decrease circulating iron levels through down-regulation of FPN1 in macrophages (Nemeth *et al.* 2004). The action of hepcidin is tissue-specific: in enterocytes, hepcidin does not change FPN1 levels but decreases DMT1 expression (Chaston *et al.* 2008; Mena *et al.* 2008; Brasse-Lagnel *et al.* 2011). Hepcidin-induced FPN1 degradation is transient reaching a maximal effect at 2–6 h, with FPN1 levels returning to control values at 24 h (Yeh *et al.* 2004; Chaston *et al.* 2008; Mena *et al.* 2008; Ge *et al.* 2009; Du *et al.* 2012). Hepcidin synthesis is stimulated by increased plasma iron levels and by inflammatory cytokines under conditions of infection by pathogens (Lee *et al.* 2005; Wrighting and Andrews 2006; Gnana-Prakasam *et al.* 2008; Frazier *et al.* 2011).

Recent studies show that hepcidin is also expressed in the central nervous system (CNS) (Zechel *et al.* 2006; Wang *et al.* 2010) and that its expression increases in response to systemic administration of LPS (Wang *et al.* 2008). Hepcidin may provide a link between inflammation and iron accumulation in the CNS. Early studies showed increased activation of NF- κ B and secretion of proinflammatory cytokines in microglia cultured with excess iron (Saleppico *et al.* 1996), and that toxic concentrations of IFN- γ and TNF- α are lower in iron-loaded oligodendrocytes (Zhang *et al.* 2005). These data suggest that iron accumulation enhances the toxic effects of inflammatory cytokines. Which are the sequence of events leading to neurodegeneration, inflammation, or iron accumulation remains an open question (Zivadinov *et al.* 2011). Stereotaxic injections of LPS in the striatum increase microglia activation, ferritin expression,

and total nigral iron content in aged rats (Hunter *et al.* 2008), an indication that inflammation drives iron accumulation. Nevertheless, cellular inflammation is not necessarily dependent on iron deposition as demonstrated by microglia activation without iron accumulation in an animal model of multiple sclerosis (Williams *et al.* 2011). Recently, it was shown that TNF- α and TGF- β 1 induce opposite changes in the expression of DMT1, FPN1, and ceruloplasmin in astrocytes and microglia. TNF- α treatment results in increased iron retention by both astrocytes and microglia; in contrast, the anti-inflammatory, anti-apoptotic cytokine TGF- β 1 causes iron retention in microglia but promotes iron efflux from astrocytes (Rathore *et al.* 2012).

In this report, we tested the hypothesis that inflammation drives iron accumulation in CNS cells by modifying the expression of iron transporters. Considering that hepcidin could be a link between inflammation and iron accumulation in the CNS, we also determined the cellular sources of hepcidin and its cellular targets in response to inflammatory stimuli. Our results strongly suggest that inflammation induces iron accumulation in neurons and microglia, promoted by changes in DMT1 and FPN1 expression and partly mediated by hepcidin.

Methods

Cells

Primary cultures of embryonic rat hippocampal neurons were obtained as described (Kaech and Banker 2006). The cells were seeded onto poly-L-lysine-coated six-well plates, and the plating medium was changed after 2 h to supplemented neurobasal B-27 medium. Three days after plating, 4 μ M 1- β -D-arabinofuranosylcytosine was added to prevent glial proliferation. Rat cortical glial cells were obtained as described (Viviani 2006) with modifications. Briefly, cerebral cortex from 1- to 2-day-old Sprague–Dawley either male or female rat pups were dissected in CMF-HBSS and digested using 0.25% trypsin supplemented with 0.5 mg/mL DNase I. The mixed astrocytes/microglia culture was incubated in minimum essential medium (MEM)-F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS). After 13 days in culture cells were vigorously stirred on an orbital shaker for 16 h at 260 rpm to detach microglial cells. The microglial cells were plated in MEM-F12 10% FBS. After 20 min of incubation at 37°C non-adherent cells (mostly astrocytes) were removed with a change in medium. The remnant cells in the flask were shaken again for 72 h to remove remaining microglia. After shaking, astrocytes were trypsinized, replated into 35-mm plates, and grown until confluence prior to the treatments.

Rats were obtained from the animal facilities of Pontificia Universidad Católica de Chile. The protocol for the handling of animals was approved by the Ethics Committee for the Handling of Live Species and Biosafety of Faculty of Sciences, Universidad de Chile.

Cytokines treatment

Neurons at DIV 7 cultured in fresh neurobasal B27 medium were treated for 18 h with 50 ng/mL TNF- α (R&D Systems, Minneapo-

lis, MN, USA), 50 ng/mL IL-6 (R&D Systems), 1 µg/mL LPS from *Escherichia coli* 026:B6 1 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), or 40 µM Fe-NTA (1 : 2.2, mol/mol). Cortical astrocytes or microglial cells cultured in high glucose MEM medium supplemented with 1% FBS and 7 µM iron were similarly treated for 18 h with 50 ng/mL TNF- α , 50 ng/mL IL-6, or 1 µg/mL LPS.

Hepcidin treatment

Hepcidin treatments were done at DIV 7. Cells were incubated for 6 h with 350 nM human hepcidin (Peptide International; Louisville, KY, USA) prior to western blot analysis. Preliminary experiments indicated that treatment of hippocampal neurons for 6 h with 350 nM hepcidin resulted in a 50% decrease in FPN1 levels (Figure S1a).

RT-PCR

Semi-quantitative PCRs for DMT1, FPN1, or hepcidin were performed as described (Mena *et al.* 2008). The primers used are described in Table S1. The primers used for DMT1 recognize an internal segment of its mRNA common to all DMT1 isoforms, which in the case of brain cells correspond to isoforms 1B+IRE and 1B-IRE (Hubert and Hentze 2002).

Antibodies

The antibodies used in this study were as follows: rabbit polyclonal anti-panDMT1 (Aguirre *et al.* 2012); rabbit polyclonal anti-FPN1 (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA); rabbit polyclonal anti-hepcidin (Alpha Diagnostics); mouse monoclonal anti-tubulin and mouse monoclonal anti-GFAP (Sigma-Aldrich); mouse monoclonal anti-cluster of differentiation molecule 11B (CD11b) and mouse anti-Tuj1 (Promega, Madison, WI, USA).

Western blot analysis

Extracts were prepared by lysing cells with lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, and protease inhibitor cocktail) for 15 min on ice and centrifugation for 15 min at 12 000 g. Protein concentrations were determined using bicinchoninic acid protein assay (Thermo Scientific-Pierce, Rockford, IL, USA). For western blot analysis, 20 µg of proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1 h at 25°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline/Tween-20 buffer (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.1% Tween-20). Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-DMT1 (1 : 1000), rabbit anti-FPN1 (1 : 1000), or mouse anti-tubulin (1 : 10 000), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody for 2 h at 25°C. The immunoreactive bands were developed with a peroxidase-based SuperSignal chemiluminescence assay kit (Thermo Scientific-Pierce) and quantified with the Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Immunofluorescence

Cells grown in cover slips were fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose in phosphate-buffered saline, permeabilized with 0.2% Triton-X-100 in phosphate-buffered saline, incubated overnight at

4°C with anti-FPN1 (1 : 100), anti-DMT1 (1 : 500), anti-GFAP (astrocyte marker, 1 : 100), anti-CD11b (microglia marker, 1 : 100), anti-Tuj1 (neuron marker, 1 : 1000) or anti-hepcidin (1 : 100) followed by incubation with Alexa-546-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit IgG and TOPRO for nuclei identification. The labeled cells were observed with a Zeiss LSM 510 Meta confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Germany).

Total iron measurement

Total iron content was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) as described (Aguirre *et al.* 2005). Briefly, cell extracts were mixed with 0.5 mL of sub-boiling ultrapure nitric acid and incubated at 25°C for 48 h. Total cellular iron analysis was determined by total reflection X-ray fluorescence using a Seifert EXTRA-II Rich spectrometer (Seifert & Co; Ahrensburg, Germany).

Statistical analysis

Differences between means were analyzed by one-way ANOVA. Dunnett's *post-hoc* test was used for comparison using InStat, GraphPad Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) *p*-values < 0.05 were considered significant.

Results

To ascertain if inflammatory treatments resulted in iron accumulation, we evaluated total iron content in neurons, astrocytes, and microglia treated with the pro-inflammatory cytokines TNF- α or IL-6, or with LPS, a Toll-like receptor 4 agonist. After 18 h treatment, total iron content increased significantly (*p* < 0.01) in neurons and microglia, whereas iron content in astrocytes remained unchanged (Fig. 1a). After treatments, iron content in microglia reached values close to 400 ng of Fe per mg of protein; in neurons, iron content increased from 60 to 100–120 ng of Fe per mg of protein and in astrocytes it remained in the range of 45–50 ng of Fe per mg of protein.

We evaluated next if the increase in iron content produced by inflammatory stimuli associated with changes in the levels of iron transporters. Rat hippocampal neurons treated for 18 h with TNF- α , IL-6, or LPS presented a significant 50–67% increase in DMT1 protein content and 45–65% decrease in FPN1 protein levels when compared to control (Fig. 2a). Treatment of astrocytes with TNF- α , IL-6 or LPS also induced a significant increase in DMT1 protein content (Fig. 2b), while treatment with LPS also induced a small but significant decrease in FPN1 protein content when compared to control (Fig. 2b). Treatment of microglia with TNF- α , IL-6, or LPS resulted in increased DMT1 levels without significant changes in FPN1 (Fig. 2c). Figure S2 shows images of DMT1 and FPN1 fluorescence immunostaining in neurons, astrocytes, and microglia. An increase in DMT1 immunostaining in neurons and microglia, and a decrease in FPN1 immunostaining in neurons is evident.

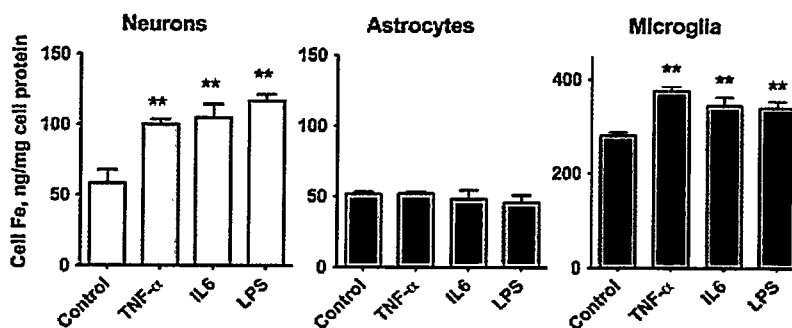


Fig. 1 Changes in iron content induced by inflammatory stimuli. Hippocampal neurons, cortical astrocytes, and cortical microglia were treated for 18 h with tumor necrosis factor alpha (TNF-α) (50 ng/mL),

IL-6 (50 ng/mL), or lipopolysaccharide (LPS) (1 μg/mL) after which the iron content was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3). **p < 0.01 as compared to the corresponding control.

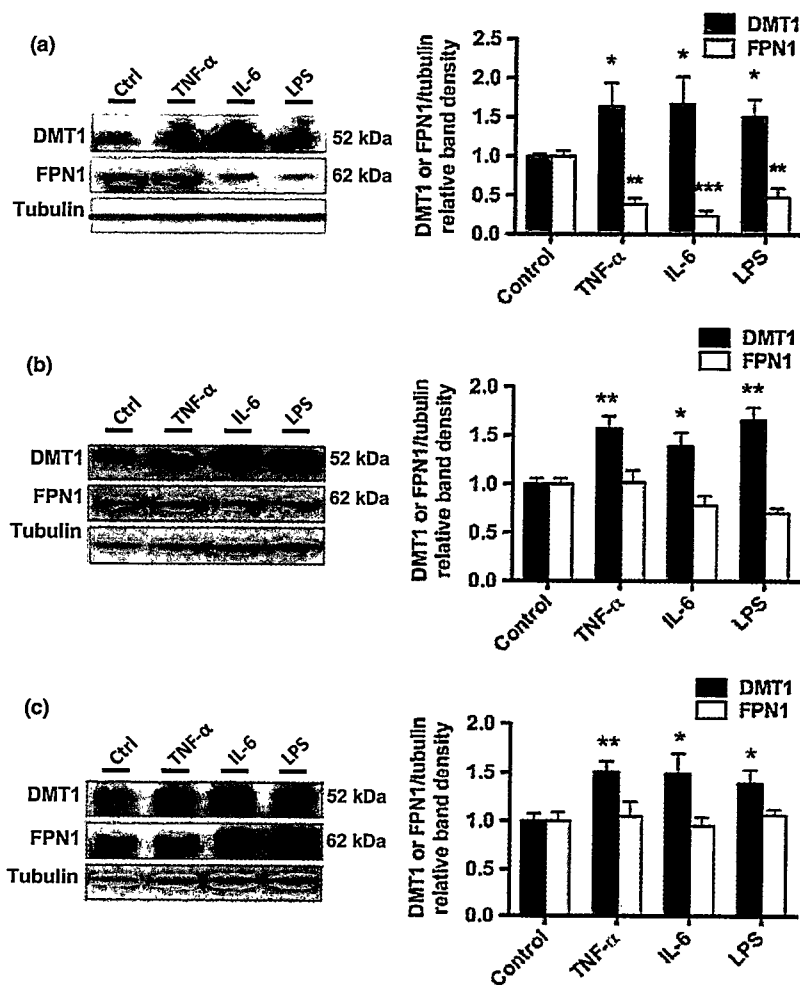


Fig. 2 Tumor necrosis factor alpha (TNF-α), IL-6, and lipopolysaccharide (LPS) induce changes in the protein levels of the iron transporters divalent metal transporter 1 (DMT1) and ferroportin 1 (FPN1) in CNS-derived cells. Hippocampal neurons (a), cortical astrocytes (b), and cortical microglia (c) were treated for 18 h with TNF-α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), or LPS (1 μg/mL) and changes in DMT1 and FPN1 expression were analyzed by western blot. Left panels show representative blots and right panels show the quantification of band density. Values represent mean ± SEM (n = 6). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, compared to control.

To ascertain if changes in protein levels were associated with changes in mRNA levels, RT-PCR was performed using specific primers for DMT1 and FPN1 in neurons, astrocytes, and microglia upon treatment for 18 h with TNF-α, IL-6, or LPS (Fig. 3). In neurons, all three agents increased DMT1 mRNA levels without change in FPN1

expression (Fig. 3a). Astrocytes presented significant increases in DMT1 mRNA, while FPN1 mRNA decreased significantly only with LPS (Fig. 3b). TNF-α increased significantly DMT1 mRNA in microglia while significant decrease in FPN1 mRNA was observed following TNF-α and LPS treatment (Fig. 3c).

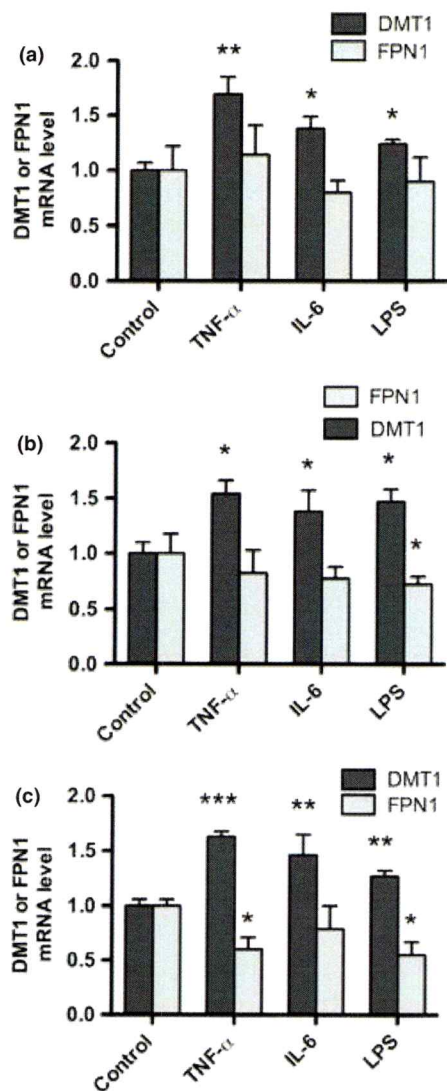


Fig. 3 Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6, and lipopolysaccharide (LPS) induce changes in the mRNA levels of the iron transporters divalent metal transporter 1 (DMT1) and ferroportin 1 (FPN1) in CNS-derived cells. Hippocampal neurons (a), cortical astrocytes (b), and cortical microglia (c) were treated with TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), or LPS (1 μ g/mL) for 18 h. Changes in DMT1 and FPN1 mRNA levels were analyzed by RT-PCR. Panels show quantification of band density relative to control. Values represent mean \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ as compared to control.

As stated above, hepcidin is a possible link between inflammatory stimuli and iron homeostasis. Thus, it was of interest to assess the effect of inflammatory stimuli on the putative expression of hepcidin by neurons, astrocytes and microglia. In addition, we tested if iron accumulation *per se* could induce hepcidin expression (Fig. 4). Astrocytes (Fig. 4a) and microglia (Fig. 4b) subjected for 2 h to high

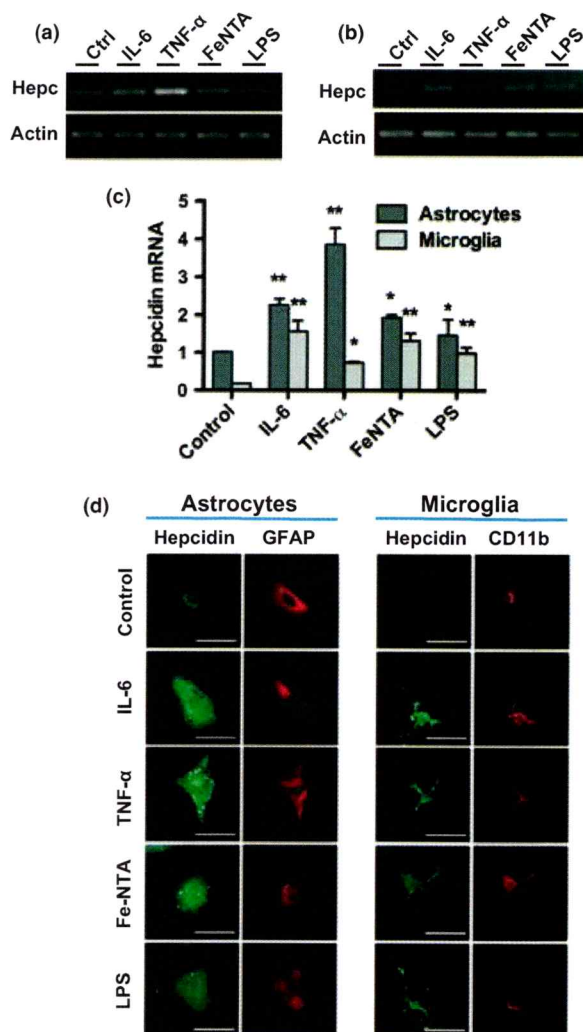


Fig. 4 Inflammatory stimuli induce the expression of hepcidin in astrocytes and microglia. Expression of mRNA for hepcidin in astrocytes (a) and microglia (b) after treatment for 2 h with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), Fe-NTA (40 μ M), or lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/mL). (c) Quantification of band density of hepcidin mRNA levels relative to untreated astrocytes. Values represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as compared to control. (d) Hepcidin immunofluorescence (green) in astrocytes and microglia prior (Control) and after treatment for 2 h with TNF- α (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), Fe-NTA (40 μ M), or LPS (1 μ g/mL). GFAP and CD11b co-staining (red) was used for positive identification of astrocytes and microglia, respectively.

iron or inflammatory stimuli presented increased levels of hepcidin mRNA. Both basal and stimulated hepcidin mRNA levels were higher in astrocytes than microglia; in all conditions tested, the increase in hepcidin mRNA levels was significant (Fig. 4c). Hepcidin mRNA in neurons was undetectable under basal conditions and expression was not induced by TNF- α , IL-6, LPS, or Fe treatment (not shown).

Treatment of astrocytes and microglia with TNF- α , IL-6, LPS, or Fe also increased hepcidin protein content, as revealed by immunodetection of hepcidin in cell cultures (Fig. 4d). In agreement with the absence of hepcidin mRNA, neuronal cultures did not show detectable hepcidin immunostaining (not shown).

We next evaluated the effect of hepcidin on the levels of DMT1 and FPN1 in neurons, astrocytes and microglia. A 6 h period of treatment was chosen because in preliminary experiments we determined that the effect of hepcidin on FPN1 protein levels was maximal at 6 h of treatment decreasing thereafter (Figure S1b). Consistent with its known action in systemic cells, treatment with hepcidin decreased FPN1 protein levels in neurons (Fig. 5a), astrocytes (Fig. 5b), and microglia (Fig. 5c). In addition, hepcidin treatment resulted in a significant increase in DMT1 only in microglia (Fig. 5c). Figure S3 shows immunofluorescence images of the variation in the cellular content of DMT1 and FPN1 in neurons, astrocytes, and microglia after hepcidin treatment. A

decrease in FPN1 immunolabeling in neurons and astrocytes is noticeable, together with increased DMT1 levels in microglia.

Discussion

Inflammation and iron accumulation are amply recognized as pathognomonic signs of several neurodegenerative diseases that include AD and PD. However, knowledge on how inflammation and iron accumulation cross-talk is, at its best, incipient. The results presented here show that the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the Toll-like receptor 4 agonist LPS exercise profound effects on iron homeostasis, inducing DMT1 expression and iron accumulation in neurons and microglia. Moreover, we ascertained that astrocytes and microglia increase hepcidin expression in response to inflammatory stimuli. We also observed that 6 h treatment with hepcidin decreased the levels of FPN1 in neurons, astrocytes and microglia. Figure 6 presents a scheme summarizing the finding reported here.

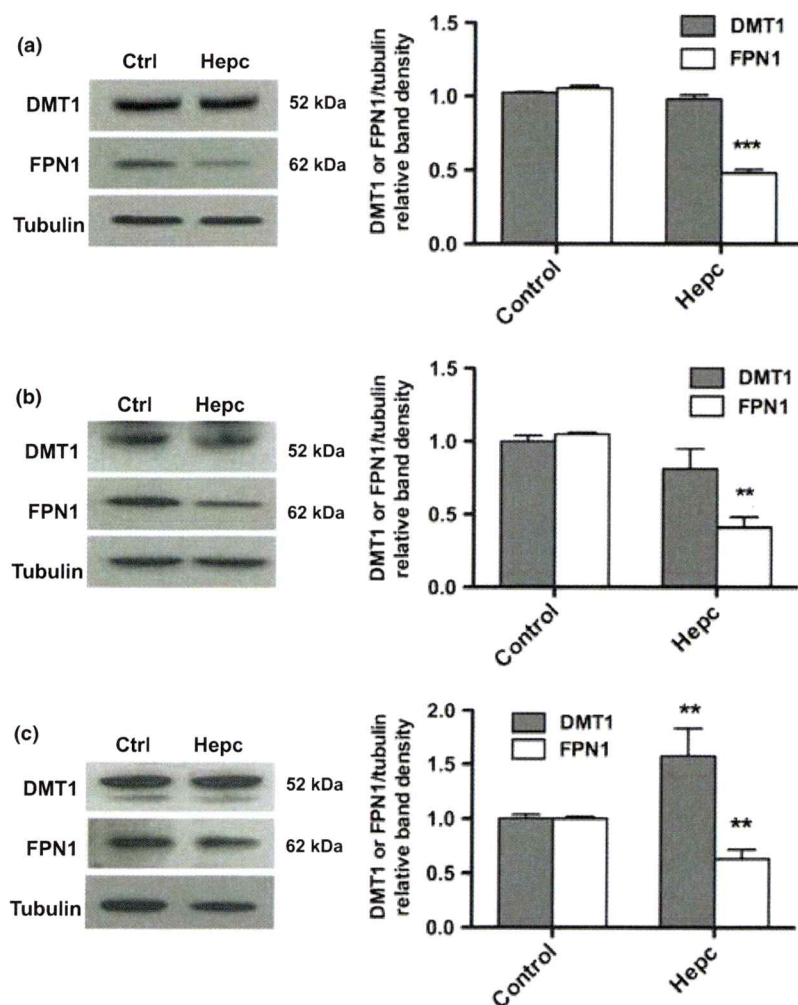


Fig. 5 Hepcidin induces changes in ferroportin 1 (FPN1) in CNS cells. Hippocampal neurons (a), cortical astrocytes (b), and cortical microglia (c) were treated with 350 nM hepcidin for 6 h after which divalent metal transporter 1 (DMT1) and FPN1 expression were analyzed by western blot. Left panels show representative blots and right panels show the quantification of band density. Values represent mean \pm SEM ($n = 6$). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to control.

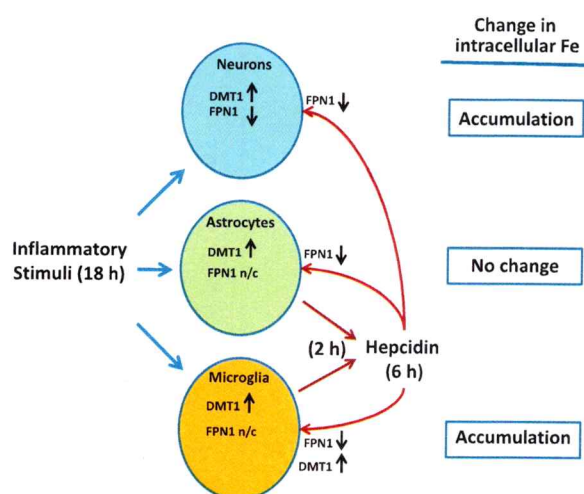


Fig. 6 Schematic representation depicting the changes in iron homeostasis of CNS cells subjected to inflammatory stimuli. Inflammatory stimuli (TNF- α , IL-6, LPS) for 18 h result in increased expression of divalent metal transporter 1 (DMT1) in neurons, astrocytes, and microglia, together with decreased expression of ferroportin 1 (FPN1) in neurons. Hepcidin, secreted by astrocytes and microglia in response to inflammatory stimuli, induces after 6 h a transient decrease in FPN1 in the 3 cell types and an increase in DMT1 in microglia. The net result of inflammatory stimuli and hepcidin mediation is iron accumulation in neurons and microglia but not in astrocytes.

Neurons

In neurons, TNF- α , IL-6, and LPS treatment increased DMT1 and decreased FPN1 protein levels. Probably, the increase in DMT1 was a consequence of the activation of signaling pathways that induced DMT1 mRNA expression. NF- κ B, a transcription factor activated by both TNF- α and LPS signaling pathways (Hanke and Kielian 2011; Wajant and Scheurich 2011), is a likely effector since NF- κ B induces DMT1 expression in P19 embryonic carcinoma cells (Paradkar and Roth 2006). The cause for the observed decrease in neuronal FPN1 is unknown, but it could be because of a post-transcriptional control of FPN1 expression by inflammatory stimuli as described for splenic macrophages (Liu *et al.* 2005).

As described for macrophages and other cell types (Ganz and Nemeth 2012), hepcidin induced a canonical down-regulation of FPN1 protein in neurons. The decrease in FPN1 produced by hepcidin and the increase in DMT1 as a result of inflammatory stimuli were most probably instrumental to the observed iron accumulation. Indeed, cellular iron content doubled after 18 h treatment with TNF- α , IL-6, or LPS, a condition that should result in an increased labile iron pool, with the consequent increase in oxidative stress and damage (Kruszewski 2003; Núñez *et al.* 2012).

Astrocytes

In astrocytes, treatment with TNF- α , IL-6, or LPS resulted in increased levels of DMT1, while decreased levels of FPN1 were significant only after LPS treatment. As discussed elsewhere in the article, the increase in DMT1 was probably a direct consequence of the activation of DMT1 transcription by TNF- α and LPS signaling pathways. These results are in general agreement with a recent study, which reported that in astrocytes TNF- α induced an increase in DMT1 expression coupled to decreased FPN1 expression (Rathore *et al.* 2012). Nevertheless, the authors reported that iron efflux from astrocytes, albeit larger than from microglia, did not change after TNF- α treatment, which would indicate that transport-active FPN1 levels did not change.

Treatment for 2 h with inflammatory agents and with 40 μ M Fe-NTA resulted in increased levels of hepcidin mRNA in both astrocytes and microglia. Although the effect of inflammatory stimuli on hepcidin expression is widely acknowledged, the iron effect reported here is novel. In a previous work, we determined that the exposure of hippocampus neurons for 0 to 20 min to 100 μ M Fe-NTA produce a fast increase in the labile iron pool and in reactive oxygen species (ROS) (Muñoz *et al.* 2011). Since ROS induce hepcidin synthesis (Millonig *et al.* 2012), it is possible that ROS generated by an increase in the labile iron pool may mediate the observed increase in hepcidin mRNA levels.

Hepcidin treatment resulted in decreased levels of FPN1 in astrocytes. This change was not maintained in time since after 18 h of treatment with inflammatory factors, which induce hepcidin expression in astrocytes, FPN1 approached control values (compare Figs 2b and 5b). The transient nature of the hepcidin effect on FPN1 levels has been described in other cell systems (Yeh *et al.* 2004; Chaston *et al.* 2008; Mena *et al.* 2008; Ge *et al.* 2009; Du *et al.* 2012). We found that treatment for 18 h with TNF- α , IL-6, or LPS resulted in no significant changes in cellular iron content. The conservation of the iron export capacity is probably the main reason why no iron accumulation was observed as a result of inflammatory stimuli. This conclusion is in line with the observation that iron efflux from astrocytes, *per se* larger than from microglia, did not change after TNF- α treatment despite a decrease in FPN1 levels (Rathore *et al.* 2012).

Microglia

After 18 h of treatment with inflammatory stimuli, microglia presented increased levels of DMT1 protein and mRNA accompanied by a 30% increase in iron content as compared to control. As discussed above, the increase in DMT1 mRNA was probably consequence of NF κ B activation by the inflammatory stimuli.

As with neurons and astrocytes, hepcidin treatment resulted in decreased FPN1 levels, probably a consequence

of hepcidin-induced FPN1 degradation. Unexpectedly, hepcidin treatment resulted in a significant increase in DMT1 protein. One precedent in the literature for this result is the report that stereotaxic injection of hepcidin into the left lateral ventricle in rats resulted in increased DMT1 mRNA in cerebral cortex and hippocampus (Li *et al.* 2011). It can be envisioned that after 2 h of treatment, inflammatory stimuli induce hepcidin expression, which in turn at 6 h induces changes in iron transporters leading to iron accumulation. At 18 h of treatment, homeostatic mechanisms would bring FPN1 near to control levels but iron accumulation persists because of increased DMT1 levels. Microglia were the cell type with the largest content of iron. By sequestering extracellular iron in response to hepcidin, microglia may have an important protective role on neuronal viability.

The findings reported here provide a partial response to the question of what comes first, neuroinflammation or iron accumulation: in neurons and microglia, inflammatory stimuli induce iron accumulation. The induction of hepcidin expression by iron could produce a positive feedback loop of increased iron accumulation.

In summary, inflammatory stimuli induced iron accumulation in neurons and microglia, accumulation that was probably associated with changes in the levels of iron transporters. Inflammatory stimuli also induced the expression of hepcidin in astrocytes and microglia, being astrocytes the largest producers. In turn, hepcidin decreased the expression of FPN1 in neurons, astrocytes, and microglia. The data presented here establish for the first time a causal relationship between inflammation and iron accumulation in neurons and microglia. Considering that iron accumulation results in hydroxyl radical production and extensive cellular damage, this process may potentially contribute to the progression of neuronal death by enhancing iron-mediated oxidative damage.

Acknowledgements

This study was financed by grant 1100599 from Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Chile, Research Ring grant ACT 1114 and by CONICYT doctoral fellowship 21100165 to P.U. The authors have no conflicts of interest to declare.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1. Time- and concentration-dependency of hepcidin-mediated FPN1 decrease in CNS cells.

Figure S2. Expression of DMT1 and FPN1 in CNS-derived cells treated with TNF- α , IL-6, and LPS visualized by immunocytochemistry.

Figure S3. DMT1 and FPN1 immunodetection in cells treated with hepcidin.

Table S1. List of PCR primers used in this study.

References

- Aguirre P., Mena N., Tapia V., Arredondo M. and Núñez M. T. (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci.* **6**, 3.
- Aguirre P., Urrutia P., Tapia V., Villa M., Paris I., Segura-Aguilar J. and Núñez M. T. (2012) The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. *Biometals* **25**, 795–803.
- Anderson G. J. and Vulpe C. D. (2009) Mammalian iron transport. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3241–3261.
- von Bernhardi R. and Eugenin J. (2012) Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 974–1031.
- Brasse-Lagnel C., Karim Z., Letteron P., Bekri S., Bado A. and Beaumont C. (2011) Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* **140**, e1261.
- Cahill C. M., Lahiri D. K., Huang X. and Rogers J. T. (2009) Amyloid precursor protein and alpha synuclein translation, implications for iron and inflammation in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 615–628.
- Chaston T., Chung B., Mascarenhas M., Marks J., Patel B., Srai S. K. and Sharp P. (2008) Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* **57**, 374–382.
- Du F., Qian Z. M., Gong Q., Zhu Z. J., Lu L. and Ke Y. (2012) The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 1694–1700.
- Frazier M. D., Mamo L. B., Ghio A. J. and Turi J. L. (2011) Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon-gamma. *Respir. Res.* **12**, 100.
- Ganz T. and Nemeth E. (2012) Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1434–1443.
- Ge X. H., Wang Q., Qian Z. M., Zhu L., Du F., Yung W. H., Yang L. and Ke Y. (2009) The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 860–865.
- Gnana-Prakasam J. P., Martin P. M., Mysona B. A., Roon P., Smith S. B. and Ganapathy V. (2008) Hepcidin expression in mouse retina and its regulation via lipopolysaccharide/Toll-like receptor-4 pathway independent of Hfe. *Biochem. J.* **411**, 79–88.
- Hanke M. L. and Kielian T. (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci. (Lond.)* **121**, 367–387.
- Hubert N. and Hentze M. W. (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 12345–12350.
- Hunot S. and Hirsch E. C. (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**(Suppl 3), S49–S58; discussion S58–60.
- Hunter R. L., Liu M., Choi D. Y., Cass W. A. and Bing G. (2008) Inflammation and age-related iron accumulation in F344 rats. *Curr. Aging Sci.* **1**, 112–121.
- Jomova K. and Valko M. (2011) Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3460–3473.
- Kaech S. and Banker G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415.
- Kaushal V. and Schlichter L. C. (2008) Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J. Neurosci.* **28**, 2221–2230.

- Kruszewski M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* **531**, 81–92.
- Lee P., Peng H., Gelbart T., Wang L. and Beutler E. (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 1906–1910.
- Lee Y. J., Han S. B., Nam S. Y., Oh K. W. and Hong J. T. (2010) Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 1539–1556.
- Li L., Holscher C., Chen B. B., Zhang Z. F. and Liu Y. Z. (2011) Hepcidin treatment modulates the expression of divalent metal transporter-1, ceruloplasmin, and ferroportin-1 in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Biol. Trace Elem. Res.* **143**, 1581–1593.
- Liu X. B., Nguyen N. B., Marquess K. D., Yang F. and Haile D. J. (2005) Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 47–56.
- Mena N. P., Esparza A., Tapia V., Valdes P. and Núñez M. T. (2008) Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G192–G198.
- Millonig G., Ganzleben I., Peccerella T. et al. (2012) Sustained submicromolar H₂O₂ levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J. Biol. Chem.* **287**, 37472–37482.
- Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P., Inagaki H., Minami M. and Nagatsu T. (1994a) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **180**, 147–150.
- Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K. and Nagatsu T. (1994b) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **165**, 208–210.
- Mogi M., Harada M., Narabayashi H., Inagaki H., Minami M. and Nagatsu T. (1996) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **211**, 13–16.
- Muñoz P., Humeres A., Elgueta C., Kirkwood A., Hidalgo C. and Núñez M. T. (2011) Iron mediates N-methyl-D-aspartate receptor-dependent stimulation of calcium-induced pathways and hippocampal synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* **286**, 13382–13392.
- Nemeth E., Tuttle M. S., Powelson J., Vaughn M. B., Donovan A., Ward D. M., Ganz T. and Kaplan J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093.
- Núñez M. T., Urrutia P., Mena N., Aguirre P., Tapia V. and Salazar J. (2012) Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* **25**, 761–776.
- Ong W. Y. and Farooqui A. A. (2005) Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **8**, 183–200; discussion 209–115.
- Paradkar P. N. and Roth J. A. (2006) Post-translational and transcriptional regulation of DMT1 during P19 embryonic carcinoma cell differentiation by retinoic acid. *Biochem. J.* **394**, 173–183.
- Rathore K. I., Redensek A. and David S. (2012) Iron homeostasis in astrocytes and microglia is differentially regulated by TNF-alpha and TGF-beta1. *Glia* **60**, 738–750.
- Rogers J. and Lue L. F. (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **39**, 333–340.
- Saleppico S., Mazzolla R., Boelaert J. R., Puliti M., Barluzzi R., Bistoni F. and Blasi E. (1996) Iron regulates microglial cell-mediated secretory and effector functions. *Cell. Immunol.* **170**, 251–259.
- Sian-Hulsmann J., Mandel S., Youdim M. B. and Riederer P. (2011) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **118**, 939–957.
- Smith J. A., Das A., Ray S. K. and Banik N. L. (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* **87**, 10–20.
- Viviani B. (2006) Preparation and coculture of neurons and glial cells. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 2, Unit 2.7.
- Wajant H. and Scheurich P. (2011) TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J.* **278**, 862–876.
- Wang Q., Du F., Qian Z. M., Ge X. H., Zhu L., Yung W. H., Yang L. and Ke Y. (2008) Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology* **149**, 3920–3925.
- Wang S. M., Fu L. J., Duan X. L. et al. (2010) Role of hepcidin in murine brain iron metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 123–133.
- Wang X., Garrick M. D., Yang F., Dailey L. A., Piantadosi C. A. and Ghio A. J. (2005) TNF, IFN-gamma, and endotoxin increase expression of DMT1 in bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L24–33.
- Williams R., Rohr A. M., Wang W. T., Choi I. Y., Lee P., Berman N. E., Lynch S. G. and LeVine S. M. (2011) Iron deposition is independent of cellular inflammation in a cerebral model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci.* **12**, 59.
- Wrighting D. M. and Andrews N. C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204–3209.
- Yeh K. Y., Yeh M. and Glass J. (2004) Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G385–G394.
- Zechel S., Huber-Wittmer K. and von Bohlen und Halbach, O. (2006) Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **84**, 790–800.
- Zhang X., Haaf M., Todorich B., Grosstephan E., Schieremberg H., Surguladze N. and Connor J. R. (2005) Cytokine toxicity to oligodendrocyte precursors is mediated by iron. *Glia* **52**, 199–208.
- Zivadnov R., Weinstock-Guttman B. and Pirko I. (2011) Iron deposition and inflammation in multiple sclerosis. Which one comes first? *BMC Neurosci.* **12**, 60.



The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders

Pamela J. Urrutia, Natalia P. Mena and Marco T. Núñez*

Department of Biology and Research Ring on Oxidative Stress in the Nervous System, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Edited by:

Raffaella Gozzelino, Instituto Gulbenkian de Ciência, Portugal

Reviewed by:

Reinhard Gabathuler, Cydwell Consultants, Canada
Jerome A. Roth, University at Buffalo, USA

*Correspondence:

Marco T. Núñez, Department of Biology and Research Ring on Oxidative Stress in the Nervous System, Faculty of Sciences, University of Chile, Las Palmeras 3425, Santiago 7800024, Chile
e-mail: mnunez@uchile.cl

A growing set of observations points to mitochondrial dysfunction, iron accumulation, oxidative damage and chronic inflammation as common pathognomonic signs of a number of neurodegenerative diseases that includes Alzheimer's disease, Huntington disease, amyotrophic lateral sclerosis, Friedrich's ataxia and Parkinson's disease. Particularly relevant for neurodegenerative processes is the relationship between mitochondria and iron. The mitochondrion upholds the synthesis of iron-sulfur clusters and heme, the most abundant iron-containing prosthetic groups in a large variety of proteins, so a fraction of incoming iron must go through this organelle before reaching its final destination. In turn, the mitochondrial respiratory chain is the source of reactive oxygen species (ROS) derived from leaks in the electron transport chain. The co-existence of both iron and ROS in the secluded space of the mitochondrion makes this organelle particularly prone to hydroxyl radical-mediated damage. In addition, a connection between the loss of iron homeostasis and inflammation is starting to emerge; thus, inflammatory cytokines like TNF-alpha and IL-6 induce the synthesis of the divalent metal transporter 1 and promote iron accumulation in neurons and microglia. Here, we review the recent literature on mitochondrial iron homeostasis and the role of inflammation on mitochondria dysfunction and iron accumulation on the neurodegenerative process that lead to cell death in Parkinson's disease. We also put forward the hypothesis that mitochondrial dysfunction, iron accumulation and inflammation are part of a synergistic self-feeding cycle that ends in apoptotic cell death, once the antioxidant cellular defense systems are finally overwhelmed.

Keywords: inflammation, neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, iron toxicity, Parkinson's disease

INTRODUCTION

Iron is an essential element necessary for the normal development of brain functions. Enzymes involved in neurotransmitter synthesis that possess iron as a prosthetic group are recognized targets of iron deficiency: monoamine oxidases A and B involved in dopamine catabolism, tryptophan hydroxylase, required for serotonin synthesis, tyrosine hydroxylase, required for dopamine and norepinephrine synthesis, glutamate decarboxylase involved in GABA synthesis and glutamate transaminase involved in L-glutamate synthesis, all belong to this group.

Abundant evidence shows that iron accumulation in particular areas of the brain is a hallmark of several neurodegenerative disorders (Zecca et al., 2004; Andersen et al., 2013), although it is uncertain whether iron accumulation is a primary cause of the disorder or a consequence of a previous dysfunction. Increased levels of iron promote cell death via hydroxyl radical formation, which enhances lipid peroxidation, protein aggregation, glutathione consumption, and nucleic acid modification. We recently put forward the hypothesis that iron accumulation, a process initiated by mitochondrial dysfunction, and the ensuing oxidative damage is part of the execution step, i.e., the death process of affected neurons (Núñez et al., 2012).

Mitochondrial dysfunction has long been associated with several neurodegenerative diseases that include Alzheimer's disease (AD), Huntington's disease (HD), Parkinson's disease (PD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and Friedrich's Ataxia (FA; Schapira and Cooper, 1992; Moreira et al., 2010; Grubman et al., 2013). Mitochondrial dysfunction results in decreased ATP synthesis, as well as in decreased synthesis of iron-sulfur clusters (ISCs) and heme prosthetic groups. An association between mitochondrial dysfunction and mitochondrial iron accumulation has been found only in FA (Delatycki et al., 1999; Huang et al., 2009), although evidence for mitochondrial iron accumulation has been reported in experimental models of PD (Liang and Patel, 2004; Lee et al., 2009; Mena et al., 2011).

Inflammation in the central nervous system (CNS) is a condition strongly associated with neuronal death in several neurodegenerative disorders including PD and AD (Hirsch and Hunot, 2009). Inflammation is characterized by the occurrence of reactive microglia and a massive production of pro-inflammatory cytokines. These inflammatory processes trigger a chain of events including increased production of ROS and reactive nitrogen species (RNS), disruption of iron metabolism and mitochondrial dysfunction, finally leading to neurodegeneration.

THE BASIS OF IRON TOXICITY

The ability of iron to exchange readily one electron underlies its insertion in numerous catalytic processes found in living matter. The iron atom has octahedral coordination chemistry; therefore, it has six possible coordination bonds. Seminal work by Graf and associates demonstrated that iron is redox-inactive only if all its six coordination sites are stably bound. If one of the sites is free or loosely bound, iron is redox-active and competent of undertaking one-electron exchange reactions (Graf et al., 1984). It is noteworthy that Fe^{3+} complexes with the chelators desferrioxamine, DTPA or phytate at 1:10 (mol:mol) ratio result in redox-inactive iron whereas Fe^{3+} chelation with NTA, EDTA, EGTA, ATP, CDTA or bleomycin results in redox-active iron at the same 1:10 molar ratio (Graf et al., 1984).

Iron is a paramagnetic element with two stable oxidation states: 2+ and 3+. As mentioned above, both Fe^{2+} and Fe^{3+} establish coordination complexes with a great variety of ligands. Iron complexes display a variety of reduction potentials, ranging from very positive to negative values because of a basic concept in coordination chemistry that establishes that the ligand modifies the electron cloud surrounding the metal, thus modifying its reduction potential. This versatility in reduction potential allows for fine-tuning between iron reduction potential and the electron transfer process it catalyzes. It is estimated that the predominant reduction potential for iron in the intracellular milieu of the cell is near zero V (Clark, 1960; Wood, 1988). Many *in vitro* experiments confirm iron-mediated production of the hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), which arises from the following reactions:

1. $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-}$ $E_0: -0.43\text{V}; \quad \Delta G = 41.5\text{KJ/mol}$
2. $\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ $E_0: 0.55\text{V}; \quad \Delta G = -53.0\text{KJ/mol}$
3. $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \bullet\text{OH}$ $E_0: 0.10\text{V};$
 $\Delta G = -9.7\text{KJ/mol}$

The thermodynamic sum of reactions 1–3 gives reaction 4:

4. $3\text{Fe}^{2+} + 2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$
 $\Delta G = -21.2\text{KJ/mol}$

The intracellular environment provides abundant reducing power in the form of GSH (mM) and Asc (μM), which reduces Fe^{3+} to Fe^{2+} :

5. $\text{Fe}^{3+} + \text{GSH}(\text{Asc}) \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{GSSH}(\text{Asc}\bullet) + \text{H}^+$ $E_0: 0.262;$
 $\Delta G = -25.3\text{KJ/mol}$

Changes in free energy were calculated applying the equation $\Delta G = -nFE_0$ (Joule/mol), in which n is the number of electrons exchanged and F the Faraday constant. Reaction 1 values were from (Pierre and Fontecave, 1999); Reaction 2, the half-cell potential for H_2O_2 dismutation was considered 0.45 V (Pierre and Fontecave, 1999) and the reduction potential of the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

half-cell was considered 0 V (Wood, 1988); Reaction 3 (Fenton reaction): E_0 half-cell values from (Buettner, 1993; Buettner and Schafer, 2000). Half-cell potentials for reaction 5 were obtained from (Millis et al., 1993; Pierre and Fontecave, 1999). GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; Asc: ascorbate; Asc \bullet : ascorbate free radical.

The hydroxyl radical is considered one of the most reactive species generated in biological systems, since its reaction rate is only limited by diffusion, with rate constants in the 10^9 – 10^{12} $\text{Mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ range (Davies, 2005). This molecule induces irreversible damage to DNA, RNA, proteins, and lipids. Indeed, the hydroxyl radical is believed to be the etiological agent for several diseases and may be involved in the natural process of aging (Lipinski, 2011).

The main components of cell iron homeostasis are the divalent metal transporter 1 (DMT1), a Fe^{2+} transporter that brings iron into the cell, the transferrin receptor 1 (TfR1) that brings iron in through the endocytosis of Ferro-transferrin, the iron export transporter ferroportin 1 (FPN1) and the cytosolic iron storage protein ferritin. The expression of these proteins is transcriptionally regulated by the iron responsive element/iron regulatory protein (IRE/IRP) system, which is activated when cells have low iron levels, resulting in increased DMT1 and TfR1 levels and decreased FPN1 and ferritin expression (Muckenthaler et al., 2008).

In cells, iron in the 0.2–1.5 μM range is weakly complexed to low-molecular weight substrates such as citrate, carboxylates, amines, phosphate, nucleotides, GSH, and other molecules forming the “cytosolic labile iron pool” (cLIP; Epsztejn et al., 1997; Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002; Hider and Kong, 2011). Iron in this pool is redox-active, cycling between the Fe^{2+} and Fe^{3+} forms, with prevalence of the reduced form because of the reductive cytosol environment. This redox-active pool is suitable to experimental detection by the fluorophore calcein, which has higher affinity for Fe^{3+} than for Fe^{2+} but since the reduction potential for iron in the Fe-calcein complex is low, Fe^{3+} bound to calcein is readily reduced in the intracellular environment, resulting in decreased calcein fluorescence (Petrat et al., 2002). In cultured neuroblastoma cells the LIP represents about 3% of total cellular iron under basal culture conditions, but this percentage increases 3–4 fold, to μM concentrations, after exposure of cells to high extracellular iron concentrations (Núñez-Millacura et al., 2002; Núñez et al., 2004). In cell models, iron overload generates increased lipid peroxidation, protein modifications and damage to DNA, consistent with the production of the hydroxyl radical (Mello-Filho and Meneghini, 1991; Núñez et al., 2001; Sochaski et al., 2002; Zoccarato et al., 2005).

INFLAMMATORY CYTOKINES INDUCE THE PRODUCTION OF RNS, ROS AND IRON ACUMULATION

Postmortem tissues from patients with AD, PD, HD, ALS or FA show oxidative damage in the affected brain regions (Nunomura et al., 1999; Barnham et al., 2004; Emerit et al., 2004). The association between inflammation and oxidative damage is mediated by the release of RNS and ROS during the inflammatory process. In particular, activated microglia have high levels of nitric oxide synthase (NOS) and NADPH oxidase (NOX), two enzyme

systems that mediate the increase in the oxidative tone induced by inflammation.

Microglia, the brain-resident immune cells, are essential for the generation of the inflammatory response. They are activated by distress signals released from neighboring cells, initiating an innate response characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and, incidentally, phagocytosis (McGeer et al., 1988; Colton and Wilcock, 2010). Indeed, many cases of AD and PD are accompanied by a dramatic proliferation of reactive amoeboid macrophages and activated microglia in the substantia nigra (SN) or frontal cortex (McGeer et al., 1988; Possel et al., 2000; Kiyota et al., 2009; Hewett and Hewett, 2012), together with high expression of pro-inflammatory cytokines (Bauer et al., 1991; Mogi et al., 1994; Muller et al., 1998; Nagatsu, 2002; Hewett and Hewett, 2012).

Inducible NOS (iNOS, also called NOS-2), which is scarcely expressed in the brain is induced during gliosis in pathological situations including AD (Aliev et al., 2009) and PD (Dawson and Dawson, 1998). Up-regulation of iNOS and of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in amoeboid microglia occurs in the SN of human PD patients (Knott et al., 2000). A study on the levels of iNOS mRNA in postmortem PD basal ganglia found a significant increase in iNOS expression in the dorsal two-thirds of the striatum and in the medial medullary lamina of the globus pallidus, accompanied by a reduction in iNOS mRNA expression in the putamen (Eve et al., 1998).

Inflammatory mediators, including LPS and some cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ) induce the transcriptional activation of the iNOS gene in astrocytes and microglia via activation of the transcription factors STAT1 and NF- κ B (Grzybicki et al., 1996; Possel et al., 2000; Hewett and Hewett, 2012). These factors translocate to the nucleus and bind to response elements present in the iNOS coding sequence. Upregulation of microglial iNOS expression is also observed after administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP; Liberatore et al., 1999; Tieu et al., 2003; Kokovay and Cunningham, 2005; Yokoyama et al., 2008). Interestingly, administration of MPTP produces significantly less neuronal loss in mice deficient in iNOS compared to their wild type counterparts (Dexter et al., 1986; Liberatore et al., 1999; Dehmer et al., 2000). In the 6-hydroxidopamine (6-OHDA) model, iNOS activity in the striatum induces neurodegeneration in rats. Pretreatment with the iNOS inhibitor L-NAME blocks amphetamine-induced rotations and significantly restores striatal dopamine (DA) levels in 6-OHDA treated rats (Barthwal et al., 2001). In neuroinflammatory models of PD, iNOS also participates in nigral neurodegeneration. Injection of LPS induces iNOS expression in the SN in a time- and dose-dependent manner; iNOS is present mainly in fully activated microglia with the characteristic amoeboid morphology. Furthermore, LPS-induced loss of dopaminergic neurons decreases significantly by administration of an iNOS inhibitor (Arimoto and Bing, 2003; Singh et al., 2005).

The iNOS enzyme is a relevant factor in the neurodegenerative process associated to AD. Early observations reported increased iNOS and nitrotyrosine protein modifications in AD brains, mainly in neurofibrillary tangle-bearing neurons and neuropil threads as well as in astrocytes (Vodovotz et al., 1996; Smith

et al., 1997; Wallace et al., 1997). Studies in transgenic mice over-expressing amyloid beta precursor protein (APP) demonstrated that several pathological changes such as vessel lesions, amyloid deposition and mitochondrial DNA deletions, are associated with the degree of NOS overexpression (Seyidova et al., 2004). Nevertheless, the APPsw/iNOS(-/-) mice, which express human APP mutations on an iNOS knockout background, show increased appearance of tau pathology, neuronal death, neuroinflammation and behavioral deficits compared with the parental APPsw mice (Colton et al., 2008). This evidence indicates that in AD, the production of NO can be protective or damaging, depending on the levels of NO production.

The phagocyte NOX is the main regulated source of ROS generation. The catalytic component of the NOX complex is composed by a family of multiple-pass transmembrane proteins, named NOX1–4. The most studied, NOX2, also known as gp91phox or phagocyte oxidase (PHOX), is highly expressed in innate immune cells including microglia and it is most likely the predominant NOX isoform expressed in astrocytes, while neurons express both NOX2 and NOX4 (Skalnik et al., 1991; Noh and Koh, 2000; Lavigne et al., 2001; Abramov et al., 2004; Pawate et al., 2004). NOX2 forms a complex with p67phox, p47phox, p40phox, and p22phox subunits. Several stimuli induce NOX2 complex priming, including pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) and Toll-like receptor (TLR) agonists like LPS, peroxyxynitrite and proteases. The primed NOX2 complex requires yet additional activation to initiate substantial ROS production. PKC activators, growth factors, complement protein C5a and G protein-coupled receptor agonists generate a fully active NOX complex (Yang et al., 2009, 2013; Sareila et al., 2011).

Activation of NOX also occurs in experimental models of PD and AD. Treatment with MPTP results in increased synthesis of the proinflammatory cytokine IL-1 β and increased membrane translocation of p67phox that is prevented by minocycline, a tetracycline derivative that exerts multiple anti-inflammatory effects (Wu et al., 2002). In addition, aging mice treated with MPTP display an increase in gp91phox and 3-nitrotyrosine (L'Episcopo et al., 2010; Huh et al., 2011). In agreement, gp91phox-/- mice display decreased degeneration of dopaminergic neurons induced by MPTP compared to wild type mice (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2004). The unilateral injection of 6-OHDA into the right striatum of rats induces an increase of NOX1 and NOX2 both in the striatum and the SN. In concordance, dopaminergic neuronal and TNF- α and IFN- γ induction triggered by 6-OHDA are abrogated in the gp91phox-/- or minocycline treated mice (Hernandes et al., 2013). Additionally, striatal injection of 6-OHDA increases NOX1 expression in dopaminergic neurons in rat SN, and also increases 8-oxo-dG content, a marker of DNA oxidative damage. Moreover, NOX1 knockdown reduces 6-OHDA-induced oxidative DNA damage and dopaminergic neuronal degeneration (Choi et al., 2012).

Microglia of AD subjects display activated NOX2, resulting in the formation of ROS that are toxic to neighboring neurons (Shimohama et al., 2000). In conjunction, an increment in NOX1 and NOX3 mRNA levels in the frontal lobe tissue from AD brains was reported, suggesting the participation of other NOX family members in AD neuropathology (de la Monte and

Wands, 2006). Recently, increased NOX-dependent ROS production in the superior/middle temporal gyri at the earliest clinical manifestations of disease, but not in late-stage AD, was reported (Bruce-Keller et al., 2010). Genetic inactivation of NOX2 in 12- to 15-month-old mice overexpressing the APP^{sw} mutation (Tg2576 mice) results in reduced oxidative damage and rescues both the vascular and behavioral alterations observed in Tg2576 mice (Park et al., 2008). Studies done in cell cultures replicated the post-mortem and animal findings on oxidative damage driven by NOX activation. Experiments using co-cultures of neuronal and glial cells found that A β acts preferentially on astrocytes but causes neuronal death (Abramov et al., 2004; Abramov and Duchon, 2005). The A β peptide causes transient increases in cytoplasmic calcium in astrocytes, associated with increased ROS generation, glutathione depletion and mitochondrial depolarization. Neuronal death after A β exposure was reduced both by NOX inhibitors and in the gp91phox knockout mice. These data are consistent with a sequence of events in which A β activates NOX in astrocytes by increasing cytoplasmic calcium, generating an oxidative burst that causes the death of neighboring neurons (Abramov et al., 2004; Abramov and Duchon, 2005; Park et al., 2008).

Inflammatory conditions such as those found in neurodegenerative diseases also affect iron homeostasis through transcriptional modification of iron transporters. In this context, the observation that the transcription factor NF κ B induces DMT1 expression is highly relevant for understanding the relationship between inflammation and iron homeostasis (Paradkar and Roth, 2006). We recently reported that the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and the TLR4 agonist LPS directly regulate DMT1 mRNA and protein levels and induce a transient decrease in FPN1 protein, thus generating an increment of iron content in neurons and microglia (Urrutia et al., 2013). Supporting the results described above, a recent study using primary cultures of ventral mesencephalic neurons demonstrated that TNF- α or IL-1 β induce an increment in DMT1 and TfR1 protein levels, together with a reduction of FPN1 levels, resulting in an increase in ferrous iron influx and decreased iron efflux in neurons (Wang et al., 2013). These findings were replicated in systemic tissues. Treatment of mouse splenocyte with LPS down-regulates the expression of FPN1 through a signaling mechanism mediated by TLR4 (Yang et al., 2002). Moreover, stimulation of macrophage cell lines with IFN- γ , TNF- α or LPS results in increased IRE-binding activity of IRP1 and IRP2, and increased DMT1 mRNA expression (Mulero and Brock, 1999; Wardrop and Richardson, 2000; Ludwiczek et al., 2003; Wang et al., 2005).

Considering that NF κ B activation takes place downstream of TNF- α , IL-1 and LPS signaling pathways (Teeuwssen et al., 1991; Rothwell and Luheshi, 2000; Hanke and Kielian, 2011), inflammatory stimuli may induce DMT1 expression via NF κ B activation. Indeed, TNF- α was detected in glial cells in the SN of PD patients but not in control subjects, together with immunoreactivity for TNF- α receptors in dopaminergic neurons of both control and PD patients (Boka et al., 1994). These findings are suggestive of a circuit in which activation of nigral microglia results in TNF- α secretion, which might increase iron uptake by dopaminergic neuron via NF- κ B-induced DMT1 expression.

Indeed, an increase in the nuclear immunoreactivity of NF κ B has been observed in PD brains or in animal models for this disease (Hunot et al., 1997), so it is possible that activation of NF- κ B via inflammatory stimuli contributes to iron accumulation in PD. Accordingly, inflammation could induce the production of hydroxyl radical through the activation of two parallel pathways: (i) through DMT1-mediated increase of intracellular iron levels and (ii) through increased hydrogen peroxide levels mediated by NOX activation.

A positive feedback loop can be established between ROS/RNS and inflammatory cytokines. ROS induce intracellular signaling pathways that result in the activation of transcriptional factors like NF- κ B, AP-1 and Nrf-2, which regulate the expression of pro-inflammatory mediators such as Cox-2, MCP-1, IL-6, TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β (Hensley et al., 2000; Thannickal and Fanburg, 2000; Ueda et al., 2002; Ridder and Schwaninger, 2009; Kitazawa et al., 2011; Guo et al., 2012; Kawamoto et al., 2012; Phani et al., 2012; Song et al., 2012; Zhang et al., 2012; Tobon-Velasco et al., 2013). These cytokines and chemokines, in turn, stimulate a cascade of events leading to increased oxidative stress via iNOS and NOX activation.

INFLAMMATORY CONDITIONS INDUCE MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

The study of the relationship between inflammation and mitochondrial activity in the CNS is incipient. Intrastratial injection of LPS induces mitochondrial dysfunction, microgliosis, iron accumulation and progressive degeneration of the dopamine nigro-striatal system (Zhang et al., 2005; Hunter et al., 2007, 2008; Choi et al., 2009), as observed in PD pathology. Similarly, cytokines such as IL-1 β decrease mitochondrial activity through the production of NO in cardiomyocytes (Tatsumi et al., 2000).

Several reports indicate that TLRs regulate mitochondrial activity. Activation of TLR3 results in reduction of mitochondrial oxygen consumption mediated by opening of the permeability transition pore (Djafarzadeh et al., 2011). In co-cultures of cortical neurons with microglial cells, the TLR4 agonist LPS promotes decreased oxygen consumption and oxidative stress, with the subsequent nigral dopaminergic neuronal death in a rat model of inflammation (Xie et al., 2004; Hunter et al., 2007). Although these studies strongly suggest a link between TLRs and mitochondria dysfunction, further studies should clarify the molecular mechanisms involved and its relevance to particular neurodegenerative processes.

The production of ROS and RNS affects mitochondrial activity through destabilization of the ISCs (Cassina and Radi, 1996; Brown and Borutaite, 2004). The free radical superoxide damages and/or oxidizes 4Fe-4S clusters, which results in the formation of the "null" 3Fe-4S center form (Flint et al., 1993; Hausladen and Fridovich, 1994; Gardner et al., 1995; Bouton et al., 1996). Additionally, NO reacts with 4Fe-4S clusters generating [(NO)₂Fe(SR)₂] type complexes that inactivate several mitochondrial iron-sulfur enzymes including proteins which compose the electron transport chain (Drapier, 1997; see below). The above data are consistent with the notion that inflammation, ROS/RNS production, and mitochondrial dysfunction are linked processes.

Additionally, recent evidence shows that under certain conditions mitochondria can modulate the immune response. The mitochondrial protein MARCH5 (an ubiquitin E3 ligase constitutively expressed in the mitochondrion outer membrane) positively regulates TLR7 and TLR4 signaling, resulting in NF κ B activation and expression of the NF κ B-responsive genes IL-6 and TNF- α (Shi et al., 2011). In addition, activation of TLR1, TLR2 and TLR4 results in augmented mitochondrial ROS production by inducing translocation to mitochondria of TRAF6 (TLR signaling adaptor, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), which leads to the engagement and ubiquitination of ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways), a protein required for efficient assembly of mitochondrial complex I (West et al., 2011). It remains to be demonstrated whether this mechanism is operative in CNS cells.

Interestingly, mitochondrial ROS (mtROS) could arguably activate the inflammatory response. In vascular endothelium, mtROS act as intermediate signaling molecules to trigger production of IL-6 (Lee et al., 2010). In addition, patients with the autoinflammatory disorder TRAPS (tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome), exhibit altered mitochondrial function with enhanced mtROS generation and increased production of IL-6, TNF α , and IL-1 β ; decreasing mtROS levels by the general antioxidant *N*-acetylcysteine effectively reduces inflammatory cytokine production after LPS stimulation (Bulua et al., 2011). These results point to novel pathways that link inflammation to mtROS production.

In summary, inflammation induces ROS production and mitochondrial dysfunction generating a self-feeding cycle that could lead to neurodegeneration in diseases where inflammation and oxidative damage are prevalent (Figure 1). In this cycle, [1] inflammation induces ROS and RNS generation by activation of the NOX and iNOS enzymes (Possel et al., 2000; Sareila et al., 2011; Hewett and Hewett, 2012); [2] in turn, ROS/RNS induce the

expression of inflammatory cytokines (Baeuerle and Henkel, 1994; Sen and Packer, 1996). [3] Additionally, inflammation induces mitochondrial dysfunction through activation of TLR signaling (Xie et al., 2004; Djafarzadeh et al., 2011). [4] ROS in turn induce mitochondrial dysfunction by destabilizing ISCs, which results in the inactivation of several mitochondrial iron-sulfur enzymes (Cassina and Radi, 1996; Brown and Borutaite, 2004). [5] Mitochondrial dysfunction leads to IRP1 activation and increased iron uptake (Lee et al., 2009; Mena et al., 2011). [6] Iron increases oxidative damage by transforming mild oxidative molecules like superoxide and hydrogen peroxide into the hydroxyl radical (Graf et al., 1984). [7] Electron transport chain inhibition increases ROS production by electron leak (Drose and Brandt, 2012), and arguably could modulate the innate immune response by TLR signaling regulation (Shi et al., 2011) [8]. Finally, [9] inflammation is likely to cause iron accumulation through induction of DMT1 expression and transient ferroportin decrease (Urrutia et al., 2013; Wang et al., 2013).

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION, INFLAMMATION AND IRON ACCUMULATION IN THE DEATH OF NEURONS IN PD

Mitochondria have a key role in iron metabolism in association with the synthesis of ISCs and heme, prosthetic groups that are vital for cell function. Iron complexes are particularly relevant components of the electron transport chain: 12 proteins contain ISCs and eight proteins contain heme in their active centers (Rouault and Tong, 2005). Other proteins that have ISCs are the Krebs cycle enzymes aconitase and succinate dehydrogenase, ribonucleotide reductase, an enzyme that catalyzes the formation of deoxyribonucleotides from ribonucleotides, and ferrochelatase, involved in the addition of Fe to porphyrin IX during heme synthesis. We refer the reader to

Mitochondria have a redox-active iron pool (Petrat et al., 2001); an increase in this pool directly associates with an increase in oxidative damage and with calcium-dependent changes in the mitochondrial permeability transition pore (Pelizzoni et al., 2011; Kumfu et al., 2012; Zhang and Lemasters, 2013). Thus, cells must regulate tightly their mitochondrial Fe levels because an iron shortage affects numerous processes that have iron as a co-factor, including the electron transport chain, whereas an excess of redox-active iron promotes the generation of the noxious hydroxyl radical. How mitochondria regulate their iron content and what, if any, is the interplay between cytoplasmic and mitochondrial iron are incipient but highly relevant subjects to understand the mechanisms of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.

There is increasing evidence that mitochondrial dysfunction plays an important role in the development of neurodegenerative diseases such as AD, HD, FA, and PD (Enns, 2003; Mandemakers et al., 2007; Sas et al., 2007; Gogvadze et al., 2009; Jellinger, 2009). Imbalances in ROS and ATP levels derived from mitochondrial dysfunction affect neurons particularly, given their dependence on ATP to propagate electrical signals, maintain ionic gradients, and facilitate anterograde and retrograde transport along axons (Su et al., 2013). The involvement of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of PD was noted very early in the study of the disease. Evidence of mitochondrial dysfunction

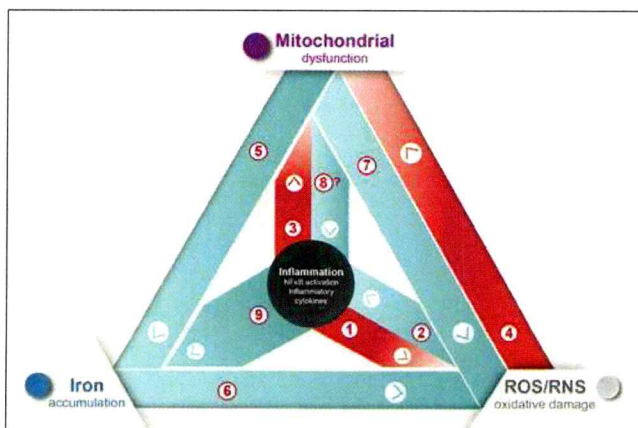


FIGURE 1 | Inflammation causes ROS/RNS production, mitochondrial dysfunction, and iron accumulation. Inflammation, oxidative damage, and mitochondrial dysfunction are common features of neurodegenerative diseases. A complex net of relationships connect these features, which through feedback mechanisms contribute to the evolvement of neuronal death (see text for details).

in PD began in the eighties, when, after an intravenous injection of illicit drugs, four college students developed marked Parkinsonism. Analysis of the substances injected revealed the presence of MPTP, a compound metabolized by astrocytes into 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), which is then released into the extracellular space. MPP⁺ is taken up selectively by dopaminergic (DA) neurons where it inhibits mitochondrial complex I (Heikkila et al., 1984; Langston et al., 1984; Nicklas et al., 1985; Gautier et al., 2013). Further evidence showed that complex I activity and the number of complex I subunits are decreased in postmortem tissue of idiopathic PD patients (Bindoff et al., 1989; Mizuno et al., 1989; Schapira et al., 1989). These results strongly suggest that mitochondrial dysfunction is a pathognomonic sign in the pathophysiology of PD. Reduced complex-I activity and an increased susceptibility to MPP⁺ were also observed in cybrids containing mitochondrial DNA from PD patients (Swerdlow et al., 1996, 2001; Gu et al., 1998a), suggesting the presence of mitochondrial

DNA-encoded defects in PD (Chaturvedi and Flint Beal, 2013). Additionally, in the epidemiology field, the use in farming of the highly lipophilic pesticide rotenone, a potent inhibitor of mitochondrial complex I, has been linked to a higher incidence of PD in agricultural workers (Betarbet et al., 2000; Tanner et al., 2011; Pezzoli and Cereda, 2013).

Mitochondrial complex I is a major source of ROS. Complex I from mitochondria of PD patients contain 47% more protein carbonyls localized to catalytic subunits and a 34% decrease in complex I 8-kDa subunit. NADH-driven electron transfer rates through complex I inversely correlate with complex I protein oxidation status and with the reduction in the 8-kDa subunit protein levels (Keeney et al., 2006).

Knowledge on the mechanisms that associate mitochondrial dysfunction and iron dyshomeostasis in PD is incipient. Treatment of SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells with mitochondrial complex I inhibitors such as rotenone or MPP⁺ results in

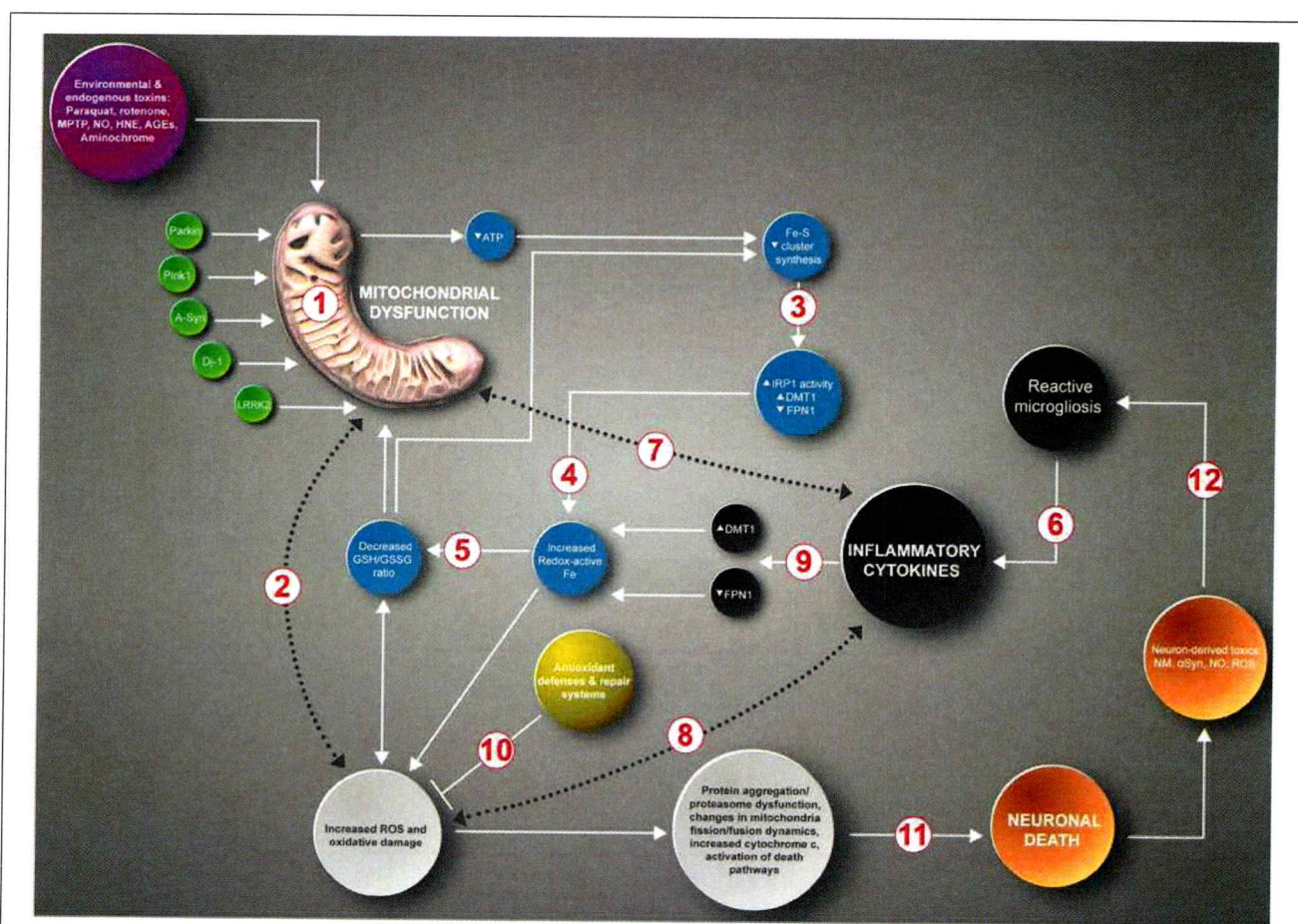


FIGURE 2 | A positive feedback loop in the death of neurons in PD.

Inhibition of mitochondrial complex I by endogenous or exogenous toxins or mutations in PD genes Parkin, Pink1, Alpha-synuclein, DJ-1 or LRRK2 generates a multifactorial positive feedback loop. In this loop, complex I inhibition results in iron accumulation driven by decreased Fe-S cluster synthesis, IRP1 activation, increased DMT1 and Tfr1 expression and decreased FPN1 expression, increased ROS levels and decreased

glutathione levels. Both increased oxidative stress and low GSH levels further inhibit complex I activity. Another input to this cycle is contributed by inflammatory cytokines that through self-feeding cycles induce mitochondrial dysfunction, increased ROS/RNS production and iron accumulation mediated by the transcriptional regulation of DMT1 and FPN1 (see text). The cumulative oxidative damage finally results in apoptotic death (see text for details).

ROS production and increased mitochondrial iron uptake (Lee et al., 2009; Mena et al., 2011). Moreover, inhibition of complex I by rotenone decreases the activity of three ISC-containing enzymes: mitochondrial and cytoplasmic aconitases and xanthine oxidase, and decreases the ISC content of glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (Mena et al., 2011). The reduction in cytoplasmic aconitase activity is associated with an increase in iron regulatory IRP1 mRNA binding activity and with an increase in the mitochondrial labile iron pool (Mena et al., 2011). Since IRP1 activity post-transcriptionally regulates the expression of iron import proteins, ISC synthesis inhibition may result in a false iron deficiency signal with the ensuing iron accumulation.

Considering the evidence discussed, we propose that inhibition of mitochondrial complex I by endogenous and/or exogenous toxins or by inflammatory processes resulting from trauma or other causes, engage a vicious cycle of increased oxidative stress and increased iron accumulation (Figure 2). In this scheme, inhibition of mitochondrial complex I by endogenous or exogenous toxins, or because of mutations in PD genes Parkin, Pink 1, alpha-synuclein, DJ-1 or LRRK2 (Langston and Ballard, 1983; Schapira et al., 1990; Hsu et al., 2000; Silvestri et al., 2005; Martin et al., 2006; Junn et al., 2009; Angeles et al., 2011; Mena et al., 2011), results in decreased electron transport chain activity [1] and the ensuing ATP synthesis decrease and ROS increase [2]. Decreased ATP levels impairs ISC synthesis that results in decreased activity of ISC-containing proteins and increased mRNA binding activity of the iron homeostasis protein IRP1. IRP1 activation leads to increased DMT1 and TfR1 expression (Lee et al., 2009; Mena et al., 2011) [3] and the ensuing iron accumulation (Asenjo, 1968; Dexter et al., 1987; Faucheux et al., 2003; Michaeli et al., 2007) [4]. Increased ROS and increased redox-active iron promotes the consumption of intracellular reductants such as GSH and ascorbate (Perry et al., 1982; Ehrhart and Zeevalk, 2003; Núñez et al., 2004; Jomova et al., 2010) [5], resulting in a further decrease in mitochondrial activity and ISC synthesis (Harley et al., 1993; Gu et al., 1998b; Jha et al., 2000; Chinta et al., 2007; Danielson et al., 2011). Another input to this cycle is contributed by inflammatory cytokines liberated by activated microglia and astrocytes (Mogi et al., 1994) [6], which enhance mitochondrial dysfunction (Tatsumi et al., 2000; Xie et al., 2004; Hunter et al., 2007; Djafarzadeh et al., 2011) [7], increase ROS production (Grzybicki et al., 1996) [8] and increase iron accumulation by modifying the expression of the iron transporters DMT1 and FPN1 (Urrutia et al., 2013; Wang et al., 2013) [9]. As discussed in the text, increased ROS back-feed the production of cytokines. Increased ROS levels, in particular increased hydroxyl radical generation, produces increased oxidative damage, which is counteracted by antioxidant defenses [10]. In time, the positive feedback loop of mitochondrial dysfunction, iron dyshomeostasis and inflammation results in alpha-synuclein aggregation, proteasomal dysfunction, changes in mitochondrial fission/fusion dynamics, opening of the mitochondrial PTP, increased cytoplasmic cytochrome c and activation of death pathways [11]. Debris and toxins from dying neurons enhance the activation of glial cells, which contributes to the inflammatory network (Zecca et al., 2008; Hirsch and Hunot, 2009; Gao et al., 2011) [12].

In summary, because of the innate interconnectivity of mitochondrial complex I dysfunction, iron accumulation, oxidative stress, and inflammation, probably the initiation of any one of these factors will induce or enhance the others through the generation of a positive feedback loop that in time will end in apoptotic neuronal death. Still unanswered is the question of why neurons of the SNc are so particularly prone to carry-on this cycle. On examination of this cycle, several therapeutic targets come to mind. Its intervention should result in prolonged life of the affected neurons.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by grant 1130068 from FONDECYT, and grant ACT1114 from PIA-CONICYT.

REFERENCES

- Abramov, A. Y., Canevari, L., and Duchen, M. R. (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 81–87. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.006
- Abramov, A. Y., and Duchen, M. R. (2005). The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 2309–2314. doi: 10.1098/rstb.2005.1766
- Aliev, G., Palacios, H. H., Lipsitt, A. E., Fischbach, K., Lamb, B. T., Obrenovich, M. E., et al. (2009). Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. *Neurotox. Res.* 16, 293–305. doi: 10.1007/s12640-009-9066-5
- Andersen, H. H., Johnsen, K. B., and Moos, T. (2013). Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-013-1509-8 [Epub ahead of print].
- Angeles, D. C., Gan, B. H., Onstead, L., Zhao, Y., Lim, K. L., Dachselt, J., et al. (2011). Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Hum. Mutat.* 32, 1390–1397. doi: 10.1002/humu.21582
- Arimoto, T., and Bing, G. (2003). Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 12, 35–45. doi: 10.1016/S0969-9961(02)00017-7
- Asenjo, A. (1968). Cytosiderosis and iron deposits in ventrolateral nucleus of the thalamus in Parkinson's disease. Clinical and experimental study. *Johns Hopkins Med. J.* 122, 284–294.
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141–179. doi: 10.1146/annurev.12.040194.001041
- Barnham, K. J., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205–214. doi: 10.1038/nrd1330
- Barthwal, M. K., Srivastava, N., and Dikshit, M. (2001). Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. *Redox Rep.* 6, 297–302. doi: 10.1179/135100001101536436
- Bauer, J., Strauss, S., Schreiter-Gasser, U., Ganter, U., Schlegel, P., Witt, I., et al. (1991). Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.* 285, 111–114. doi: 10.1016/0014-5793(91)80737-N
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., and Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306. doi: 10.1038/81834
- Bindoff, L. A., Birch-Machin, M., Cartlidge, N. E., Parker, W. D. Jr., and Turnbull, D. M. (1989). Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 49. doi: 10.1016/S0140-6736(89)90291-2
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 172, 151–154. doi: 0304-3940(94)90684-X
- Bouton, C., Raveau, M., and Drapier, J. C. (1996). Modulation of iron regulatory protein functions. Further insights into the role of nitrogen- and oxygen-derived reactive species. *J. Biol. Chem.* 271, 2300–2306. doi: 10.1074/jbc.271.4.2300

- own, G. C., and Borutaite, V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 44–49. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.03.016
- uce-Keller, A. J., Gupta, S., Parrino, T. E., Knight, A. G., Ebenezer, P. J., Weidner, A. M., et al. (2010). NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1371–1382. doi: 10.1089/ars.2009.2823
- ettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535–543. doi: 10.1006/abbi.1993.1074
- ettner, G. R., and Schafer, F. Q. (2000). Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology* 62, 234. doi: 10.1002/1096-9926(200010)62:4<234::AID-TERA10>3.0.CO;2-9
- lua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., et al. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J. Exp. Med.* 208, 519–533. doi: 10.1084/jem.20102049
- ssina, A., and Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 309–316. doi: 10.1006/abbi.1996.0178
- aturvedi, R. K., and Flint Beal, M. (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 1–29. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018
- inta, S. J., Kumar, M. J., Hsu, M., Rajagopalan, S., Kaur, D., Rane, A., et al. (2007). Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *J. Neurosci.* 27, 13997–14006. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3885-07.2007
- oi, D. H., Cristovao, A. C., Gubathakurta, S., Lee, J., Joh, T. H., Beal, M. F., et al. (2012). NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1033–1045. doi: 10.1089/ars.2011.3960
- oi, D. Y., Liu, M., Hunter, R. L., Cass, W. A., Pandya, J. D., Sullivan, P. G., et al. (2009). Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS ONE* 4:e5482. doi: 10.1371/journal.pone.0005482
- ark, W. M. (1960). *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- blton, C., and Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 174–191. doi: 10.2174/187152710791012053
- blton, C. A., Wilcock, D. M., Wink, D. A., Davis, J., Van Nostrand, W. E., and Vitke, M. P. (2008). The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human AbetaPP. *J. Alzheimers Dis.* 15, 571–587.
- nielson, S. R., Held, J. M., Oo, M., Riley, R., Gibson, B. W., and Andersen, J. K. (2011). Quantitative mapping of reversible mitochondrial Complex I cysteine oxidation in a Parkinson disease mouse model. *J. Biol. Chem.* 286, 7601–7608. doi: 10.1074/jbc.M110.190108
- ovics, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 93–109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007
- owson, V. L., and Dawson, T. M. (1998). Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* 118, 215–229. doi: 10.1016/S0079-6123(08)63210-0
- lmer, T., Lindenau, J., Haid, S., Dichgans, J., and Schulz, J. B. (2000). Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J. Neurochem.* 74, 2213–2216. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0742213.x
- la Monte, S. M., and Wands, J. R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 167–181.
- latycki, M. B., Camakaris, J., Brooks, H., Evans-Whipp, T., Thorburn, D. R., Williamson, R., et al. (1999). Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* 45, 673–675. doi: 10.1002/1531-8249(199905)45:5<673::AID-ANA20>3.0.CO;2-Q
- exter, D., Carter, C., Agid, F., Agid, Y., Lees, A. J., Jenner, P., et al. (1986). Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 639–640. doi: 10.1016/S0140-6736(86)92471-2
- exter, D. T., Wells, F. R., Agid, E., Agid, Y., Lees, A. J., Jenner, P., et al. (1987). Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet* 2, 1219–1220. doi: 10.1016/S0140-6736(87)91361-4
- farzadeh, S., Vuda, M., Taikala, J., Ochs, M., and Jakob, S. M. (2011). Toll-like receptor-3-induced mitochondrial dysfunction in cultured human hepatocytes. *Mitochondrion* 11, 83–88. doi: 10.1016/j.mito.2010.07.010
- rapier, J. C. (1997). Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems. *Methods* 11, 319–329. doi: 10.1006/meth.1996.0426
- Drose, S., and Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 748, 145–169. doi: 10.1007/978-1-4614-3573-0_6
- Ehrhart, J., and Zeevalk, G. D. (2003). Cooperative interaction between ascorbate and glutathione during mitochondrial impairment in mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* 86, 1487–1497. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01954.x
- Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* 58:39–46. doi: 10.1016/j.biopha.2003.11.004
- Enns, G. M. (2003). The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol. Genet. Metab.* 80, 11–26. doi: 10.1016/j.ymgme.2003.08.009
- Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., and Cabantchik, I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* 248, 31–40. doi: 10.1006/abio.1997.2126
- Eve, D. J., Nisbet, A. P., Kingsbury, A. E., Hewson, E. L., Daniel, S. E., Lees, A. J., et al. (1998). Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63, 62–71. doi: 10.1016/S0169-328X(98)00259-9
- Fauchoux, B. A., Martin, M. E., Beaumont, C., Hauw, J. J., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (2003). Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 86, 1142–1148. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01923.x
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268, 22369–22376.
- Gao, H. M., Zhang, F., Zhou, T., Kam, W., Wilson, B., and Hong, J. S. (2011). Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 807–814. doi: 10.1289/ehp.1003013
- Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B., and White, C. W. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13399–13405. doi: 10.1074/jbc.270.22.13399
- Gautier, C. A., Corti, O., and Brice, A. (2013). Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* doi: 10.1016/j.neurol.2013.06.003 [Epub ahead of print].
- Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovskiy, B. (2009). Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis* 14, 624–640. doi: 10.1007/s10495-009-0323-0
- Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., and Eaton, J. W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259, 3620–3624.
- Grubman, A., White, A. R., and Liddell, J. R. (2013). Mitochondrial metals as a potential therapeutic target in neurodegeneration. *Br. J. Pharmacol.* doi: 10.1111/bph.12513 [Epub ahead of print].
- Grzybicki, D., Gebhart, G. F., and Murphy, S. (1996). Expression of nitric oxide synthase type II in the spinal cord under conditions producing thermal hyperalgesia. *J. Chem. Neuroanat.* 10, 221–229. doi: 10.1016/0891-0618(96)00139-1
- Gu, M., Cooper, J. M., Taanman, J. W., and Schapira, A. H. (1998a). Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, 177–186. doi: 10.1002/ana.410440207
- Gu, M., Owen, A. D., Toffa, S. E., Cooper, J. M., Dexter, D. T., Jenner, P., et al. (1998b). Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J. Neurol. Sci.* 158, 24–29. doi: 10.1016/S0022-510X(98)00095-1
- Guo, R. B., Wang, G. F., Zhao, A. P., Gu, J., Sun, X. L., and Hu, G. (2012). Paconiflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats via inhibiting MAPKs/NF-kappaB-mediated inflammatory responses. *PLoS ONE* 7:e49701. doi: 10.1371/journal.pone.0049701
- Haile, D. J., Rouault, T. A., Tang, C. K., Chin, J., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1992). Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7536–7540. doi: 10.1073/pnas.89.16.7536
- Hanke, M. L., and Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci.* 121, 367–387. doi: 10.1042/CS20110164
- Harley, A., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (1993). Iron induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction: relevance to Parkinson's disease. *Brain Res.* 627, 349–353. doi: 10.1016/0006-8993(93)90341-J
- Hausladen, A., and Fridovich, I. (1994). Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* 269, 29405–29408.

- Ikilä, R. E., Hess, A., and Duvoisin, R. C. (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224, 1451–1453. doi: 10.1126/science.6610213
- Insley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., and Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1456–1462. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00252-5
- Jrnanides, M. S., Santos, G. D., Cafe-Mendes, C. C., Lima, L. S., Scavone, C., Munhoz, C. D., et al. (2013). Microglial cells are involved in the susceptibility of NADPH oxidase knockout mice to 6-hydroxy-dopamine-induced neurodegeneration. *PLoS ONE* 8:e75532. doi: 10.1371/journal.pone.0075532
- Jewett, J. A., and Hewett, S. J. (2012). Induction of nitric oxide synthase-2 expression and measurement of nitric oxide production in enriched primary cortical astrocyte cultures. *Methods Mol. Biol.* 814, 251–263. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_17
- Jordan, R. C., and Kong, X. L. (2011). Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biomol. J.* 24, 1179–1187. doi: 10.1007/s10534-011-9476-8
- Jordan, E. C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382–397. doi: 10.1016/S1473-4422(09)70062-6
- Ju, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., et al. (2000). alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 157, 401–410. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64553-1
- Jung, M. L., Becker, E. M., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Ponka, P., and Richardson, D. R. (2009). Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16381–16386. doi: 10.1073/pnas.0906784106
- Jung, S. H., Chung, Y. C., Piao, Y., Jin, M. Y., Son, H. J., Yoon, N. S., et al. (2011). Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Immunol.* 187, 960–969. doi: 10.4049/jimmunol.1100009
- Jordan, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P. P., Muriel, M. P., Ruberg, M., et al. (1997). Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7531–7536. doi: 10.1073/pnas.94.14.7531
- Jordan, R. L., Dragicic, N., Seifert, K., Choi, D. Y., Liu, M., Kim, H. C., et al. (2007). Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J. Neurochem.* 100, 1375–1386. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x
- Jordan, R. L., Liu, M., Choi, D. Y., Cass, W. A., and Bing, G. (2008). Inflammation and age-related iron accumulation in F344 rats. *Curr. Aging Sci.* 1, 112–121. doi: 10.2174/1874609810801020112
- Jordan, K. A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J. Neural Transm.* 116, 1111–1162. doi: 10.1007/s00702-009-0240-y
- Ju, N., Jurma, O., Lalli, G., Liu, Y., Pettus, E. H., Greenamyre, J. T., et al. (2000). Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 26096–26101. doi: 10.1074/jbc.M000120200
- Jordan, K., Vondrakova, D., Lawson, M., and Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 345, 91–104. doi: 10.1007/s11010-010-0563-x
- Jordan, E., Jang, W. H., Zhao, X., Jeong, B. S., and Mouradian, M. M. (2009). Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J. Neurosci. Res.* 87, 123–129. doi: 10.1002/jnr.21831
- Jordan, O., and Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1037–1046. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01006-7
- Jordan, E. M., Lima, L. S., Munhoz, C. D., Yshii, L. M., Kinoshita, P. F., Amara, F. G., et al. (2012). Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kappaB in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 90, 213–228. doi: 10.1002/jnr.22745
- Jordan, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A., and Bennett, J. P. Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J. Neurosci.* 26, 5256–5264. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006
- Jordan, M., Cheng, D., Tsukamoto, M. R., Koike, M. A., Wes, P. D., Vasilevko, V., et al. (2011). Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J. Immunol.* 187, 6539–6549. doi: 10.4049/jimmunol.1100620
- Kiyota, T., Yamamoto, M., Xiong, H., Lambert, M. P., Klein, W. L., Gendelman, H. E., et al. (2009). CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS ONE* 4:e6197. doi: 10.1371/journal.pone.0006197
- Knott, C., Stern, G., and Wilkin, G. P. (2000). Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 724–739. doi: 10.1006/mcne.2000.0914
- Kokovay, E., and Cunningham, L. A. (2005). Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 19, 471–478. doi: 10.1016/j.nbd.2005.01.023
- Kumfu, S., Chattipakorn, S., Fucharoen, S., and Chattipakorn, N. (2012). Mitochondrial calcium uniporter blocker prevents cardiac mitochondrial dysfunction induced by iron overload in thalassemic mice. *Biomol. J.* 25, 1167–1175. doi: 10.1007/s10534-012-9579-x
- Langston, J. W., and Ballard, P. A. Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* 309, 310. doi: 10.1056/NEJM198308043090511
- Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B., and Forno, L. S. (1984). Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science* 225, 1480–1482. doi: 10.2307/1693552
- Lavigne, M. C., Malech, H. L., Holland, S. M., and Leto, T. L. (2001). Genetic requirement of p47phox for superoxide production by murine microglia. *FASEB J.* 15, 285–287. doi: 10.1096/fj.00-0608fje
- Lee, D. W., Kaur, D., Chinta, S. J., Rajagopalan, S., and Andersen, J. K. (2009). A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2083–2094. doi: 10.1089/ARS.2009.2489
- Lee, Y. W., Lee, W. H., and Kim, P. H. (2010). Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium. *Cytokine* 49, 73–79. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.009
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Serra, P. A., Impagnatiello, F., et al. (2010). Combining nitric oxide release with anti-inflammatory activity preserves nigrostriatal dopaminergic innervation and prevents motor impairment in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 7, 83. doi: 10.1186/1742-2094-7-83
- Liang, L. P., and Patel, M. (2004). Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 90, 1076–1084. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02567.x
- Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., Mcauliffe, W. G., et al. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5, 1403–1409. doi: 10.1038/70978
- Lipinski, B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011, 809696. doi: 10.1155/2011/809696
- Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I., and Weiss, G. (2003). Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 101, 4148–4154. doi: 10.1182/blood-2002-08-2459
- Mandemakers, W., Morais, V. A., and De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J. Cell Sci.* 120, 1707–1716. doi: 10.1242/jcs.03443
- Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., et al. (2006). Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.* 26, 41–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4308-05.2006
- McGeer, P. L., Itagaki, S., and McGeer, E. G. (1988). Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* 76, 550–557. doi: 10.1007/BF00689592
- McIllo-Filho, A. C., and Meneghini, R. (1991). Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutat. Res.* 251, 109–113. doi: 10.1016/0027-5107(91)90220-1
- Mena, N. P., Bulteau, A. L., Salazar, J., Hirsch, E. C., and Núñez, M. T. (2011). Effect of mitochondrial complex I inhibition on Fe-S cluster protein activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 241–246. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.137
- Michaeli, S., Oz, G., Sorce, D. J., Garwood, M., Ugurbil, K., Majestic, S., et al. (2007). Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with

- Parkinson's disease using novel MRI contrasts. *Mov. Disord.* 22, 334–340. doi: 10.1002/mds.21227
- Illis, K. K., Weaver, K. H., and Rabenstein, D. L. (1993). Oxidation/reduction potential of glutathione. *J. Org. Chem.* 58, 4144–4146. doi: 10.1021/jo0057a060
- zuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., et al. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1450–1455. doi: 10.1016/0006-291X(89)91141-8
- ggi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., et al. (1994). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 180, 147–150. doi: 10.1016/0304-3940(94)90508-8
- rcira, P. I., Zhu, X., Wang, X., Lee, H. G., Nunomura, A., Petersen, R. B., et al. (2010). Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 212–220. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.007
- ckenthaler, M. U., Galy, B., and Hentze, M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 197–213. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521
- ulero, V., and Brock, J. H. (1999). Regulation of iron metabolism in murine J774 macrophages: role of nitric oxide-dependent and -independent pathways following activation with gamma interferon and lipopolysaccharide. *Blood* 94, 2383–2389. doi: 10.1074/jbc.275.9.6220
- uller, T., Blum-Degen, D., Przuntek, H., and Kuhn, W. (1998). Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 98, 142–144. doi: 10.1111/j.1600-0404.1998.tb01736.x
- agatsu, T. (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J. Neural Transm.* 109, 731–745. doi: 10.1007/s007020200061
- cklas, W. J., Vyas, I., and Heikkilä, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503–2508. doi: 10.1016/0024-3205(85)90146-8
- oh, K. M., and Koh, J. Y. (2000). Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 20, RC111.
- ñez, M. T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J., et al. (2004). Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 953–960. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.005
- ñez, M. T., Tapia, V., Toyokuni, S., and Okada, S. (2001). Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco-2) cells. *Free Radic. Res.* 34, 57–68. doi: 10.1080/10715760100300061
- ñez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., and Salazar, J. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *Biomaterials* 25, 761–776. doi: 10.1007/s10534-012-9523-0
- ñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Maccioni, R. B., and Núñez, M. T. (2002). An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *J. Neurochem.* 82, 240–248. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00971.x
- unomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., et al. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19, 1959–1964.
- aradkar, P. N., and Roth, J. A. (2006). Nitric oxide transcriptionally down-regulates specific isoforms of divalent metal transporter (DMT1) via NF-kappaB. *J. Neurochem.* 96, 1768–1777. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03702.x
- ark, L., Zhou, P., Pitsstick, R., Capone, C., Anrather, J., Norris, E. H., et al. (2008). Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1347–1352. doi: 10.1073/pnas.0711568105
- awate, S., Shen, Q., Fan, F., and Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J. Neurosci. Res.* 77, 540–551. doi: 10.1002/jnr.20180
- elizzoni, I., Macco, R., Morini, M. F., Zacchetti, D., Grohovaz, F., and Codazzi, F. (2011). Iron handling in hippocampal neurons: activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity. *Aging Cell* 10, 172–183. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00652.x
- Perry, T. L., Godin, D. V., and Hansen, S. (1982). Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.* 33, 305–310. doi: 10.1016/0304-3940(82)90390-1
- Petrat, F., De Groot, H., and Rauen, U. (2001). Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* 356, 61–69. doi: 10.1042/0264-6021:3560061
- Petrat, F., De Groot, H., Sustmann, R., and Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.* 383, 489–502. doi: 10.1515/BC.2002.051
- Pezzoli, G., and Cereda, E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* 80, 2035–2041. doi: 10.1212/WNL.0b013e318294b3c8
- Phani, S., Loike, J. D., and Przedborski, S. (2012). Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18(Suppl 1), S207–S209. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70064-5
- Pierre, J. L., and Fontecave, M. (1999). Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biomaterials* 12, 195–199. doi: 10.1023/A:1009252919854
- Possel, H., Noack, H., Putzke, J., Wolf, G., and Sies, H. (2000). Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32, 51–59. doi: 10.1002/1098-1136(200010)32:1<51::AID-GLIA50>3.0.CO;2-4
- Ridder, D. A., and Schwaninger, M. (2009). NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 995–1006. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.007
- Rothwell, N. J., and Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23, 618–625. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01661-1
- Rouault, T. A., and Tong, W. H. (2005). Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 345–351. doi: 10.1038/nrm1620
- Sarella, O., Kelkka, T., Pizzolla, A., Hultqvist, M., and Holmdahl, R. (2011). NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2197–2208. doi: 10.1089/ars.2010.3635
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., and Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neural Sci.* 257, 221–239. doi: 10.1016/j.jns.2007.01.033
- Schapira, A. H., and Cooper, J. M. (1992). Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat. Res.* 275, 133–143. doi: 10.1016/0921-8734(92)90018-K
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B., and Marsden, C. D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269. doi: 10.1016/S0140-6736(89)92366-0
- Sen, C. K., and Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709–720.
- Seyidova, D., Aliyev, A., Rzayev, N., Obrenovich, M., Lamb, B. T., Smith, M. A., et al. (2004). The role of nitric oxide in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease. *In Vivo* 18, 325–333.
- Shand, O., and Volz, K. (2013). The solution structure of apo-iron regulatory protein 1. *Gene* 524, 341–346. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.112
- Shi, H. X., Liu, X., Wang, Q., Tang, P. P., Liu, X. Y., Shan, Y. F., et al. (2011). Mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 promotes TLR7 signaling by attenuating TANK action. *PLoS Pathog.* 7:e1002057. doi: 10.1371/journal.ppat.1002057
- Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., et al. (2000). Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 5–9. doi: 10.1006/bbrc.2000.2897
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E. M., et al. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3477–3492. doi: 10.1093/hmg/ddi377
- Singh, S., Das, T., Ravindran, A., Chaturvedi, R. K., Shukla, Y., Agarwal, A. K., et al. (2005). Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease. *Redox Rep.* 10, 103–109. doi: 10.1179/135100005X38842
- Skalniak, D. G., Strauss, E. C., and Orkin, S. H. (1991). CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266, 16736–16744.

- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S., and Perry, G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17, 2653–2657.
- Chaski, M. A., Bartfay, W. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Bartfay, E., Lehotay, D. C., et al. (2002). Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism* 51, 645–651. doi: 10.1053/meta.2002.30530
- Ng, Y., Qu, R., Zhu, S., Zhang, R., and Ma, S. (2012). Rhynchophylline attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of MAPK/NF-kappaB signaling pathways in primary microglia. *Phytother. Res.* 26, 1528–1533. doi: 10.1002/ptr.4614
- Wang, K., Bourdette, D., and Forte, M. (2013). Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Front. Physiol.* 4:169. doi: 10.3389/fphys.2013.00169
- Cardlow, R. II., Parks, J. K., Cassarino, D. S., Binder, D. R., Bennett, J. P. Jr., Di Torio, G., et al. (2001). Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from Contursi kindred Parkinson's subjects. *Exp. Neurol.* 169, 479–485. doi: 10.1006/exnr.2001.7674
- Cardlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., et al. (1996). Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 40, 663–671. doi: 10.1002/ana.410400417
- Wanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872. doi: 10.1289/ehp.1002839
- Yasumi, T., Matoba, S., Kawahara, A., Keira, N., Shiraiishi, J., Akashi, K., et al. (2000). Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1338–1346. doi: 10.1016/S0735-1097(00)00526-X
- de Weuwsen, V. J., Schalken, J. J., Van Der Groen, G., Van De Akker, R., Goudsmit, J., and Osterhaus, A. D. (1991). An inhibition enzyme immunoassay using a human monoclonal antibody (K14) reactive with gp41 of HIV-1 for the serology of HIV-1 infections. *AIDS* 5, 893–896. doi: 10.1097/00002030-199107000-00017
- Annickel, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–L1028.
- Wang, K., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life* 55, 329–335. doi: 10.1080/1521654032000114320
- de la Fuente Velasco, J. C., Limon-Pacheco, J. H., Orozco-Ibarra, M., Macias-Silva, M., Vazquez-Victorio, G., Cuevas, E., et al. (2013). 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-kappaB factors. *Toxicology* 304, 109–119. doi: 10.1016/j.tox.2012.12.011
- Yoda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., and Yodoi, J. (2002). Redox control of cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 405–414. doi: 10.1089/15230860260196209
- rutia, P., Aguirre, P., Esparza, A., Tapia, V., Mena, N. P., Arredondo, M., et al. (2013). Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J. Neurochem.* 126, 541–549. doi: 10.1111/jnc.12244
- de la Fuente Velasco, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., et al. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184, 1425–1433. doi: 10.1.1.284.1997
- de la Fuente Velasco, M. N., Geddes, J. G., Farquhar, D. A., and Masson, M. R. (1997). Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp. Neurol.* 144, 266–272. doi: 10.1006/exnr.1996.6373
- Wang, J., Song, N., Jiang, H., and Xie, J. (2013). Pro-inflammatory cytokines modulate iron regulatory protein 1 expression and iron transportation through reactive oxygen/nitrogen species production in ventral mesencephalic neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 618–625. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.01.021
- Wang, X., Garrick, M. D., Yang, F., Dailey, L. A., Piantadosi, C. A., and Ghio, A. J. (2005). TNF, IFN-gamma, and endotoxin increase expression of DMT1 in bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289, L24–L33. doi: 10.1152/ajplung.00428.2003
- Cardrop, S. L., and Richardson, D. R. (2000). Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur. J. Biochem.* 267, 6586–6593. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01752.x
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480. doi: 10.1038/nature09973
- Wood, P. M. (1988). The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.* 253, 287–289.
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., et al. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J. Neurosci.* 22, 1763–1771.
- Wu, D. C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., et al. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6145–6150. doi: 10.1073/pnas.0937239100
- Xie, Z., Smith, C. J., and Van Eldik, L. J. (2004). Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45, 170–179. doi: 10.1002/glia.10314
- Yang, C. S., Kim, J. J., Lee, S. J., Hwang, J. H., Lee, C. H., Lee, M. S., et al. (2013). TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1. *J. Immunol.* 190, 6368–6377. doi: 10.4049/jimmunol.1202574
- Yang, C. S., Shin, D. M., Kim, K. H., Lee, Z. W., Lee, C. H., Park, S. G., et al. (2009). NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J. Immunol.* 182, 3696–3705. doi: 10.4049/jimmunol.0802217
- Yang, F., Liu, X. B., Quinones, M., Melby, P. C., Ghio, A., and Haile, D. J. (2002). Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J. Biol. Chem.* 277, 39786–39791. doi: 10.1074/jbc.M201485200
- Yokoyama, H., Takagi, S., Watanabe, Y., Kato, H., and Araki, T. (2008). Role of reactive nitrogen and reactive oxygen species against MPTP neurotoxicity in mice. *J. Neural Transm.* 115, 831–842. doi: 10.1007/s00702-008-0019-6
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknicht, C., et al. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 116, 47–55. doi: 10.1007/s00401-008-0361-7
- Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., and Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 863–873. doi: 10.1038/nrn1537
- Zhang, F., Zhou, H., Wilson, B. C., Shi, J. S., Hong, J. S., and Gao, H. M. (2012). Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18(Suppl 1), S213–S217. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70066-9
- Zhang, J., Stanton, D. M., Nguyen, X. V., Liu, M., Zhang, Z., Gash, D., et al. (2005). Intrapallidal lipopolysaccharide injection increases iron and ferritin levels in glia of the rat substantia nigra and induces locomotor deficits. *Neuroscience* 135, 829–838. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.049
- Zhang, W., Wang, T., Qin, L., Gao, H. M., Wilson, B., Ali, S. F., et al. (2004). Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J.* 18, 589–591. doi: 10.1096/fj.03-0983jfe
- Zhang, X., and Lemasters, J. J. (2013). Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during ischemia predisposes to injury after reperfusion in rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 243–253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.004
- Zoccarato, F., Toscano, P., and Alexandre, A. (2005). Dopamine-derived dopaminochrome promotes H(2)O(2) release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca(2+), and relevance to Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 280, 15587–15594. doi: 10.1074/jbc.M500657200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 09 January 2014; paper pending published: 29 January 2014; accepted: 19 February 2014; published online: 10 March 2014.

Citation: Urrutia PJ, Mena NP and Núñez MT (2014) The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step in neurodegenerative disorders. *Front. Pharmacol.* 5:38. doi: 10.3389/fphar.2014.00038
This article was submitted to *Drug Metabolism and Transport*, a section of the journal *Frontiers in Pharmacology*.

Copyright © 2014 Urrutia, Mena and Núñez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.