



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Estudio del Metabolismo de Hierro en Disfunciones
Asociadas a la Eritropoyesis**

PARTE I

Tania V. Veuthey

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2010



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Estudio del Metabolismo de Hierro en Disfunciones
Asociadas a la Eritropoyesis**

Tania V. Veuthey

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2010

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisiología Humana, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, durante el período comprendido entre el 27 de Septiembre de 2005 y el 9 de Marzo de 2010, bajo la dirección de la Dra. Marta E. Roque, Profesora Titular de Fisiología Humana.

Tania V. Veuthey

Bahía Blanca, 9 de Marzo de 2010

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y
Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... ,
mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora de tesis, Marta Roque, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación y guiarme constantemente en toda esta etapa de mi formación. Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca doctoral para desarrollar este trabajo de tesis. También a la Secretaria General de Ciencia y Tecnología de la UNS, quien financió una estadía de investigación en el exterior, la cual contribuyó a mi formación profesional y al enriquecimiento de este trabajo. Agradezco al departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por su apoyo.

Quisiera agradecer a la Dra. Wessling-Resnick (Harvard School of Public Health) por recibirme en su laboratorio unos meses y brindarme la oportunidad de ampliar mi formación. También agradezco a Erin Johnson, Petter Buckett y Jonghan Kim por su ayuda en el desarrollo de algunos experimentos.

También quisiera agradecer a todos mis compañeros del laboratorio y de la cátedra, con los cuales compartí hermosos momentos en todo este tiempo: Marce, Bety, Pame, Mari, Marianela, Amparo, Gise, Sol, Christian. Agradezco además a Graciela y a Gustavo su ayuda en cuestiones experimentales. Agradezco a mis amigos de la Universidad, Vir, Leo, Fer, Lore y Mariano, y a Gaby, quienes fueron los primeros compañeros en este camino; y principalmente a Ceci, quien además ha sido una gran compañera de trabajo y un gran apoyo.

Agradezco mucho a mis padres, hermanas y familia, quienes han sido un pilar fundamental para mi, quienes han confiado en mi y me han apoyado en todas mis decisiones. Finalmente agradezco mucho a Leo, por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron aspectos funcionales y disfuncionales del metabolismo del Fe centralizados principalmente en patologías que comprometen al Eritrón.

Los estudios se realizaron en Modelos Animales de ratón desarrollados por inducción de alteraciones del metabolismo del Fe y de la eritropoyesis, como la alta demanda de Fe asociada a la anemia hemolítica severa, con sin inhibición de la eritropoyesis, y con y sin Sobrecarga de Fe. Otro de los modelos animales utilizados fue el de ratas Belgrade, mutantes para el Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1).

En estos modelos experimentales, aplicando un diseño metodológico adecuado, se encararon estudios estructurales y funcionales mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Con este objetivo, se utilizaron tejidos tradicionalmente asociados a la captación, depósito y liberación del Fe, como son el duodeno, bazo e hígado. Un aspecto innovador de nuestro trabajo fue la evaluación de la función renal en el metabolismo del Fe. La eritropoyesis y el estado del Fe se evaluaron en sangre periférica mediante técnicas hematológicas y bioquímicas convencionales. El análisis estadístico de los datos se aplicó en todos los casos que fue necesario por el tipo de estudio. En las condiciones experimentales descritas, se abordaron estudios de identificación y caracterización de proteínas centrales del metabolismo del Fe como Prohepcidina y DMT1, así como también de Eritropoyetina, principal regulador de la eritropoyesis, estrechamente asociada al Fe, uno de sus nutrientes esenciales. En el modelo de Anemia identificamos y cuantificamos Islotes Eritroblásticos en bazo, hígado, y riñón, indicadores diagnósticos de la actividad eritropoyética, siendo importante destacar la contribución renal en la restauración de la volemia post-hemólisis.

En las condiciones de alta demanda de Fe que caracteriza a la Anemia Hemolítica, el perfil de expresión de DMT1 mostró un mecanismo regulatorio tendiente a estimular la absorción de Fe en duodeno y a disminuir la captación de Fe en hígado; de esta forma DMT1 contribuyó a aumentar la disponibilidad de Fe para restaurar la eritropoyesis. La función de Prohepcidina como regulador negativo de la absorción de Fe, se reflejó por su moderada expresión en la Anemia Hemolítica. En las condiciones del modelo acoplado, que se caracteriza por intensa demanda de Fe, por la Anemia Hemolítica, y exceso de Fe; el aumento de expresión hepática de DMT1 constituyó un mecanismo

regulatorio que estimuló la captación Fe en hígado. Este comportamiento fue similar al observado en Sobrecarga de Fe sin Anemia. En duodeno, en Anemia con Sobrecarga de Fe, la expresión intracelular de DMT1 reflejó un moderado estímulo de la absorción de Fe, como mecanismo para evitar la citotoxicidad causada por el exceso de Fe. Este perfil de expresión también fue coincidente con el observado en Sobrecarga de Fe sin Anemia. La activa participación de Prohepcidina como principal hormona reguladora del balance del Fe se puso en evidencia por su marcada expresión hepática tanto en Sobrecarga de Fe como en Anemia con Sobrecarga de Fe.

El diseño del modelo de acople fue innovador porque creó condiciones fisiopatológicas adecuadas para inducir el aumento simultáneo de Prohepcidina y Epo definiendo la siguiente interrelación funcional y regulatoria: en respuesta a la señal “exceso de Fe” aumentó la expresión de Prohepcidina y en respuesta a la señal “alta demanda” de la anemia, aumentó la expresión de Epo. Otro aporte significativo de nuestros estudios surgió de identificar al riñón como un órgano metabólicamente activo en el balance del Fe, a partir de los cambios funcionales y regulatorios de Prohepcidina y DMT1 tendientes a favorecer la captación tubular de Fe en anemia severa con y sin exceso de Fe.

Los estudios de Prohepcidina y Epo en el riñón en Ratas Belgrade constituyeron un aporte relevante para ampliar el conocimiento de las relaciones regulatorias entre eritropoyesis y Fe en respuesta a la anemia constitutiva derivada de la mutación del gen de DMT1. De nuestros resultados podemos concluir que en Ratas Belgrade, la respuesta adaptativa a la señal “anemia” (aumento de Epo y disminución de Prohepcidina renal) tendiente a estimular la captación de Fe, fue inefectiva por mutación del importador de Fe DMT1.

ABSTRACT

In this work we studied functional and dysfunctional points of iron metabolism, focusing mainly in pathologies that compromise the Eryhtron.

These studies were made in animal models of mouse, developed for induction of iron metabolism and erythropoiesis alterations, as high iron demands associated with severe hemolytic anemia, with and without erythropoiesis inhibition, and with and without iron overload. Another animal model used was Belgrade rats, where Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) is mutated.

In these experimental models, applying an adequate methodological design, we focused on structural and functional studies using histological and immunohistochemistry methods. With this objective, we used tissues commonly associated with iron uptake, iron deposit and iron release, as are the duodenum, the spleen and the liver. An innovative point of our work was the evaluation of renal function in iron metabolism. Erythropoiesis and iron state were evaluated in peripheral blood using conventional hematological tests. Statistical analysis of the data was applied in all cases that it was necessary for the type of study. In the experimental conditions described, we have done research on the identification and characterization of key proteins of iron metabolism as Prohepcidin and DMT1, as well as also, Erythropoietin, primary regulator of erythropoiesis, and tightly associated with iron, one of the essential nutrients. In anemia model we identified and quantified Erythroblastic Islands in spleen, liver and kidney, diagnostic indicators of erythropoietic activity, highlighting the renal contribution in restoration of blood volume post-hemolysis.

Under conditions of high iron demands, that characterizes hemolytic anemia, the expression pattern of DMT1 showed a regulatory mechanism aimed to stimulate iron absorption on duodenum and to decrease iron uptake in liver; thus, DMT1 contributed to increase iron availability to restore erythropoiesis. The role of Prohepcidin as negative regulator of iron absorption was reflected by its moderate expression under hemolytic anemia. In the conditions of our coupled model, characterized by high iron demands, by hemolytic anemia, and iron excess; the increased hepatic expression of DMT1 was a regulatory mechanism that stimulated iron uptake in liver. This behavior was similar to that observed in iron overload without anemia. On duodenum, under anemia with iron overload, intracellular expression of DMT1 showed to be a moderate stimulus for iron absorption, as a mechanism to avoid iron toxicity causes by iron

excess. This expression pattern was also coincident with that observed in iron overload without anemia. The active involvement of Prohepcidin as the primary regulating hormone of iron balance was evident for its increased hepatic expression both under iron overload and under hemolytic anemia with iron overload.

The design of the coupled model was innovator because set up adequate physiopathological conditions to induce the concomitant increase of Prohepcidin and Epo, defining the following functional and regulatory relation: in response to the signal “iron excess” Prohepcidin expression increased and in response to the signal “high iron demands” of anemia, Epo expression increased. Another significant contribution of our studies emerged to identify the kidney as a tissue metabolically active in iron balance, from functional and regulatory changes of Prohepcidin and DMT1 that allow the tubular iron uptake in severe anemia with and without iron excess.

Prohepcidin and Epo studies in kidney of Belgrade rats were a relevant contribution to extend our knowledge of regulatory relations between erythropoiesis and iron in response to constitutive anemia from mutations of DMT1 gene. From our results, we conclude that in Belgrade rats, the adaptative response to the signal “anemia” (Epo increased and renal Prohepcidin decreased) aimed to stimulate iron uptake, was ineffective for the mutation of the iron importer DMT1.

CONTENIDO

PARTE I

Índice de Tablas	1
Índice de Figuras y Diagramas	2
Abreviaturas	9

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN 11

SECCIÓN II. MATERIALES Y MÉTODOS 39

1. Animales de Experimentación	40
1.1. Especies	40
1.2. Dietas	40
1.3. Condiciones Ambientales	40
1.4. Reglamentación para el trabajo con animales de laboratorio	41
1.5. Criterios de Inclusión de ratones en la Condición Basal	41
2. Muestras Biológicas	42
2.1. Sangre Periférica	42
2.2. Tejidos	44
3. Administración de Fármacos	47
4. Parámetros Bioquímicos. Hematológicos	48
4.1. Hemoglobina	48
4.2. Eritropoyetina Plasmática y Sérica	50
4.3. Hematocrito	53
4.4. Índices Hematimétricos	54
5. Estudios Morfológicos	54
5.1. Sangre Periférica	54
5.1.1. Eritrocitos	54
5.1.2. Serie Leucocitaria	55
5.1.3. Serie Eritrocitaria	56

5.1.4. Reticulocitos	57
5.1.5. Células con Cuerpos de Heinz	58
5.2. Tejidos	59
5.2.1. Epitelio de Túbulo Proximal	59
5.2.2. Islotes Eritroblásticos	60
6. Estado del Hierro	61
6.1. Hierro Plasmático	61
6.2. Hierro Tisular	61
6.2.1. Evaluación Semicuantitativa	62
6.2.2. Evaluación Cuantitativa	63
7. Procesamiento de muestras para Microscopía Óptica	66
7.1. Método de Fijación	66
7.2. Método de Inclusión	67
8. Procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica	68
9. Tinciones Histológicas	69
9.1. Hematoxilina & Eosina	69
9.2. Tinción de Perl's	71
10. Estudios Inmunohistoquímicos	72
10.1. Técnica Enzimática. Inmunoperoxidasa	72
10.2. Protocolos	74
10.2.1. Método con polímero conjugado	74
10.2.2. Método indirecto en dos pasos	77
10.2.3. Anticuerpos primarios	79
10.2.4. Anticuerpos secundarios	79
11. Estudios Estadísticos	80
11.1. Diseño experimental	80
11.2. Análisis Estadístico	82
11.2.1. Tamaño de muestra	82
11.2.2. Normalidad	83
11.2.3. Homoscedasticidad	85
11.2.4. Análisis de Varianza. ANOVA	88
11.2.5. Comparaciones múltiples	92

SECCIÓN III. RESULTADOS	94
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS ANIMALES	95
1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA	96
1.1 Desarrollo de Anemia Hemolítica en ratón	96
1.2 Evaluación de la Actividad Eritropoyética	102
1.2.1. Evaluación de la Eritropoyesis en la Anemia Hemolítica	103
1.2.2. Evaluación de la Eritropoyesis Extramedular	107
1.2.2.a. Estudios Histológicos	107
1.2.2.b. Estudios Ultraestructurales	111
2. MODELO DE ANEMIA HEMOLÉTICA CON INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ERITROPOYESIS	116
2.1 Desarrollo del Modelo	116
2.2. Evaluación de la Eritropoyesis	117
2.3. Evaluación de la Eritropoyesis Extramedular	120
3. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO	129
3.1. Desarrollo del Modelo	129
3.2. Evaluación de la Eritropoyesis y el estado del Hierro	130
3.2.1. Estudios Hematológicos	130
3.2.2. Evaluación del estado del Hierro	133
3.2.2.a. Hierro Plasmático	133
3.2.2.b. Hierro Tisular	134
4. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	140
4.1 Desarrollo del Modelo	140
4.2. Evaluación de la Eritropoyesis	141

4.3. Evaluación del Estimulo Eritropoyético	147
4.4. Evaluación del estado del Hierro	149
4.4.1. Hierro Plasmático	149
4.4.2. Hierro Hepático	151
CAPÍTULO II. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	152
1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA	153
1.1. Transportador de Metales Divalentes 1	154
1.1.a. Tejido Duodenal	154
1.1.b. Tejido Hepático	161
1.1.c. Tejido Esplénico	167
1.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	175
2. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO	179
2.1. Transportador de Metales Divalentes 1	179
2.1.a. Tejido Duodenal	179
2.1.b. Tejido Hepático	183
2.1.c. Tejido Esplénico	187
2.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	192
3. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	195
3.1. Transportador de Metales Divalentes 1	195
3.1.a. Tejido Duodenal	195
3.1.b. Tejido Hepático	202
3.1.c. Tejido Esplénico	211
3.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	219

PARTE II

CAPÍTULO III. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN	222
ANEMIA HEMOLÍTICA	224
Transportador de Metales Divalentes 1	225
Prohepcidina	234
Hierro Tisular	242
SOBRECARGA DE HIERRO	246
Transportador de Metales Divalentes 1	246
Prohepcidina	251
Hierro Tisular	256
MODELO DE ACOPLA: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	257
Transportador de Metales Divalentes 1	257
Prohepcidina	267
Hierro Tisular	272
RATAS BELGRADE	274
Transportador de Metales Divalentes 1	274
Prohepcidina	280
Eritropoyetina Tisular	287
Eritropoyetina Sérica	290
Hierro Tisular	291

SECCIÓN IV. DISCUSIÓN	294
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS ANIMALES	295
1. Eritropoyesis en el Modelo Murino de Anemia Hemolítica	296
2. Sobrecarga de Hierro	301
3. Modelo de Acople con Inducción de Sobrecarga de Hierro Seguida de Anemia Hemolítica.	303
CAPÍTULO II. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	307
Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	308
Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	310
Tejido Duodenal	311
Tejido Hepático	313
Tejido Esplénico	316
Conclusión	318
Prohepcidina en Sobrecarga de Fe	321
Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Sobrecarga de Fe	323
Tejido Duodenal	324
Tejido Hepático	325
Tejido Esplénico	326
Conclusión	327
Modelo de Acople: Inducción de Sobrecarga de Fe Seguida de Anemia Hemolítica	330
Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe	330

Transportador de Metales Divalentes 1 –DMT1- en Anemia con Sobrecarga de Fe	332
Tejido Duodenal	332
Tejido Hepático	333
Tejido Esplénico	334
Conclusión	335
CAPÍTULO III. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN	338
Anemia Hemolítica	339
Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	339
Transportador de Metales Divalentes 1 en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	342
Conclusión	345
Sobrecarga de Fe	348
Prohepcidina en Sobrecarga de Hierro	348
Transportador de Metales Divalentes 1 en Sobrecarga de Fe	350
Conclusión	352
Modelo de Acople: Inducción de Sobrecarga de Hierro Seguida de Anemia Hemolítica	354
Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe	354
Transportador de Metales Divalentes 1 en Anemia con Sobrecarga de Fe	356
Conclusión	357
Ratas Belgrade	360
Transportador de Metales Divalentes 1 en Ratas Belgrade	360
Prohepcidina en Ratas Belgrade	361
Eritropoyetina Tisular en Ratas Belgrade	362

Eritropoyetina Sérica en Ratas Belgrade	362
Conclusión	362
CONCLUSIONES	364
APÉNDICE	366
SECCIÓN V. REFERENCIAS	370
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ORIGINADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	384

Índice de Tablas

Tabla 1.	Parámetros Hematológicos en Ratones Anémicos y No Anémicos.	105
Tabla 2.	Peso del Bazo, Hígado y Riñón de Ratones Anémicos y No Anémicos.	108
Tabla 3	Cuantificación de Islotes Eritroblásticos en Tejido Esplénico, Hepático y Renal de Ratones Anémicos y No Anémicos.	111
Tabla 4.	Cuantificación de Islotes Eritroblásticos en Tejido Esplénico, Hepático y Renal de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril.	128
Tabla 5.	Semicuantificación de los depósitos de Fe de Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	138

Índice de Figuras y Diagramas

Figura 1.	Distribución de Hierro en el organismo.	18
Figura 2.	Mecanismo de absorción intestinal de Fe mediado por DMT1 y Ferroportina.	20
Figura 3.	Incorporación y transporte de Fe en hepatocitos.	25
Figura 4.	Regulación de la transcripción de hepcidina en deficiencia y sobrecarga de Fe.	29
Figura 5.	Regulación de la absorción de Fe por Hepsidina y Ferroportina	30
Figura 6.	Disección de órganos en ratón.	45
Figura 7.	Inmunohistoquímica con método de Polímero Conjugado	74
Figura 8.	Inmunohistoquímica con método indirecto en dos pasos	77
Figura 9.	Hemoglobina y Hematocrito de Ratones Anémicos y No Anémicos	99
Figura 10.	Recuento de Reticulocitos y Células con Cuerpos de Heinz de Ratones Anémicos y No Anémicos	100
Figura 11.	Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y Anémicos	101
Figura 12.	Extendidos sanguíneos de ratones No Anémicos y Anémicos.	104
Figura 13.	Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y Anémicos.	106
Figura 14.	Bazo, Hígado y Riñón de Ratones No Anémicos.	109
Figura 15.	Bazo, Hígado y Riñón de Ratones Anémicos	110
Figura 16.	Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones No Anémicos.	113
Figura 17.	Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones Anémicos.	114
Figura 18.	Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones Anémicos.	115
Figura 19.	Hemoglobina y Hematocrito de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril.	118
Figura 20.	Fórmula Leucocitaria de ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril.	119
Figura 21.	Bazo, Hígado y Riñón de ratones No Anémicos.	122
Figura 22.	Bazo de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril.	123

Figura 23.	Bazo de Ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril.	124
Figura 24.	Riñón de ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril.	125
Figura 25.	Hígado de ratones tratados con FHZ, con y sin Enalapril.	126
Figura 26.	Hemoglobina y Hematocrito de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	131
Figura 27.	Fórmula leucocitaria de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	132
Figura 28.	Hierro Plasmático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	133
Figura 29.	Mucosa de Ratones con Sobrecarga de Fe.	134
Figura 30.	Tinción de Perl's del Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	136
Figura 31.	Tinción de Perl's del Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	137
Figura 32.	Cuantificación de Fe Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe.	139
Figura 33.	Hemoglobina y Hematocrito de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	143
Figura 34.	Recuento de Reticulocitos de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	144
Figura 35.	Recuento de Células con Cuerpos de Heinz de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	145
Figura 36.	Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	146
Figura 37.	Eritropoyetina Plasmática de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	148
Figura 38.	Hierro Plasmático de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	150
Figura 39.	Cuantificación del Hierro Hepático en ratones Anémicos y con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	151
Figura 40.	Diagrama esquemático de la estructura del duodeno	154
Figura 41.	Expresión de DMT1 Duodenal.	156
Figura 42.	Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia.	157
Figura 43.	Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia.	158
Figura 44.	Expresión de DMT1 en criptas duodenales en Anemia.	159
Figura 45.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal en Anemia.	159
Figura 46.	Tinción de Perl's del Tejido Duodenal en Anemia.	160

Figura 47.	Diagrama esquemático de la estructura del hígado	161
Figura 48.	Expresión Hepática de DMT1.	163
Figura 49.	Expresión Hepática de DMT1 en Anemia.	164
Figura 50.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático en Anemia.	165
Figura 51.	Tinción de Perl's en Tejido Hepático en Condiciones Basales y en Anemia.	166
Figura 52.	Diagrama esquemático de la estructura del bazo	167
Figura 53.	Expresión Esplénica de DMT1.	169
Figura 54.	Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia.	170
Figura 55.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico en Anemia.	171
Figura 56.	Tinción de Perl's del Tejido Esplénico en condiciones Basales y en Anemia.	172
Figura 57.	Expresión Esplénica de DMT1 por Técnica de Doble Tinción.	173
Figura 58.	Expresión esplénica de DMT1 en Anemia por Técnica de Doble Tinción.	174
Figura 59.	Expresión de Prohepcidina Hepática.	176
Figura 60.	Expresión de Prohepcidina Hepática en Anemia.	177
Figura 61.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Hepático en Anemia.	178
Figura 62.	Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe.	180
Figura 63.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe.	181
Figura 64.	Tinción de Perl's del Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe.	182
Figura 65.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe.	184
Figura 66.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático en Sobrecarga de Fe	185
Figura 67.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	186
Figura 68.	Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe.	188
Figura 69.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico en Sobrecarga de Fe.	189
Figura 70.	Tinción de Perl's del Tejido Esplénico en Sobrecarga de Fe.	190

Figura 71.	Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	191
Figura 72.	Expresión de Prohepcidina Hepática en Sobrecarga de Fe.	193
Figura 73.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Hepático en Sobrecarga de Fe.	193
Figura 74.	Expresión de Prohepcidina Hepática en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	194
Figura 75.	Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia.	197
Figura 76.	Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia.	198
Figura 77.	Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia.	199
Figura 78.	Tinción de Perl's del Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia.	200
Figura 79.	Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe	200
Figura 80.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal.	201
Figura 81.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	204
Figura 82.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción.	205
Figura 83.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia	206
Figura 84.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción.	207
Figura 85.	Expresión Hepática de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe.	208
Figura 86.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe.	209
Figura 87.	Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	209
Figura 88.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático.	210
Figura 89.	Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	213
Figura 90.	Expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción.	214
Figura 91.	Expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	215
Figura 92.	Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe.	216
Figura 93.	Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción.	217
Figura 94.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico.	218

Figura 95.	Expresión Hepática de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción.	221
Figura 96.	Diagrama esquemático de la estructura del riñón	223
Figura 97.	Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones No Anémicos.	227
Figura 98.	Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones Anémicos.	228
Figura 99.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones No Anémicos.	229
Figura 100.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos.	230
Figura 101.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos.	231
Figura 102.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Externa de Ratones Anémicos y No Anémicos.	232
Figura 103.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal en Anemia.	233
Figura 104.	Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones No Anémicos.	236
Figura 105.	Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones Anémicos.	237
Figura 106.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratones No Anémicos.	238
Figura 107.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos.	239
Figura 108.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratones Anémicos y No Anémicos.	240
Figura 109.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal en Anemia.	241
Figura 110.	Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratones No Anémicos.	243
Figura 111.	Tinción de Perl's de Corteza Renal de Ratones Anémicos.	244
Figura 112.	Tinción de Perl's de Médula Renal de Ratones Anémicos.	244
Figura 113.	Cuantificación del Fe Renal en Tejido de ratones Anémicos y No anémicos.	245
Figura 114.	Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe.	247
Figura 115.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Externa de Ratones con Sobrecarga de Fe.	248
Figura 116.	Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones con Sobrecarga de Fe.	249
Figura 117.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal con Sobrecarga de Fe.	250
Figura 118.	Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe.	252

Figura 119.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratones con Sobrecarga de Fe.	253
Figura 120.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe.	254
Figura 121.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal con Sobrecarga de Fe.	255
Figura 122.	Tinción de Perl's en Tejido Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe	256
Figura 123.	Expresión Cortical Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	260
Figura 124.	Expresión Medular Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	262
Figura 125.	Expresión Cortical Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe.	262
Figura 126.	Expresión Medular Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe.	263
Figura 127.	Expresión Cortical renal de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe.	264
Figura 128.	Expresión Medular Renal de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe.	265
Figura 129.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal.	266
Figura 130.	Expresión Cortical Renal de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	269
Figura 131.	Expresión Medular Renal de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	270
Figura 132.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal.	271
Figura 133.	Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.	273
Figura 134.	Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas.	276
Figura 135.	Expresión de DMT1 en Médula Externa de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas.	277
Figura 136.	Expresión de DMT1 en Médula Interna de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas.	278
Figura 137.	Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal de Ratas Belgrade.	279
Figura 138.	Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas.	282
Figura 139.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas.	283
Figura 140.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratas Belgrade Heterocigotas.	284
Figura 141.	Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratas Belgrade Homocigotas.	285
Figura 142.	Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal de Ratas Belgrade.	286

Figura 143.	Expresión de Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas.	288
Figura 144.	Expresión de Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade Homocigotas.	288
Figura 145.	Control Negativo para Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade.	289
Figura 146.	Eritropoyetina Sérica de Ratas Belgrade Homocigotas y Heterocigotas.	290
Figura 147.	Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas	292
Figura 148.	Tinción de Perl's del Tejido renal de Ratas Belgrade Homocigotas	293
Diagrama 1.	Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Anemia Hemolítica	320
Diagrama 2.	Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Sobrecarga de Fe	329
Diagrama 3.	Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Anemia con Sobrecarga de Fe	337
Diagrama 4.	Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Anemia Hemolítica	347
Diagrama 5.	Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Sobrecarga de Fe	353
Diagrama 6.	Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Anemia con Sobrecarga de Fe	359
Diagrama 7.	Regulación de la expresión renal de DMT1, Hecpidina y Epo en ratas Belgrade homocigotas	363

ABREVIATURAS

Hb	Hemoglobina
HCT	Hematocrito
Epo	Eritropoyetina
Epo-R	Receptor de Eritropoyetina
ELISA	Enzimoinmunoanálisis
Fe	Hierro
Fe 3+	Hierro férrico
Fe 2+	Hierro Ferroso
i.p.	Intraperitoneal
VCM	Volumen Corpuscular Medio
HCM	Hemoglobina Corpuscular media
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
ER	Eritrocitos
rpm	Revoluciones por minuto
FeCl ₃	Cloruro Férrico
HCl	Ácido Clorhídrico
NaOH	Hidróxido de Sodio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
PBS	Buffer Fosfato Salino
IgG	Inmunoglobulina G
DAB	Diaminobenzidina
HRP	Peroxidasa del Rábano
n	Número de unidades experimentales
SD	Desvío estándar
α	Nivel de significación
ANOVA	Análisis de Varianza
ROS	Especies de Oxígeno Reactivas
ATP	Adenosina Trifosfato
SRE	Sistema Retículo Endotelial
NaCl	Cloruro de Sodio
RAA	Renina-Angiotensina-Aldosterona
FHZ	Fenilhidrazina
Tf	Transferrina
RTf1	Receptor de Transferrina 1
RTf2	Receptor de Transferrina 2
Tf-Diférrica	Transferrina Diférrica
NTBI	Hierro no Unido a Tranferrina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Usf2	Upstream Stimulatory Factor
HFE	Proteína de la Hemocromatosis
HJV	Hemojuvelina
HJVs	Hemojuvelina soluble
HIF-1	Factor Inducible por Hipoxia

HRE	Elemento de Respuesta a la Hipoxia
IRE	Elemento de Respuesta al Hierro
IRP	Proteína Reguladora de Hierro
BMP	Proteína Morfogenética Ósea
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
DMT1	Transportador de Metales Divalentes 1
NRAMP2	Proteína 2 de Resistencia Natural Asociada a Macrófagos
FPN	Ferroportina
KDa	Kilodaltons
GSH	Glutación
AA	Aminoácidos
IL-6	Interleuquina 6
µg	Microgramos
pg	Picogramos
µmol	Micromol
b/b	Homocigota
b/+	Heterocigota

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN

El Hierro (Fe) es un nutriente esencial para el crecimiento y función de las células de los mamíferos. Las alteraciones del metabolismo del Fe, tanto la deficiencia como la sobrecarga, revisten importancia médica y son responsables de la disminución de las expectativas de vida. Su homeostasis depende de señales que comunican los sitios de consumo, utilización y almacenamiento.

El conocimiento de las proteínas que regulan la homeostasis del Fe y su desregulación, ha tenido importantes avances en las últimas décadas (Donovan A et al., 2006). El principal hallazgo fue la identificación de Hepsidina, proteína que adquirió relevancia como señal soluble que comunica al epitelio intestinal los requerimientos del Fe.

Cuando aumenta la actividad eritropoyética, en respuesta al estímulo hipóxico, se requiere gran aporte de Fe como mecanismo adaptativo que restaura el eritrón. Mediante este mecanismo, las células absortivas intestinales detectan las necesidades del Fe del organismo y son programadas para expresar apropiados niveles de proteínas transportadoras (Latunde-Dada GO et al., 2006).

Los enterocitos obtienen la información de reguladores específicos que comunican las necesidades del Fe como: a) Regulador de Depósito, que modula la reabsorción en función del Fe de reserva; b) Regulador de la Dieta, que influye en la reabsorción independientemente de ambos reguladores; c) Regulador Eritroide, que depende de la demanda eritrocítica y ajusta la reabsorción intestinal en forma independiente del Fe de depósito.

La trascendencia del Regulador de Depósito se debe al hallazgo de un desorden hereditario originado por la mutación del gen HFE, la hemocromatosis (HH), que presenta absorción excesiva de Fe respecto al estado de los depósitos del metal, lo que sugirió que el control de dicho regulador está alterado (Fleming RE et al., 2006).

La anemia de las enfermedades crónicas (AEC) es otra patología que cursa con alteración de la homeostasis del Fe. Tiene un origen multifactorial y se manifiesta en estados de infección, inflamación, artritis o cáncer. En la anemia de las enfermedades crónicas los niveles plasmáticos de Fe son bajos, los depósitos del Sistema Retículo Endotelial (SRE) son altos y la absorción intestinal está disminuída.

Un aspecto común de ambas patologías, es la alteración de la comunicación entre los sitios de depósito (SRE y hepatocitos) y el sitio de captación (enterocitos).

Hasta el presente, las vías de comunicación entre estos sitios han sido un misterio en este campo del conocimiento y aún no se han dilucidado totalmente.

En este contexto, los mayores esfuerzos se centraron en explicar cómo se informan los requerimientos de Fe a los tejidos del organismo. Dilucidar el origen de esta señal ha sido un aspecto central para el estudio de enfermedades asociadas a alteraciones del metabolismo del Fe.

Los avances en el conocimiento de mecanismos involucrados en la acción de moléculas claves de la homeostasis del Fe, contribuirá a comprender la etiopatología de algunas enfermedades asociadas a desórdenes que afectan la eritropoyesis.

El mejor conocimiento de las relaciones funcionales de Hepsidina con Eritropoyetina, contribuirá a profundizar el estudio de las bases moleculares de desórdenes del Fe, en patologías con compromiso del eritrón.

La eritropoyesis, proceso por el cual se sintetizan las células sanguíneas que luego se vierten a la circulación, es un sistema de renovación continua porque sus elementos celulares tienen vida media limitada, por lo que deben ser reemplazados constantemente. La eritropoyesis es regulada por mecanismos que operan aumentando su producción cuando disminuye el número de eritrocitos o se reduce su formación.

La eritropoyesis depende de la interacción de múltiples citoquinas y factores de crecimiento, siendo la Eritropoyetina (Epo) el principal factor regulador de la mitogénesis y diferenciación de progenitores eritroides, y un conocido modulador de la apoptosis de dichos precursores (Metcalf D et al., 1998; Sawyer ST et al., 1994). Como es sabido, la Eritropoyetina es una hormona sintetizada principalmente por las células intersticiales del túbulo renal, aunque en menor medida en tejidos extrarrenales como hígado y cerebro (Koury St et al., 1988; Fried W et al., 1972; Maxwell PH et al., 1977).

La clonación del gen de la Epo y de su receptor (Epo-R) fue de gran importancia para comprender la funcionalidad de este factor regulador y su participación en la proliferación y diferenciación eritroide (Jacobs K et al., 1985; D'Andrea AD et al., 1989). El rol crucial de Epo y su receptor en la supervivencia de ratones homocigotos para una delección del gen de Epo o su receptor, se confirmó por la temprana muerte de estos animales (Lin CS 1996, Wu H1999).

Se ha propuesto que la vía de señalización intracelular de la Epo comienza con la unión de una molécula de Epo a dos Epo-R, formando un homodímero. Posteriormente

se produce la fosforilación de residuos tirosina del Epo-R y de otras proteínas, por la tirosina kinasa JAK-2, llevando a la activación de diversos procesos metabólicos. Entre ellos se produce el aumento en la transcripción de los genes α y β de las cadenas de globina, el aumento de la síntesis de Hemoglobina y del Receptor de Transferrina (RTf) (Watowich SS et al., 1992; Witthuhn BA et al., 1993).

La regulación de la síntesis de Epo ha sido ampliamente estudiada, y se han descrito diversos estímulos capaces de modular la expresión del gen (Ebert BL et al., 1999). Sin embargo, es sabido que la presión parcial de oxígeno es el principal regulador de los niveles de este factor eritropoyético.

A nivel molecular, uno de los elementos más importantes en respuesta a la hipoxia es el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), un heterodímero constituido por una subunidad nuclear llamada HIF- β y tres subunidades citosólicas regulatorias llamadas HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , cuya expresión es regulada post-transcripcionalmente (Gu YZ et al., 1998; Semenza GL et al., 2001).

En presencia de oxígeno, las subunidades regulatorias α son modificadas por una prolin-hidroxilasa dependiente de Fe (PHD) y degradadas mediante su interacción con la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (VHL). Por el contrario, en condiciones de hipoxia la actividad de PHD es inhibida, lo que permite la acumulación de las subunidades regulatorias α y su traslocación al núcleo, favoreciendo la formación del complejo HIF- α /HIF- β . Finalmente, este complejo se une a elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) presentes en secuencias regulatorias del gen de la Epo, favoreciendo la transcripción del gen (Carole Peyssonnaud AS et al., 2007). De esta forma, se explica el mecanismo de retroalimentación negativa existente entre los niveles de oxígeno y la Eritropoyetina.

Debido a la importancia que revisten los niveles de oxígeno sobre la eritropoyesis, una disminución en el número de eritrocitos se asocia con un estado de hipoxia temporal, induciendo un aumento en los niveles de Epo y un incremento en la actividad eritropoyética. En este contexto, la presencia de un estado anémico generado por excesiva hemólisis es un claro ejemplo de modulación de la eritropoyesis (Roque ME et al., 2008).

La acción hemolizante de las arilhidrazinas, tales como la Fenilhidrazina (FHZ) ha sido ampliamente estudiada (Kinuta M et al., 1995; Jain SK et al., 1980; Roque ME et

al., 2008). En este sentido, Roque M et al (2008) han caracterizado profundamente al eritrón en la crisis hemolítica inducida por FHZ y en la etapa de regeneración.

El mecanismo de acción de estos hemotóxicos consiste básicamente en el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), la peroxidación lipídica y la disminución de los niveles de Glutación (GSH) (Berger J, 2007). En este sentido, la producción de ROS favorece la oxidación de la Hemoglobina a Metahemoglobina, que posteriormente es convertida en hemicromos reversibles. Estos intermediarios son capaces de convertirse en hemicromos irreversibles, quienes favorecen la desnaturalización y precipitación de la Hemoglobina sobre la membrana celular en forma de Cuerpos de Heinz (Rifkind RA, 1965; Rifkind RA et al., 1965). Además del daño proteico y la peroxidación lipídica se producen otras alteraciones tales como depleción de glutación y ATP, desbalance catiónico y deformabilidad de la membrana celular (McMillan DJ et al., 1998).

La hemólisis inducida por Fenilhidrazina está asociada, por un lado, a los cambios en la deformabilidad de la membrana eritrocitaria, lo que favorece la captación de los hematíes por macrófagos del bazo, y la posterior traslocación de fosfatidil-serina (PS) desde la membrana plasmática interna hacia la externa, constituyendo esto una señal para la fagocitosis macrofágica (Berger J, 2007). Por otro lado, también se ha postulado que la hemólisis inducida por FHZ está asociada con un mecanismo inmunológico en el que la droga favorece la exposición del antígeno senescente eritrocitario, causando la unión de anticuerpos autólogos circulantes (Naughton BA et al., 1990). Finalmente, el reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo por macrófagos conduciría a la fagocitosis y destrucción eritrocitaria (Magnani M et al., 1986).

En este sentido, es ampliamente conocido que el bazo desempeña un rol clave en diversos procesos inmunológicos, y que actúa como el principal órgano eritrofagocítico en la Anemia inducida por Fenilhidrazina en roedores y mamíferos (Latunde-Dada GO et al., 2006; Roque M et al., 2008). Esto implica que las células dañadas son removidas intactas por el bazo, primando el proceso de hemólisis extravascular por sobre la hemólisis intravascular.

Por otro lado, ha sido reportado que en ratones adultos la respuesta regenerativa eritroide en la hemólisis inducida por FHZ es llevada a cabo principalmente por el bazo (Kozlov VA et al., 1980; Roque M et al., 2008). En este sentido, Roque M et al (2008) han evidenciado hiperplasia eritroide en bazo de ratones tratados con FHZ y elevado

recuento de Islotes Eritroblásticos, sugiriendo marcada actividad eritropoyética esplénica. Asimismo, se ha reportado que la restauración de la eritropoyesis depende de la acción coordinada de diversos tejidos ya que existen evidencias sobre el compromiso de órganos eritropoyéticos extramedulares como hígado y riñón (Roque M et al., 2008).

Se ha determinado que bajo estímulo eritropoyético las células pluripotenciales proliferan y migran desde la médula ósea al bazo, un hallazgo avalado por estudios que evidencian precursores eritroides en sangre periférica de animales tratados con FHZ (Rencricca NJ et al., 1970; Hara H et al., 1976; Hara H et al., 1977).

En este sentido, la presencia de abundantes reticulocitos en sangre periférica es un claro indicador de la intensa actividad eritropoyética. Los reticulocitos son precursores eritroides inmaduros, anucleados, pero capaces de transportar Hb, de modo que la presencia de gran número de reticulocitos en circulación periférica es un índice de la actividad de la médula ósea (Murro H et al., 1989).

Sin embargo, es importante mencionar que aunque la eritropoyesis murina ha servido ampliamente para el estudio de la eritropoyesis humana, existen diferencias entre ambas especies, ya que en el humano el bazo no desempeña un rol significativo en la eritropoyesis.

Además de la hemólisis, se han descrito otros factores que modulan la proliferación eritroide ya sea actuando sobre progenitores eritroides a través de vías directas o indirectas. En este contexto, la Angiotensina II ha sido propuesta como un factor mitogénico capaz de incrementar los niveles de Epo indirectamente (Mrug M et al., 1997). Por otro lado, la presencia de receptores para Angiotensina II en progenitores hemopoyéticos y en células estromales de médula ósea, sugiere la regulación de la eritropoyesis mediada por el Sistema Renina Angiotensina (Rodgers KE et al., 2000).

Otros estudios han demostrado inhibición de la eritropoyesis utilizando drogas que inhiben la síntesis de Angiotensina II (Kamper AL et al., 1990; Veuthey T et al., 2008). Se ha descrito una respuesta reducida a la terapia con Epo en pacientes con hemodiálisis crónica tratados con Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) (Albitar S et al., 1998). Asimismo, el incremento en la apoptosis de células progenitoras y una disminución en el hematocrito han sido también asociados a la administración de IECA (Glezerman I et al., 2003). Recientemente se ha reportado un retraso en la recuperación de la Anemia en ratones tratados con un inhibidor de ECA,

destacando el rol de la Angiotensina II en la eritropoyesis (Veuthey T et al., 2008). Por otro lado, se ha descrito que la restauración de la volemia post-hemólisis en animales tratados con IECA es llevada a cabo principalmente por el bazo, evidenciando además compromiso del tejido renal (Veuthey T et al., 2008).

Aunque el mecanismo de los IECA aún no está claro, se han propuesto varias hipótesis (Graafland AD et al., 1992; Macdougall IC et al., 1999). Entre ellas, Graafland AD et al (1992) reportaron que la inhibición de la ECA podría incrementar del flujo sanguíneo renal y disminuir así los niveles de Epo.

Como es ampliamente conocido, el Fe es un nutriente esencial para la eritropoyesis, de modo que su balance se halla estrictamente regulado en el organismo, favoreciendo la absorción del metal pero evitando la toxicidad que podrían causar sus elevados niveles.

Existen dos formas de Fe proveniente de la dieta capaces de ser absorbidos: el Fe Hemo, que se halla principalmente en las carnes rojas y que es de fácil absorción; y el Fe libre o No-Hemo, que se encuentra fundamentalmente en los vegetales, y cuya absorción es algo más difícil.

Una vez absorbido el metal, su circulación y distribución en el organismo constituye un ciclo muy eficiente y prácticamente cerrado (Figura 1). Dado que el cuerpo carece de mecanismos específicos para la excreción del metal, sólo una pequeña proporción es eliminada, principalmente por descamación de la mucosa del epitelio intestinal. Por este motivo, la necesidad diaria de incorporación de Fe en un individuo es muy baja, de modo que sólo una pequeña cantidad del Fe ingerido es absorbido (aproximadamente el 10 %) (Perez G et al., 2005).

Una vez absorbido, este nutriente alcanza la circulación sanguínea, se une a la Transferrina plasmática y así es distribuido en el organismo formando parte de dos grandes compartimentos. La mayor parte del Fe constituye el compartimento de Fe Funcional (80-85 %), que incluye el Fe utilizado por la médula ósea para la eritropoyesis como así también el Fe necesario para la síntesis de Mioglobina y otros procesos celulares que requieren del metal. El resto del Fe absorbido forma parte del Fe de Depósito, el cual constituye la reserva corporal del metal. Este Fe se distribuye entre el parénquima hepático, donde reside aproximadamente el 60% del Fe de reserva, y el

Sistema Retículo Endotelial Esplénico donde se localiza el otro 40% (Jimenez R et al., 2005).

Es importante destacar que mientras el Fe depositado en el hígado proviene principalmente del Fe absorbido, el SRE capta el metal proveniente no sólo de la absorción intestinal sino que además incorpora Fe procedente de la destrucción eritrocitaria, sea esta fisiológica o patológica. Finalmente, para completar el ciclo cabe mencionar que gran parte del Fe perteneciente al compartimento de Depósito es liberado a la circulación para su transporte a través de la Transferrina y su posterior utilización.

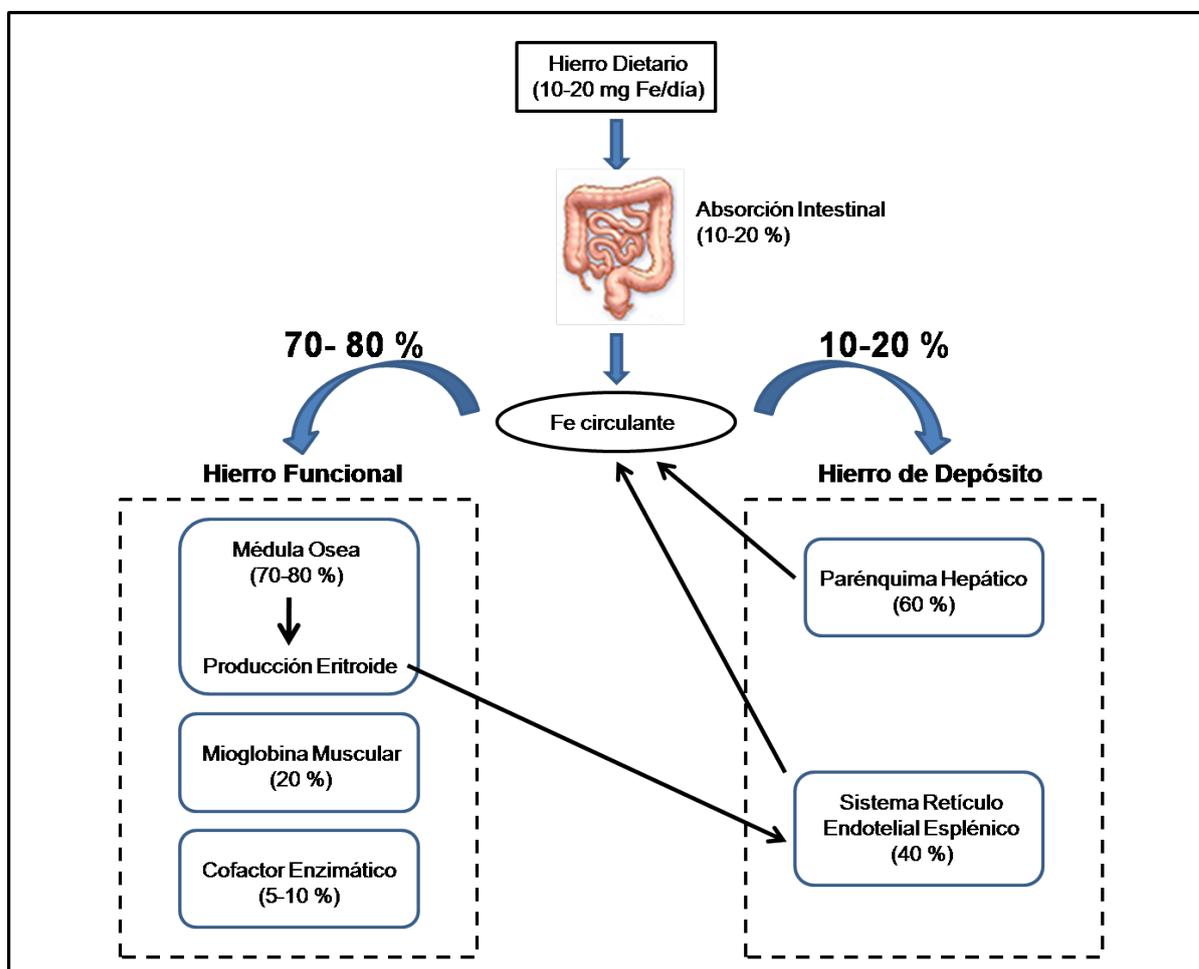


Figura 1. Distribución de Hierro en el organismo.

Por lo descrito anteriormente, el balance de Fe del organismo se halla finamente regulado por complejos mecanismos, para satisfacer las demandas del nutriente evitando la toxicidad que podrían causar elevados niveles de Fe.

En este sentido, la regulación de los niveles de Fe depende básicamente de tres reguladores (Andrews N, 2000). Uno de ellos es el *Regulador Dietario*, quien modula la absorción de Fe a nivel intestinal, siendo más efectiva en los enterocitos duodenales. En este sentido, se ha determinado que tras la administración de una dosis importante de Fe por vía oral, el intestino disminuye la captación del mismo.

Otro miembro de este mecanismo es el *Regulador de Depósito*, quien responde a las reservas de Fe del organismo y que posiblemente también actúe a nivel duodenal. Se postula que frente a disminuciones en el contenido de Fe almacenado en el cuerpo, el regulador de depósito incrementa la captación del nutriente hasta que las reservas son repletas nuevamente. Por el contrario, cuando las reservas son excesivas, este regulador reduce la absorción intestinal de Fe. Se ha postulado que este regulador opera mediante la programación de enterocitos inmaduros de las criptas duodenales para favorecer o no la absorción de Fe, mecanismo que sería sensible a cambios en la saturación de la Transferrina.

El tercer componente es el *Regulador Eritroide*, quien transmitiría a los enterocitos las demandas eritroides del organismo, de manera tal que la absorción intestinal de Fe sería regulada positivamente cuanto mayor Fe sea requerido para la actividad eritropoyética. Se ha descrito que este regulador posee mayor eficacia para estimular la absorción duodenal de Fe que el Regulador de Depósito. Además, aunque aún no se ha dilucidado completamente el mecanismo por el que el regulador eritroide informa al duodeno las demandas de Fe, se postula que diversos factores solubles serían transportados hasta el intestino actuando como mediadores (Nicolas G et al., 2002b).

Como es ampliamente conocido, la absorción de Fe se produce en el intestino delgado, principalmente a nivel duodenal. Sin embargo, ambas formas de Fe dietario poseen mecanismos diferentes de incorporación.

La absorción del Fe hemo comienza con su liberación desde la Mioglobina y Hemoglobina por acción de enzimas pancreáticas. Posteriormente, se produce la traslocación del metal como una metalo-porfirina, desde la luz intestinal hacia el citoplasma del enterocito mediante un transportador presente en la membrana apical duodenal, llamado Heme Carrier Protein 1 (HCP1) (Uzel C et al., 1998; Worthington MT et al., 2001). Una vez en el interior celular, el grupo Fe inorgánico es separado del grupo Hemo, quien es degradado por la Hemooxigenasa. Aunque no se conocen con exactitud

el resto de los mecanismos involucrados, se han descrito dos proteínas capaces de exportar el metal desde los enterocitos llamadas Bcrp y FLVCR, aunque sus roles específicos aun no han sido esclarecidos (Shayeghi M et al., 2005) (Figura 2).

La absorción del Fe no-hemo o Fe libre está mejor dilucidada. Es sabido que la mayor parte del Fe dietario libre se halla en su forma férrica, forma insoluble a pH mayor de 3, de modo que su absorción es algo más compleja. Para favorecer la absorción de este metal, en el estómago se forman complejos solubles de Fe que aumentan su biodisponibilidad para ser absorbidos en el duodeno (Pérez G et al., 2005). De esta manera, el Fe en estado férrico sería incorporado al interior de los enterocitos mediante la proteína $\beta 3$ -integrina, y posteriormente transferido a la proteína chaperona Mobilferrina (Conrad ME et al., 1993). Debido a que Mobilferrina ha sido aislada en asociación con $\beta 3$ -integrina, flavin monooxigenasa y $\beta 2$ -microglobulina, se postula que este complejo proteico de alto peso molecular llamado Paraferitina transportaría el Fe a través de los enterocitos (Umbreit JN et al., 1996) (Figura 2).

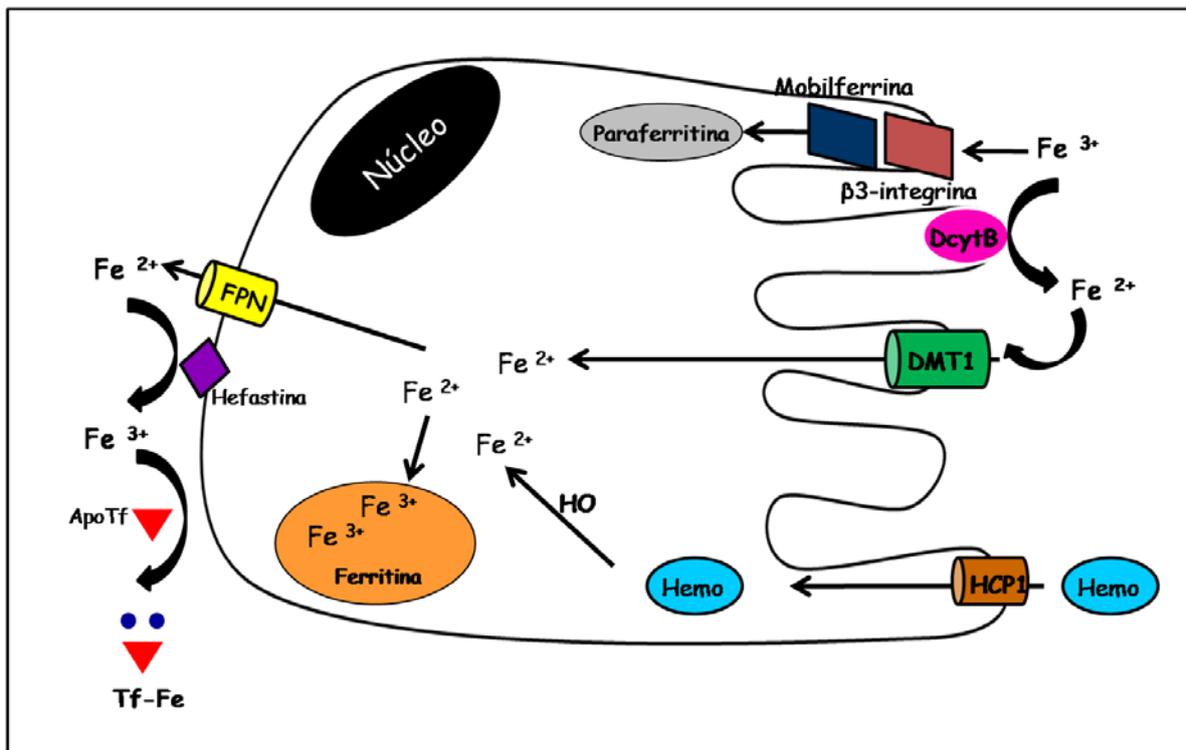


Figura 2. Mecanismo de absorción intestinal de Fe mediado por DMT1 y Ferroportina.

Sin embargo, gran parte del Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} para permitir su absorción a nivel duodenal. Este proceso es llevado a cabo por una ferrireductasa localizada en la membrana apical celular del enterocito conocida como Citocromo Duodenal B (DcytB) (McKie AT et al., 2001). Aunque se ha descrito una regulación positiva de DcytB en condiciones de deprivación de Fe (Collins JF, 2005), algunos autores postulan que este reductor no sería fundamental para la absorción de Fe^{2+} , ya que tal vez no sería la única ferrireductasa intestinal (Mackenzie B 2005) (Figura 2).

Una vez que el Fe se ha reducido, ingresa al los enterocitos a través del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1), también conocido como DCT1 (Transportador de Cationes Divalentes 1) ó NRAMP2 (Proteína 2 de Resistencia Natural Asociada a Macrófagos) (Gunshin H et al., 1997).

El transportador DMT1 tiene un peso molecular de 70-90 KDa según el estado de glicosilación y se encuentra anclado a la membrana celular a través de 12 residuos transmembrana. En el cuarto segmento extracelular presenta dos sitios de glicosilación, mientras que el cuarto segmento intracelular posee un motivo asociado a su función de transporte. Es conocida su capacidad de transportar diversos metales divalentes como el Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ; como así también la estrecha relación que posee su actividad con el pH del medio (Gunshin H et al., 1997). Se ha postulado que su actividad óptima ocurre a pH ácidos entre 5,5 y 6,5, aunque también se evidenció actividad del transportador a pH alrededor de 7. No menos importante es su actividad acoplada al cotransporte de H^+ , lo que favorece aun más la acidez del medio necesaria para la actividad de la proteína (Gunshin H et al., 1997).

Cabe destacar que se ha establecido que por corte alternativo en el extremo 3' del gen de DMT1 se producen dos isoformas del ARNm de la proteína: la Isoforma I, caracterizada por la presencia de un Elemento de Respuesta al Hierro (IRE), y la Isoforma II carente de dicho elemento (Lee PL et al., 1998). Las secuencias IRE se hallan altamente conservadas en la evolución y forman un loop en la región no codificante del ARN, que interacciona con alta afinidad con una proteína citoplasmática llamada Proteína Reguladora de Hierro (IRP).

Debido a que la unión de IRE con IRP varía en función de la disponibilidad de Fe, la presencia de una secuencia IRE en el ARNm del Transportador de Metales Divalentes 1 resulta de gran relevancia ya que sugiere que la regulación de su expresión sería

dependiente de los niveles de Fe del organismo (Wallander ML et al., 2006; Muckenthaler MU et al., 2008). En este sentido, la regulación de la expresión de DMT1 sería similar a la regulación del RTf. Se ha sugerido que frente a deficiencias de Fe la presencia de una secuencia IRE en el extremo 3' del ARNm de DMT1 se uniría a IRP, favoreciendo la estabilización del transcrito y la transcripción de la proteína (Gunshin H et al., 1997; Oates PS et al., 2000).

Una vez que el Fe^{2+} ha alcanzado el interior del enterocito puede ser oxidado nuevamente a estado férrico para su almacenamiento en forma de Ferritina. Ferritina es una proteína ubicua, aunque altamente expresada en hígado y bazo, con conocida capacidad de almacenar Fe ya que puede incorporar hasta 4500 átomos de Fe en su interior. Posee un peso molecular de 430-460 KDa y presenta una cadena liviana (L) y una cadena pesada (H). Se ha establecido que la cadena H incorpora Fe a una tasa mucho mayor que la cadena L, y esta diferencia podría deberse a la presencia de una ferroxidasa central asociada a la cadena H, que promovería la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Ponka P, 1990).

Por otro lado, el Fe^{2+} que no forma parte de los depósitos es oxidado a Fe^{3+} por la proteína Hefastina y posteriormente exportado hacia el compartimento extracelular a través del transportador Ferroportina, también llamado Ireg 1 ó MTP1 (Abboud and Haile 2000; Donovan et al. 2000; McKie et al. 2000; D'Anna MC et al., 2009). Similar a DMT1, el ARNm de Ferroportina contiene un Elemento de Respuesta al Hierro (IRE) en el extremo 5', indicado que la expresión de la proteína podría depender de los niveles de Fe (Lymboussaki A et al., 2003). Sin embargo, otros estudios han reportado diferencias tejido-específicas en la regulación del gen (Wessling-Resnick M, 2006).

Es conocida la capacidad que posee el Fe para generar radicales libres mediante la reacción de Haber-Weiss (Emerit J et al., 2001, Fraga CG et al., 2002). Por este motivo, una vez que es exportado de las células no puede circular en forma libre, sino que es asociado a la proteína sérica Transferrina (Tf) formando el complejo Fe-Tf. Esta proteína posee 2 residuos homólogos cuyo ligando natural es el Fe^{3+} y cuya unión es pH dependiente, siendo mayor la afinidad por el metal a pH cercanos a 7 (Ponka P, 1990). En condiciones de balance normal de Fe, sólo el 30 % de la Transferrina se halla saturada con el metal, por lo que el 70 % restante actúa como mecanismo protector capaz de captar los excesos de Fe, evitando la toxicidad que estos podrían generar

(Ponka P, 1990). Sin embargo, es sabido que en situaciones de marcada sobrecarga de Fe, la capacidad de saturación de la Transferrina puede alcanzar su máximo nivel, situación en la que el metal puede unirse a ligandos como el citrato constituyendo el Hierro no Unido a Transferrina (NTBI) (Pérez G et al., 2005)

El complejo Fe-Tf es el encargado de transportar el Fe entre los sitios de absorción, almacenamiento y utilización, siendo el hígado uno de los órganos más importantes. La vía de captación celular de Fe-Tf en hígado mediada por el Receptor de Transferrina 1 (RTf1) es una de las más conocidas (Figura 3). Este receptor es una glicoproteína homodimérica de expresión ubicua, aunque expresada principalmente en el hígado, cuyos niveles son regulados post-transcripcionalmente por la interacción IRE-IRP en el ARNm (Pérez G et al., 2005). Se ha propuesto además una interacción del RTf1 con HFE, una proteína similar al complejo mayor de histocompatibilidad, compitiendo ésta con la Tf por el sitio de unión al RTf1 (Giannetti AM et al., 2004, Ouyang Q et al., 1993). Sin embargo, dado que su afinidad por el RTf1 sería menor que la que posee la Transferrina, aún no se conocen con exactitud las consecuencias fisiológicas de esta unión (West AP et al., 2001).

Al pH del fluido extracelular el RTf1 posee gran afinidad por la Transferrina diférrica, formándose un complejo RTf1-Tf-Fe que es endocitado formando un endosoma. Posteriormente se produce una acidificación en el interior del endosoma, lo que disminuye la afinidad de la Tf por el Fe, liberándose el metal y quedando Apotransferrina. Asimismo, este cambio en el pH incrementa la afinidad del RTf1 por la Apotransferrina, complejo que retorna a la membrana plasmática fusionándose con ella.

El Fe liberado en el interior endosomal se encuentra en estado férrico, sin embargo es sabido que previo a la liberación del metal al citoplasma celular se produce la reducción del mismo. Recientes evidencias postulan que el producto proteico del gen STEAP3 sería la ferrireductasa endosomal encargada de transformar el Fe³⁺ en Fe²⁺ (Graham RM et al., 2007). Una vez que es reducido el metal, este sería exportado desde el endosoma mediante DMT1, conocido por su localización en la membrana de endosomas y lisosomas (Gruenheid S et al., 1999; Tabuchi M et al., 2000) (Figura 3).

Finalmente, una vez que el Fe ha alcanzado el citoplasma celular, este puede formar parte de los depósitos del metal a través de su unión a Ferritina (en estado férrico), o bien puede ser exportado de las células en estado ferroso mediante Ferroportina.

Posteriormente es oxidado por la Ceruloplasmina y acopado nuevamente a la Transferrina, permitiendo así su circulación por el torrente sanguíneo (Graham RM et al., 2007).

Aunque la captación celular de Fe unido a Transferrina mediada por RTf1 es la más conocida, en los últimos años se ha descrito una segunda ruta de ingreso del Fe al interior celular que involucra el Receptor de Transferrina 2 (RTf2) (Kawabata H et al., 1999) (Figura 3). Esta proteína se expresa en diversos tejidos aunque principalmente en el hígado, y posee 45 % de homología con el clásico RTf1, aunque su capacidad de unión a la Tf-Fe es 25 veces menor, siendo también pH dependiente (West AP et al., 2000). A diferencia del RTf1, el RTf2 no posee elemento de Respuesta al Hierro (IRE), de modo que los niveles celulares de Fe no parecerían regular cambios en la expresión de la proteína. Sin embargo se ha propuesto que sus niveles serían regulados post-traduccionalmente por la Transferrina diférrica, de modo que la unión del ligando estabilizaría al receptor (Robb A et al., 2004).

Por otro lado, cabe destacar que el hígado es uno de los órganos más importantes en la captación de NTBI, evitando la toxicidad que éste podría causar debido al escaso control de su actividad redox (Craven CM et al., 1987; Britton RS 2002). Según trabajos recientes, la captación de NTBI parecería estar mediada por el Transportador de Metales Divalentes 1, conocido importador de Fe (Shindo M et al., 2006). Sin embargo, también se ha descrito la posible participación de una proteína transmembrana llamada ZIP14, altamente expresada en hígado (Liuzzi JP et al., 2006) (Figura 3). Las proteínas ZIP pertenecen a una super familia de proteínas, donde ZIP14 inicialmente ha sido involucrada en el transporte de zinc desde la membrana plasmática u organelas celulares hacia el citosol (Liuzzi JP et al., 2004). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la supresión de la expresión de ZIP14 reduce fuertemente la captación de NTBI, destacando el rol de esta proteína en el balance del Fe (Liuzzi JP et al., 2006).

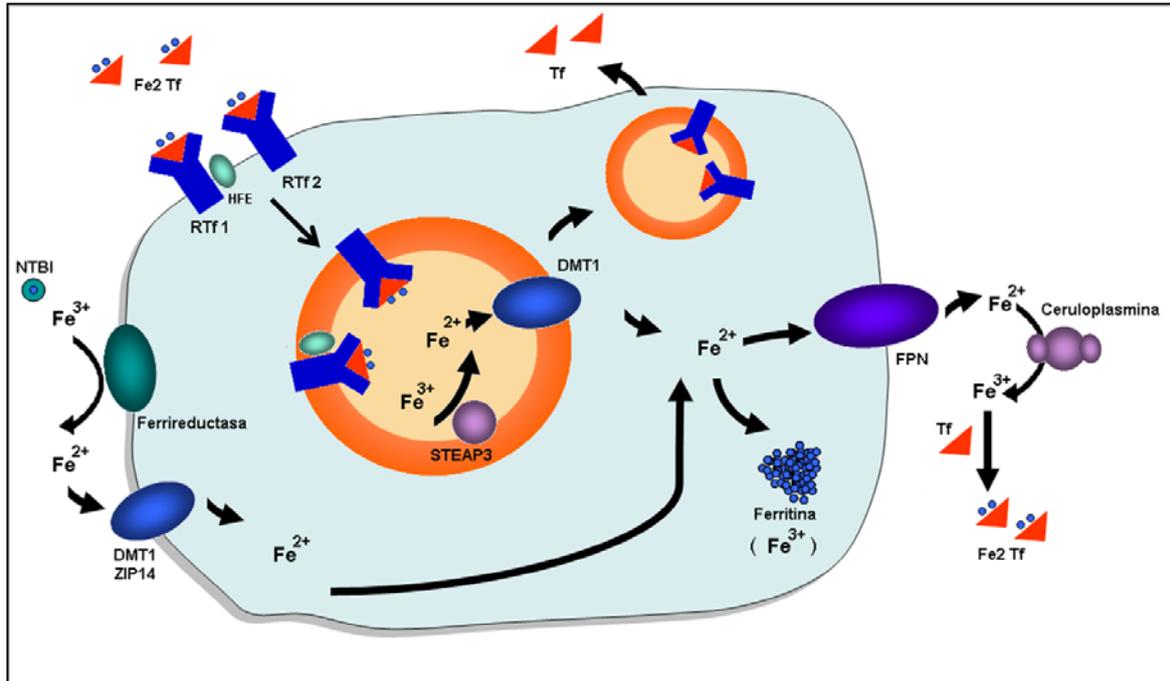


Figura 3. Incorporación y transporte de Fe en hepatocitos.

Si bien los hepatocitos son conocidos por su participación en la captación y almacenamiento del Fe, un sitio clave para la captación y reutilización del Fe es el Sistema Retículo Endotelial, formado por macrófagos especializados, presentes principalmente en bazo y en hígado. Estas células tienen la capacidad de fagocitar y lisar eritrocitos senescentes ó dañados. Luego, el grupo hemo es catabolizado por la Hemo-oxigenasa 1 permitiendo la liberación del Fe en el interior de la célula (Poss KD et al., 1997). Aunque la eritrofagocitosis es la principal vía de adquisición de Fe en el SRE, no es la única, ya que se ha descrito la expresión del importador de Fe DMT1 en macrófagos esplénicos, quien también podría estar involucrado en la captación de Fe (Muckenthaler MU et al., 2008). Por otro lado, también se ha reportado que DMT1 estaría involucrado en el tráfico intracelular de Fe, aunque aún existen controversias sobre su participación.

Una vez que el Fe ha alcanzado el interior celular, una porción del Fe es almacenado en forma de Ferritina. En este sentido, el SRE representa el mayor sitio de depósito de Fe (Knutson M et al., 2003). Por otro lado, el Fe que no es almacenado es exportado a

través de Ferroportina, oxidado por la Ceruloplasmina y acoplado a Transferrina para su circulación en el torrente sanguíneo.

Las consecuencias de anomalías en el reciclado del Fe se evidencian en dos patologías bien definidas. Por un lado, la hipoferremia asociada a inflamaciones crónicas, conocidas como Anemia de las Enfermedades Crónicas, donde existe una marcada retención de Fe en el SRE (Malyszko J et al., 2007). Por otro lado, la hemocromatosis hereditaria, caracterizada por bajos niveles de Fe en macrófagos (Andrews N, 2000).

Debido a la complejidad de los mecanismos involucrados en la absorción y utilización del Fe, es evidente que dichos procesos se encuentran altamente regulados. En este sentido, se han realizado diversos estudios para comprender los mecanismos mediante los que se le informa al enterocito las demandas de Fe del organismo, postulando la existencia de una señal soluble que actuaría como nexo entre el intestino y otros tejidos.

En este contexto, fue fundamental el descubrimiento de la Hepcidina, conocida como regulador clave de la homeostasis del Fe (Park CH et al., 2001; Pigeon C et al., 2001). Aunque es ampliamente conocido que el hígado es el principal sitio de síntesis de Hepcidina, pocos estudios han determinado con precisión el sitio exacto de localización celular de la proteína y su patrón de distribución en el tejido hepático (Park CH et al., 2001; Pigeon C et al., 2001; Kulaksiz H et al., 2004).

Es sabido que en humanos Hepcidina es producida como un pre-pro-péptido de 84 AA, compuesto por: una secuencia señal de 24 AA en el extremo N-terminal, clave para su reconocimiento en el retículo endoplasmático; una pro-región central entre los AA 25 y 59; y el péptido maduro de 25 AA en el extremo C-terminal (Pigeon C et al., 2001; Park CH et al., 2001). En esta estructura, en el extremo C-terminal, precediendo al péptido maduro existe un sitio de clivaje para furina (Pigeon C et al., 2001). Furina es miembro de una familia de pro-hormonas convertasas que activan proteínas por clivaje del precursor en un sitio específico (Valore EV et al., 2008; Kartikasari AE et al., 2008). En este sentido, recientemente se ha reportado que la convertasa furina sería la principal enzima involucrada en la remoción de la pro-región de Hepcidina, ya que su inhibición impide el clivaje del péptido activo (Valore EV et al., 2008). Por otro lado, la secreción

de Hecpidina parecería no depender de la actividad de furina, ya que se ha reportado que su inhibición no impide la secreción del péptido (Valore EV et al., 2008).

Se ha determinado además, que la estructura y función de Hecpidina y el sitio de clivaje para furina, se hallan altamente conservados en mamíferos y peces, dado que la secuencia del gen codifica pro-pro-péptidos muy similares a los presentes en humanos (Hunter HN et al., 2002; Shike H et al., 2002).

Una vez que Hecpidina ha alcanzado la circulación, se ha reportado su unión a la proteína β 2-macroglobulina en sangre humana, en forma específica y con alta afinidad (Peslova G et al., 2009). Dado que hecpidina inicialmente fue identificada por su actividad antimicrobial, estos hallazgos presentan similitud con lo reportado por Panyutich A et al (1991), quienes han demostrado la unión de β 2-macroglobulina con péptidos antimicrobiales llamados defensinas.

Debido a que Hecpidina posee bajo peso molecular, sería posible que al circular en forma libre sea rápidamente eliminada por orina, disminuyendo su vida media. Por este motivo, se ha propuesto que la unión de Hecpidina con β 2-macroglobulina podría ser un mecanismo para prevenir su acelerada eliminación (Peslova G et al., 2009).

Si bien en humanos se ha reportado un gen para Hecpidina, en el genoma del ratón se han identificado 2 genes que codifican para la proteína, llamados HEPC1 y HEPC2. Sin embargo, solamente Hecpidina 1 parecería estar involucrada en el metabolismo del Fe (Lou DQ et al., 2004).

La relación entre Hecpidina y el metabolismo del Fe ha sido profundamente estudiada en las últimas décadas. Nicolas G (2001) utilizó ratones *Usf2* (Upstream Stimulatory Factor) knockout, que poseen una severa sobrecarga de Fe similar a la observada en pacientes con Hemocromatosis, presentando acumulación hepática de Fe y elevados niveles séricos de Fe. Sin embargo, la sobrecarga de Fe de estos animales no se debió a mutaciones en los genes de *RTf2* y *HFE*, como ocurre en pacientes con Hemocromatosis, sino más bien a la disminución de Hecpidina que presentaron los animales. En este sentido, dado que Hecpidina se localiza río arriba del gen *Usf2*, la mutación del gen *Usf2* podría afectar la expresión de Hecpidina.

Posteriormente se realizaron otros estudios para confirmar el rol de Hecpidina como sensor de los niveles de Fe, utilizando ratones que sobreexpresaban Hecpidina hepática

(Nicolas G et al., 2002a). Estos animales mostraron severa anemia microcítica, bajos niveles de Fe y una alta mortandad perinatal.

En cuanto a la regulación molecular de la expresión de Hefcidina, estudios recientes sugieren la existencia de diversos mecanismos que ocurren a nivel transcripcional.

Se plantea que citoquinas inflamatorias como IL-6, inducen la transcripción de HAMP en hepatocitos. Esta inducción involucraría la activación de Stat3 y la unión de Stat3 a un elemento regulador en el promotor de Hamp (Wrighting DM et al., 2006; Pietrangelo A et al, 2007; Verga Falzacappa et al, 2007).

Por otro lado, diversos autores han propuesto que la activación de la transcripción de Hefcidina sería mediada por Fe, y dependería principalmente del RTf2, RTf1 y HFE (Nemeth E et al., 2008; Viatte L et al., 2009) (Figura 4).

En este sentido se ha propuesto que en deficiencia de Fe, cuando los niveles de Tf-diférrica son bajos, HFE interactúa con el RTf1, disminuyendo la concentración del RTf2. Dado que el RTf2 sería quien previene la liberación de HJV soluble (HJVs), cuando la concentración de RTf2 es baja se favorece la liberación del péptido. Se ha propuesto que HJVs sería capaz de antagonizar la vía de BMP, de modo que elevados niveles de HJVs inactivarían la cascada intracelular mediada por BMP, disminuyendo la síntesis de hepcidina (Lin L et al., 2005; Zhang AS et al., 2005).

Por otro lado, en sobrecarga de Fe, cuando la concentración de Tf-diférrica es alta, el complejo Fe-Tf se uniría al RTf1 y al RTf2. Como resultado, el RTf2 sería estabilizado y HFE se disociaría del RTf1 para unirse al RTf2. De esta manera, el complejo HFE-RTf2 interaccionaría con la HJV, evitando el desprendimiento de HJV y disminuyendo los niveles de HJVs. De esta manera, bajos niveles de HJVs resultarán en la activación de la cascada de señalización mediada por BMP. Se postula que BMP se uniría a receptores serina-treonina kinasa, lo que conduciría a la fosforilación de RSmad, quien se uniría a Smad4 formando un complejo que trasloca al núcleo y activa la transcripción del gen de Hefcidina (Massague J et al, 2005; De Domenico I et al., 2007; Babitt JL et al 2007).

Recientemente se ha descrito una nueva proteína involucrada en la regulación de Hefcidina vía HJV/BMP: la serina proteasa TMPRSS6 también llamada Matriptasa-2, altamente expresada en hígado (Ramsay AJ et al., 2008). Se ha reportado que ratones knock-out para la Matriptasa-2 presentan anemia por deficiencia de Fe y niveles

inapropiadamente altos de Hecpidina (Folgueras AR et al., 2008). Los elevados niveles de Hecpidina, pese a la deficiencia de Fe sugieren que Matriptasa-2 sería un inhibidor de la síntesis de Hecpidina (Du X et al., 2008). En este sentido, estudios in vitro sugieren que Matriptasa-2 tendría actividad proteolítica contra la HJV de membrana, impidiendo de esta forma la síntesis de Hecpidina (Silvestri L et al., 2008).

Aunque existen diversas hipótesis sobre la regulación transcripcional de Hecpidina, existen pocos estudios sobre la influencia del promotor del gen. En este sentido, se ha determinado que el factor de transcripción C/EBP β , altamente expresado en hígado, tiene la capacidad de unirse al promotor de HAMP río arriba del sitio de inicio de la transcripción, y que frente a la sobrecarga de Fe los incrementos hallados en C/EBP α modularían los niveles del ARNm de Hecpidina (Courselaud B et al., 2002).

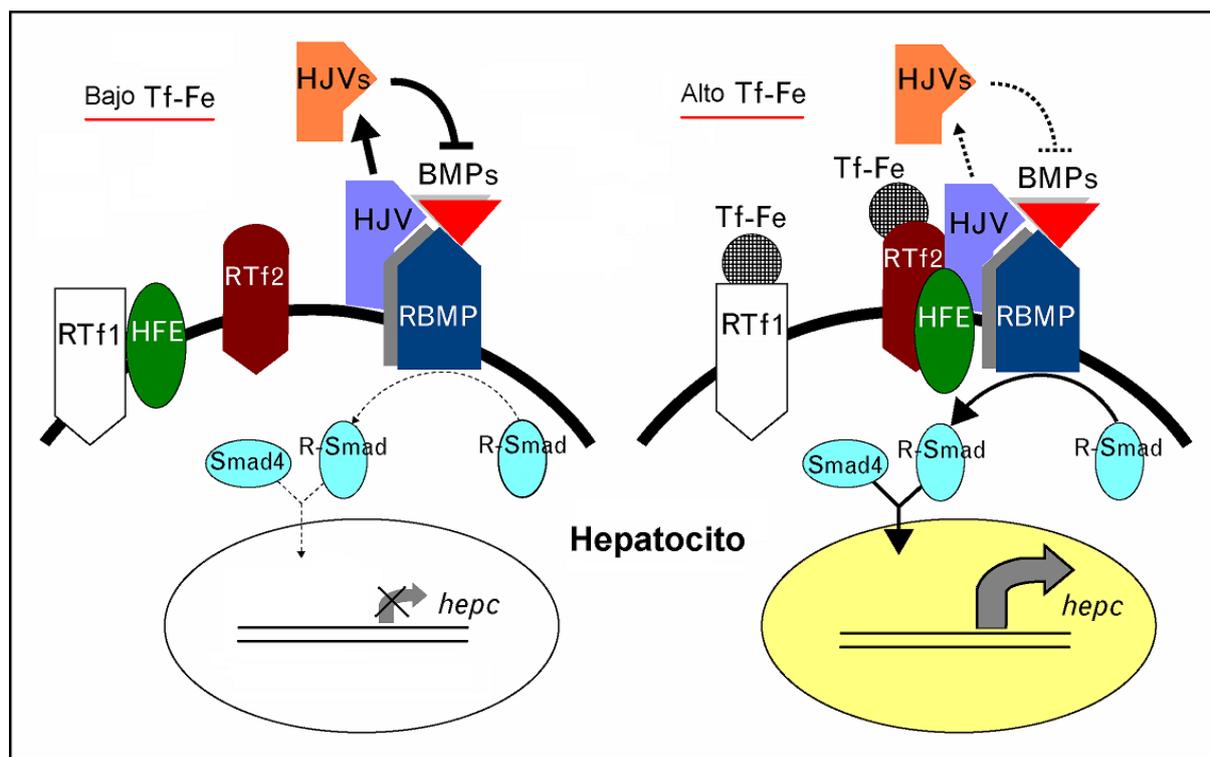


Figura 4. Regulación de la transcripción de Hecpidina en deficiencia y sobrecarga de Fe.

Aunque no se conocen con claridad los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de Hecpidina, es ampliamente conocido que esta proteína es un regulador negativo de la absorción de Fe, cuyos expresión es estimulada por exceso de Fe e inflamación, y reducida en hipoxia y deficiencia de Fe, permitiendo el ingreso de Fe al

plasma cuando las demandas del metal son altas, pero limitando su absorción y liberación cuando los niveles de Fe son elevados (Nicolas G et al., 2002b; Ganz T et al., 2005).

En este sentido, diversos estudios indican que en sobrecarga de Fe la Hepsidina liberada desde el hígado se une a Ferroportina duodenal induciendo la internalización y degradación lisosomal del exportador de Fe, bloqueando así la vía de transferencia de Fe desde el enterocito al plasma (Nemeth E et al., 2004; Knutson MD et al., 2005) (Figura 5)

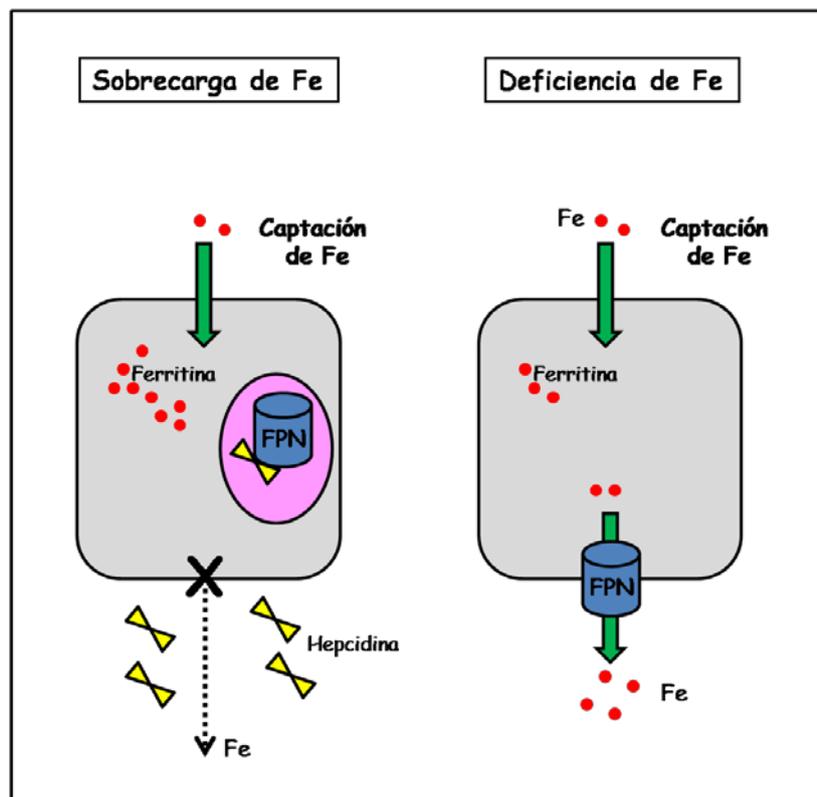


Figura 5. Regulación de la absorción de Fe por Hepsidina y Ferroportina

Por el contrario, en estados de deficiencia de Fe la expresión de Hepsidina es suprimida favoreciendo la expresión duodenal de FPN, permitiendo así la absorción de Fe para compensar la carencia del metal (Figura 5). En este sentido, trabajando con ratones *Usf2* knock-out se han hallado bajos niveles de Hepsidina asociados a un estado de severa deficiencia de Fe (Nicolas G et al., 2002a).

Asimismo, la hipoferremia de estados inflamatorios parecería ser mediada por un incremento en la expresión de Hepsidina, mecanismo dependiente de citoquinas

asociadas al proceso inflamatorio e independiente del estado del Fe (Nemeth E, Valore EV 2003; Lee P et al., 2004).

Por otro lado, dado que gran parte del Fe absorbido o reciclado de la hemoglobina es utilizado para la producción eritroide, se ha evidenciado que estados asociados a elevada actividad eritropoyética, como la hipoxia y la anemia, también presentan baja expresión de Hecpidina (Nicolas G et al., 2002b).

En este sentido, cuando la distribución de oxígeno a los tejidos es inadecuada la respuesta homeostática es la producción de nuevas células eritroides, de modo que disminuyen los niveles de Hecpidina para favorecer la disponibilidad del Fe dietario y del Fe proveniente de depósitos celulares. Sin embargo, aunque en humanos el promotor de Hecpidina contiene sitios de unión para HIF, no hay evidencias de esto en otros mamíferos. Por este motivo se ha postulado que la respuesta de Hecpidina a la anemia podría estar mediada no sólo por la hipoxia del tejido sino también por los elevados niveles de Epo, la elevada actividad eritropoyética ó los bajos niveles de Fe plasmáticos y tisulares existentes debido al consumo de este nutriente para la producción eritroide.

En este contexto, diversos trabajos destacan la importancia de la actividad eritropoyética sobre la regulación de Hecpidina. Se ha demostrado que la supresión de Hecpidina por flebotomía fue revertida cuando la respuesta eritropoyética fue inhibida por un agente quimioterapéutico ó por un anticuerpo contra Epo (Pak M et al., 2006). Además, se ha visto que la administración de Epo a ratones produce un incremento en la actividad eritropoyética y un marcado descenso en la expresión del gen de Hecpidina (Nicolas G et al., 2002c). Asimismo, recientemente se ha propuesto que la regulación negativa que Epo ejerce sobre Hecpidina sería directa y mediada por el receptor hepático de Epo, ya que el pre-tratamiento de células hepáticas con un anticuerpo que bloquea Epo-R previno la supresión de Hecpidina (Pinto JS, 2008).

Sin embargo, pese a las evidencias sobre la regulación que ejerce la actividad eritropoyética sobre la producción de Hecpidina, quedan aún por esclarecer las señales ó mediadores existentes entre la médula ósea y el hígado.

Por otro lado, debido al rol clave que Hecpidina desempeña en el balance del Fe, se han intentado establecer relaciones entre la expresión de Hecpidina y la expresión de transportadores de Fe como el Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1) y Ferroportina, cuando el estado de Fe del organismo se encuentra alterado.

En este sentido, Frazer DM et al (2002) ha establecido una relación inversa entre la expresión de Hecpídina y la expresión duodenal de DMT1 en ratas deficientes en Fe, evidenciando además un incremento en la absorción duodenal de Fe. Estos cambios en la expresión de las proteínas, coinciden con los cambios observados por Anderson GJ (2002) en los niveles de ARNm de DMT1 y Hecpídina en ratas alimentadas con una dieta deficiente en Fe.

La expresión duodenal de DMT1 hallada en estos estudios coincidiría con la conocida regulación post-transcripcional de su síntesis mediada por IRE-IRP, mediante la que bajos niveles de Fe favorecen la unión de IRE con IRP, estabilizando el transcripto y permitiendo la traducción de la proteína.

También se ha visto una relación inversa entre la expresión de Hecpídina y DMT1 en ratones *Usf2* knock-out, carentes de Hecpídina, quienes presentaron un marcado incremento en la expresión duodenal de DMT1 (Viatte L et al., 2005). Sin embargo, dado que estos animales poseen una intensa sobrecarga de Fe, se podría sugerir que el incremento de DMT1 sería secundario a los niveles duodenales de Fe.

Por otro lado no sólo se ha determinado un incremento en los niveles duodenales de DMT1 en deficiencia de Fe, sino que diversos trabajos han identificado el transportador en la membrana apical de enterocitos en ratas y ratones alimentados con una dieta deficiente en Fe, señalando la función de DMT1 como importador de Fe (Cannon-Hergaux F et al., 1999; Trinder D et al., 2000). En este sentido, la expresión apical de DMT1 junto con la ausencia del transportador en las criptas duodenales podría estar indicando que la expresión de DMT1 duodenal ocurre al mismo tiempo que el enterocito madura y adquiere las proteínas necesarias para la absorción y digestión, haciendo referencia a un modelo de programación de células de la cripta (Trinder D et al., 2000). Sin embargo, Frazer DM et al (2004) ha demostrado que el tiempo necesario para que se produzcan cambios en la absorción de Fe coincide con el tiempo necesario para alterar la expresión de Hecpídina. De este modo, una vez que los niveles circulantes de Hecpídina se modifican, los cambios en la absorción de Fe se producen en forma rápida. A partir de estos hallazgos, el modelo de programación de células de la cripta ha sido reemplazado por un modelo que postula que la absorción de Fe y los cambios en la expresión de proteínas del metabolismo del Fe se produciría en dos etapas cuya regulación sería independiente: el transporte de Fe a través de la superficie

duodenal apical, que sería modulado por el estado del Fe del enterocito, y el flujo de Fe por la cara basolateral que estaría regulado por señales sistémicas como Hepsidina (Wessling-Resnick M, 2006). Sin embargo, con este modelo queda aún por esclarecer a que se debe el gradiente en la expresión de DMT1 observado entre las criptas y las vellosidades intestinales.

La función de DMT1 también ha sido estudiada en tejido hepático de animales con deficiencia de Fe, donde se han determinado muy bajos niveles del importador de Fe. La regulación negativa de la expresión hepática de DMT1 en la deficiencia de Fe podría sugerir la existencia de un mecanismo para favorecer la circulación de Fe, incrementando las oportunidades de que el Fe se una a Tf para su distribución en el organismo (Trinder D et al, 2000).

Sin embargo, pese a la conocida función de DMT1 en la captación de Fe, también ha sido descrita su participación en el movimiento intracelular de Fe. En este sentido, se ha reportado la localización de NRAMP2 humano en endosomas tardíos y lisosomas (Tabuchi M et al., 2000), como así también su colocalización con Transferrina en compartimentos intracelulares (Gruenheid S et al., 1999).

Aunque existen contundentes evidencias sobre la expresión duodenal y hepática de DMT1 en estados de deficiencia de Fe, poco se conoce sobre el rol que desempeñaría este importador de Fe en otros tejidos, frente a estados de deficiencia del metal. En este sentido, tampoco se conoce con precisión el tipo de células que expresan DMT1 y el patrón de distribución del importador en cada uno de los tejidos.

Cabe mencionar además, que existen diversas patologías que cursan con alteraciones del balance del Fe, tales como Anemias de distinta etiología, en las que la expresión de proteínas reguladores del Fe tampoco ha sido estudiada en profundidad. En este sentido, la Anemia Hemolítica es un estado fisiopatológico con un marcado compromiso del eritrón, en el cual aún no se conocen con detalle los mecanismos involucrados en el manejo del Fe del organismo ni la expresión tisular de proteínas del Fe.

Otro de los estímulos más importantes capaz de modificar la expresión de proteínas de la ruta del Fe es la Sobrecarga de Fe.

Es sabido que excesos de Fe catalizan la conversión de superóxido y peróxido de hidrógeno en radicales libres mediante la reacción de Haber-Weiss, especies altamente reactivas capaces de dañar diversas estructuras celulares (Fraga CG et al., 2002; Emerit

J et al., 2001). Sin embargo, es ampliamente conocido que el hígado es un órgano fundamental en la detoxificación de Fe, mediante un incremento en la tasa de captación y una baja tasa de liberación de Fe (Trinder D et al., 2002).

En este sentido, se ha visto marcada expresión hepática de DMT1 en animales alimentados con dietas con elevado contenido de Fe, lo que pone de manifiesto la capacidad importadora y fagocítica de DMT1 (Trinder D et al., 2000).

También se ha intentado determinar el compromiso de DMT1 en otros tejidos cuando los niveles de Fe del organismo son elevados. En este sentido, algunos trabajos han propuesto la participación de DMT1 duodenal en el balance del Fe, evidenciando bajos niveles de la proteína en estados de Sobrecarga Fe (Dupic F et al., 2002; Frazer DM et al., 2003). Por otro lado, Theurl I et al (2005) ha reportado menores niveles del ARNm de DMT1 en tejido esplénico frente a la Sobrecarga de Fe.

Sin embargo, pese a los estudios realizados, aún no se conoce con certeza el rol preciso que desempeña DMT1 en los tejidos comprometidos con el balance del Fe, como así tampoco se conoce con detalle la localización celular del importador en los diversos tejidos.

A partir de lo expuesto anteriormente, es claro que la expresión tisular del importador DMT1 difiere mucho en situaciones que cursan con exceso de Fe y cuando las demandas de Fe son intensas. Por otro lado, también es evidente que tanto la Anemia como la Sobrecarga de Fe ejercen una modulación sobre la expresión hepática de Hefcidina.

Por este motivo, sería clave poder determinar la expresión hepática de Hefcidina, un conocido regulador negativo de la absorción de Fe, en una situación que tradicionalmente está asociada a una elevada demanda de Fe y marcada actividad eritropoyética. Asimismo, sería interesante conocer la expresión de la principal proteína importadora de Fe del organismo, DMT1, en estados anémicos que cursan con elevados depósitos de Fe. Sería interesante saber qué sucede con la absorción duodenal de Fe cuando el organismo posee elevadas reservas de Fe pero presenta una gran demanda de Fe para la actividad eritropoyética. Asimismo, sería interesante determinar el rol que desempeñan tejidos típicamente asociados al almacenamiento de Fe, como el hígado y el bazo.

Esto sería fundamental para responder uno de los interrogantes más importantes que surge a partir de la relación entre eritropoyesis y metabolismo del Fe. En este sentido nos preguntamos si sería posible la coexistencia de elevados niveles de Epo y de Hepsidina, ó si la Epo podría modular la expresión de Hepsidina.

Si frente al estímulo eritroide el organismo no fuera capaz de sensar los niveles de Fe, posiblemente el regulador eritroide transmitiría al enterocito las demandas de Fe, favoreciendo la absorción duodenal de Fe y la liberación de Fe desde el Sistema Retículo Endotelial Hepático y Esplénico. Por el contrario si el regulador eritroide fuera capaz de utilizar el Fe existente en el organismo, ó si el regulador de depósito fuera más fuerte frente a la Anemia, posiblemente la absorción duodenal de Fe sería escasa pese a la demanda eritroide.

En este sentido, sólo un trabajo ha reportado que en situaciones donde la anemia y la sobrecarga de Fe coexisten, predominaría el regulador eritroide favoreciendo un aumento de Epo y una disminución en los niveles de Hepsidina (Nicolas G et al., 2002b). De esta forma, se sugiere la existencia de algún mecanismo por el cual la Epo podría regular los niveles hepáticos de Hepsidina (Pak M et al., 2006). Por otro lado, aunque no se conoce con certeza el mecanismo que relacionaría a Epo y Hepsidina, recientemente se ha propuesto que la acción inhibitoria de Epo estaría mediada por el receptor de Epo expresado en células hepáticas (Pinto JP et al., 2008).

A partir de la posible relación entre la eritropoyesis y el metabolismo del Fe, y dado que la principal hormona estimuladora de la eritropoyesis, la Epo, es sintetizada en el riñón (Koury ST et al., 1988; Maxwell A et al., 1990), adquiere relevancia el estudio del tejido renal.

Es sabido que el control de Fe en el organismo depende fundamentalmente de la captación duodenal del Fe de la dieta, para balancear la pérdida de Fe por otras vías (Ganz T et al., 2006). Por otro lado, si bien los mecanismos de excreción renal son centrales para el control de diversos cationes divalentes, poco se sabe en la actualidad sobre cómo el Fe es manejado en el riñón. En este sentido, Wareing M et al (2000) reportó no sólo que sólo una pequeña porción del Fe sérico es disponible para la ultrafiltración, sino que además determinó que gran parte de Fe filtrado es reabsorbido en los túbulos renales. Sin embargo, aún no está esclarecido si el riñón ejerce algún tipo de control sobre el contenido de Fe excretado (Wareing M et al., 2000).

El reciente descubrimiento sobre la identificación de Hecpídina en células renales en condiciones basales podría indicar un mecanismo dependiente de Hecpídina por el que el riñón regularía los niveles de Fe (Kulaksiz H et al., 2005). Si bien se ha determinado la expresión de Hecpídina en riñón de humanos y de algunos mamíferos en condiciones basales, hasta el presente sólo un trabajo ha podido identificar la expresión renal de Hecpídina en una condición con desbalance del Fe (Veuthey T et al., 2008). En este sentido, se ha propuesto una menor expresión de Prohecpídina frente a la Anemia Hemolítica Aguda, comportamiento evidenciado en el segmento S2 de Túbulo Proximal. Esto favorecería la captación tubular de Fe frente a la anemia, para satisfacer las demandas de Fe para la eritropoyesis.

En este contexto, DMT1 también adquiere importancia en el riñón. Si bien este órgano no está usualmente asociado al balance del Fe, se ha demostrado la expresión de DMT1 en tejido renal de ratas en condiciones basales (Ferguson CJ et al., 2001). Más importantes fueron los hallazgos sobre la modulación de la expresión renal de DMT1 según los niveles de Fe dietario. Se ha reportado un incremento en la expresión renal de DMT1 en dietas con poco Fe, evidenciándose el comportamiento inverso en dietas enriquecidas en Fe (Wareing M et al., 2003). Por otro lado, también se ha determinado localización intracelular de DMT1 en una línea de células de Túbulo Proximal renal, expresado principalmente en membranas de endosomas tardíos y lisosomas (Abouhamed M et al., 2006). Uno de los resultados más importantes en este sentido, fue la determinación de captación de Tf por la cara apical de las células renales y la posterior colocalización de DMT1 con Tf, lo que podría señalar la participación de DMT1 en la captación tubular de Fe.

Sin embargo, pese a la importancia que pareciera tener la expresión renal de DMT1 en el manejo del Fe, no hay evidencias en la literatura sobre la participación renal de este importador de Fe en otros estados con desbalance del metal como la Sobrecarga de Fe.

Un modelo animal que resulta interesante para aportar nuevos conocimientos sobre el estudio de DMT1 en riñón es el modelo de Ratas Belgrade, quienes poseen una mutación en el locus que codifica para DMT1 (Fleming MD et al., 1998). Se ha establecido que estos animales poseen anemia microcítica e hipocrómica debido a un defecto en la absorción intestinal de Fe, como así también en la captación y utilización

del metal. Presentan además una marcada hiperferremia y elevada saturación de Tf, pero poseen una anemia con características de deficiencia de Fe. Por lo expuesto anteriormente, es posible que la mutación en DMT1 también afecte el movimiento renal de Fe. En este sentido, Ferguson et al (2003) ha estudiado el manejo renal de Fe mediante la confirmación de la mutación de DMT1 en tejido renal, evidenciando muy baja expresión del importador. Por otro lado, se ha establecido que estos animales poseen elevados niveles de Hepsidina hepática pese a la sobrecarga de Fe hepática que sufren, lo cual pone de manifiesto una vez más la compleja regulación del balance del Fe (Thompson K et al., 2006).

Aunque el modelo de ratas Belgrade es una gran herramienta para la identificación de proteínas claves de la ruta del Fe y para profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en el transporte de Fe, no ha sido explotado en su totalidad, por lo que aún quedan por esclarecer muchas de las relaciones regulatorias de proteínas del metabolismo de Fe en el tejido renal.

El estudio de proteínas del metabolismo del Fe en riñón también podría contribuir a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos asociados a la anemia de las enfermedades renales crónicas en humanos. En este sentido, es sabido que pacientes con enfermedades renales crónicas desarrollan una anemia gradual pese a la terapia con Epo, evidenciando una deficiencia de Fe funcional. En casos como esos, la existencia de elevados niveles de Hepsidina hepática, posiblemente debido al estado inflamatorio crónico subyacente, podría explicar la inadecuada absorción duodenal de Fe y su secuestro en el Sistema Retículo Endotelial esplénico (Malyszko J et al., 2007). En vistas de relación entre Hepsidina y transportadores de Fe, el estudio renal de estas proteínas sería útil para elucidar alteraciones en vías renales en la anemia asociada a enfermedades renales crónicas.

A partir de todo lo expuesto anteriormente se desprende que, si bien hubo importantes avances en el estudio de los mecanismos regulatorios involucrados en el balance de Fe del organismo, quedan por esclarecer muchos aspectos de la fisiología y fisiopatología del metabolismo del Fe y de la eritropoyesis.

En este sentido, el enfoque de este trabajo de tesis contribuirá al conocimiento de la expresión de proteínas claves de la ruta del Fe como Hepsidina y DMT1, en tejidos tradicionalmente asociados a la homeostasis del Fe como así también en tejidos cuya

asociación con el Fe ha sido recientemente descrita. De esta forma se intentarán responder interrogantes sobre la regulación del balance del Fe en diversas situaciones fisiopatológicas análogas a las observadas en humanos, intentado establecer relaciones funcionales y regulatorias entre dos proteínas claves como Eritropoyetina y Hefcidina.

El conocimiento de mecanismos involucrados en la acción de moléculas claves de la homeostasis del Fe, contribuirá a comprender la etiopatología de algunas enfermedades asociadas a desórdenes que afectan el eritrón. El abordaje de estudios moleculares, estructurales y funcionales de proteínas relacionadas con el Fe permitirá avanzar en la comprensión de las vías de comunicación que participan en informar a los tejidos los requerimientos de Fe.

La comprensión de estos mecanismos de señalización será de utilidad, especialmente, para explicar la falta de disponibilidad de Fe funcional cuando los niveles son normales o están en exceso. El mejor conocimiento de las relaciones funcionales de Hefcidina con Eritropoyetina, contribuirá a profundizar el estudio de las bases moleculares de desórdenes del Fe, como la AEC y otras patologías con compromiso del eritrón.

SECCIÓN II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. *ESPECIES*

1.1.1. Ratones

- Hembras adultas CF1 de 3 semanas de edad (30 ± 3 g. peso corporal)

1.1.2. Ratas

- Belgrade heterocigotas (b/+) y homocigotas (b/b), machos Fisher F344 adultos, de 12 semanas de edad.

Estos animales poseen una mutación en el residuo G158 (Glicina-Arginina) del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1), por lo que presentan anemia microcítica e hipocrómica y una intensa hipoferremia. Para la sobrevivencia, las Belgrade son alimentadas con una dieta suplementada en hierro.

1.2. *DIETAS*

- Los ratones CF1 fueron alimentados con una dieta estándar certificada (Batch 10006/06/01, Ganave ratas y ratones, Pilar, Argentina).
- Las ratas Belgrade recibieron una dieta suplementada en hierro de Harlan Teklad, TD 02385 (Boston, Massachusetts).

En todos los casos los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento.

1.3. *CONDICIONES AMBIENTALES*

Los animales de experimentación deben mantenerse en condiciones ambientales estables y reguladas para estudios *in vivo* e *in vitro* reproducibles y confiables.

Las ratas y ratones son mamíferos homeotérmicos que mantienen su temperatura corporal mediante un control interno de pérdida y producción de calor (Bligh J, 1973), por lo que en todas las experiencias fueron mantenidos en un ambiente con temperatura (22 ± 2 °C) y humedad controlada ($60 \pm 10\%$), siendo estos parámetros importantes en la termorregulación.

En todos los casos, los animales se alojaron en habitaciones con iluminación artificial para el control del ciclo luz –oscuridad.

Dentro de la iluminación otro factor a considerar fue el fotoperíodo, que regula el ciclo circadiano de los animales (Hastings JW et al., 1976). En este trabajo se utilizó un ciclo artificial de 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad, controlada por un reloj automático.

Los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato, con piso y paredes sólidas, con un colchón de viruta de madera que se cambió diariamente.

1.4. REGLAMENTACIÓN PARA EL TRABAJO CON ANIMALES DE LABORATORIO

En diversos estados europeos y en los Estados Unidos existen en vigencia diversas legislaciones para el uso de animales de laboratorio. En nuestro país, el trabajo con animales de laboratorio actualmente no se encuentra legislado.

Por este motivo, para el adecuado uso y manejo de animales de laboratorio en procedimientos experimentales desarrollados con fines científicos, hemos seguido los principios recomendados por “The guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Por otro lado, los diseños experimentales y el desarrollo de los procedimientos experimentales se realizaron considerando el “Principio de las 3 R” de Russell y Burch (Van Zutphen LFM et al., 1993). Este principio se basa en el Reemplazo, la Reducción y el Refinamiento. Propone el Reemplazo de animales conscientes por animales inconscientes o anestesiados, la Reducción del número de animales a utilizar, y el Refinamiento de las técnicas utilizadas para reducir el sufrimiento del animal.

1.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE RATONES EN LA “CONDICIÓN BASAL”

El criterio de inclusión de los ratones en la condición basal fue:

Hb: 13,0 – 18,0 g/dl

HCT: 40-50 %

Reticulocitos: 0 – 8,3 %

Células con Cuerpos de Heinz: 0 %

Epo: 151 pg/ml

Ferremia: 217-253 $\mu\text{g/dl}$

Fe hepático: 134-550 mmol/g tejido

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1. SANGRE PERIFÉRICA

2.1.1. Método de obtención

Debido a la importancia de la toma de muestra sanguínea en las determinaciones hematológicas, es fundamental utilizar una adecuada técnica de extracción para obtener volúmenes adecuados a la volemia de los animales. La volemia de un roedor es aproximadamente el 8% del peso corporal. Si el volumen de sangre extraído excede el 10 % del volumen sanguíneo, el animal puede sufrir hipovolemia y falla cardiovascular. Como regla general, para conservar la vida del animal se recomienda extraer un máximo de 8 ml/kg peso, que en un ratón es equivalente a 0,3 ml aproximadamente.

Por otro lado, en los pequeños roedores las venas son habitualmente pequeñas y difíciles de alcanzar, lo que muchas veces dificulta la obtención de la muestra. Debido a estos inconvenientes, la obtención de sangre desde el seno retro-orbital es utilizada como un método alternativo en trabajos con roedores (Van Zutphen LFM et al., 1993).

Extracción desde seno retro-orbital

Una vez anestesiado el ratón, se sujeta al animal estirando la piel del cuello hacia atrás, asegurándose de no dificultar su respiración.

Para la extracción de sangre se utilizan capilares heparinizados, los cuales se insertan en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y se giran suavemente hasta que extremo del tubo rompe el vaso sanguíneo y la sangre fluye por capilaridad en el interior del capilar. Una vez obtenido el volumen adecuado, se retira suavemente el capilar y se oprime ligeramente la zona con una gasa o algodón seco a fin de favorecer la coagulación. Finalmente se observa detenidamente la recuperación de la anestesia.

2.1.2. Anestesia

Debido a que muchos de los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales pueden causarles dolor o distrés, se busca reducir al mínimo o eliminar estas sensaciones mediante el uso de anestésicos. De esta forma, se reduce también la magnitud de dichos efectos sobre el modelo experimental en desarrollo, incrementando la validez de los resultados obtenidos.

La anestesia general es producida por drogas inductoras de pérdida de la conciencia mientras que la anestesia local es producida por drogas que generan insensibilidad en determinadas partes del cuerpo.

La selección de la anestesia a utilizar depende de diversos factores como la especie a emplear, el tipo de procedimiento a desarrollar y la duración del procedimiento entre otras. También es importante considerar la facilidad de administración del mismo, la inducción de un estado de anestesia estable, la reversibilidad de dicho estado y la ausencia de influencia sobre las variables fisiológicas en estudio (Van Zutphen LFM et al., 1993)

Debido a que la extracción sanguínea debe ser un proceso rápido y sencillo, como anestésico utilizamos un agente inhalatorio. Para ello se trabajó con éter etílico (Biopack®), que induce cortos períodos de anestesia y de fácil reversibilidad, además de ser considerado un agente que difícilmente produzca la muerte del animal por sobredosis.

La administración sólo requiere de una cámara de anestesia en cuyo interior la concentración del agente debe ser del 15-20 % para trabajos con murinos. Para determinar el momento en el que el animal se halla anestesiado resulta fundamental conocer los períodos de la anestesia.

Períodos de la anestesia con éter etílico

- a) **Primer período:** Se produce un ligero aumento de la frecuencia cardíaca y de la respiración tóraco-abdominal. Las pupilas permanecen normales al principio, dilatándose después. El tono muscular es normal.
- b) **Segundo período:** Aparecen movimientos involuntarios. Hay dilatación pupilar. El animal comienza a relajarse suavemente. Al final, las pupilas comienzan a contraerse. La respiración es tóraco-abdominal y se mantiene regular y profunda. El pulso es rápido y la presión arterial está aumentada.

- c) **Tercer período:** La respiración se hace torácica y superficial. Hay miosis extrema y luego algo de midriasis. Los ojos pueden girar en las órbitas. Luego quedan fijos y protuye el tercer párpado. Los músculos abdominales se relajan. El pulso es rápido y la presión arterial normal.
- d) **Cuarto período:** Depende del anestésico. La respiración vuelve a ser tóraco-abdominal. Aparecen temblores y el animal puede gritar. Produce movimientos de lucha o escape poco antes de recuperar la conciencia. Se recuperan los reflejos corneal, conjuntival y el tono muscular.

2.2. TEJIDOS

2.2.1. Eutanasia

La eutanasia se define como el acto de inducir la muerte de un animal de forma humanitaria, sin provocar dolor y distrés. Debe dar como resultado una rápida inconsciencia seguida del paro cardíaco o respiratorio y la pérdida de la función cerebral (American Veterinary Medical Association, 2007).

Es fundamental verificar la muerte del animal inmediatamente después de aplicada la eutanasia. Para el reconocimiento de la muerte deben considerarse los siguientes aspectos: midriasis y ausencia de ventilación pulmonar, latido cardíaco, control de esfínteres y reflejos.

Para inducir la muerte del animal se utiliza un agente volátil como el éter etílico, una droga inhalatoria que induce inactivación indirecta de la corteza, subcorteza y centros vitales del bulbo raquídeo (Van Zutphen LFM et al., 1993). Este agente suele ser utilizado en especies pequeñas como es el ratón, y para su administración se requiere de una cámara cuyo interior se sobresatura con agente químico, de modo que el animal inhale los vapores.

2.2.2. Necropsia

El procedimiento de la necropsia comprende un estudio morfológico y fisiopatológico del estado del animal al momento de su muerte.

Inicialmente se observa macroscópicamente el animal buscando la presencia de posibles alteraciones que podrían invalidar los resultados obtenidos. Luego se coloca al animal en posición decúbito dorsal en una plancha de telgopor, sujetándolo a la misma por sus extremidades, y se limpia la zona de trabajo con abundante alcohol. A continuación se realiza una incisión primaria en la piel del animal, efectuando un ojal en la región abdominal (antes de la apertura genital) que se extiende hasta el diafragma. Desde allí se realiza un segundo corte hacia las extremidades inferiores del animal, formando una Y invertida. Finalizado esto se realiza la apertura de la cavidad abdominal mediante el corte del peritoneo, lo que permite identificar macroscópicamente los órganos del animal. Una vez que la cavidad ha sido abierta se seleccionan los órganos en estudio para su extracción (Figura 1).

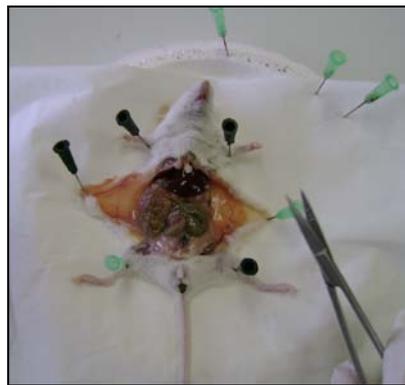


Figura 6. Disección de órganos de ratón.

2.2.3. Disección

Durante el procedimiento de extracción de los órganos es fundamental actuar con precisión y rapidez para evitar posibles daños en las células de los tejidos. En nuestro caso hemos extraído el hígado, bazo, riñones y duodeno.

- **Disección del hígado**

El hígado se localiza en el hipocondrio derecho aunque se prolonga al epigastrio e hipocondrio izquierdo. Se halla limitado por el diafragma en su cara superior y lateral, y

por el colon transverso en la cara inferior (Rouvière H et al., 2005). Para realizar su disección se requiere de gran dedicación debido a que es un órgano altamente irrigado de modo que su extracción va acompañada de pérdida de grandes volúmenes de sangre que podrían afectar la extracción de los demás órganos. Debido a que este órgano recibe sangre oxigenada y desoxigenada, durante su obtención es necesario cortar la arteria hepática y la vena porta, además de separarlo del tejido circundante. Por otro lado, es de gran importancia considerar su cercanía con la vesícula biliar, órgano rico en enzimas digestivas. Es por esto que al momento de la extracción es fundamental evitar el contacto con la vesícula biliar a fin de evitar la lesión de la misma y la liberación de las enzimas que contiene, lo cual podría degradar el tejido de interés. Una vez obtenido el órgano, se toma una porción del lóbulo derecho y una porción del lóbulo izquierdo y se almacena para su utilización.

- **Disección del Bazo**

El bazo es un órgano que se halla situado en el hipocondrio izquierdo inmediatamente debajo del diafragma y detrás de estómago, y presenta dirección oblicua casi semejante a la de las últimas costillas (Tortora GJ et al., 1996). Para su disección es necesario trabajar en dicha zona de la cavidad abdominal, separando el bazo del riñón izquierdo y del colon descendente, órganos sobre los que descansa. Además durante la obtención de dicho órgano es necesario cortar el hilio, estructura por donde pasan la arteria y la vena esplénica.

- **Disección del Riñón**

Los riñones son órganos pares que en su cara posterior se relacionan con el diafragma en la zona superior y con la pared lumbar en la zona inferior. La cara anterior del riñón derecho se relaciona con la porción descendente del duodeno y con el hígado, mientras que en el caso del riñón izquierdo lo hace con el bazo, el extremo izquierdo del páncreas, el estómago y el extremo izquierdo del colon transverso (Tortora GJ et al., 1996). Para su disección es necesario separarlos de los órganos vecinos además de cortar la vena renal, arteria renal y uréteres.

- **Disección del Duodeno**

El duodeno constituye la primera porción del intestino delgado y la parte fija del mismo. Este órgano se extiende desde el píloro hasta el ángulo duodeno-yeyunal y se relaciona con la cabeza del páncreas, a la que rodea en forma de U (Rouvière H et al., 2005). Para su disección se realiza un primer corte en la zona del esfínter pilórico y un segundo corte 2 cm más adelante, de modo de asegurarse la obtención de segmentos duodenales sin restos de yeyuno.

3. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

La administración de drogas en animales de laboratorio puede realizarse en cuatro formas diferentes, según la ruta de administración: a) aplicaciones en las membranas mucosas, b) administración inhalatoria, c) administración enteral, d) administración parenteral. Estos últimos incluyen las inyecciones intraperitoneales, intramusculares y subcutáneas entre otras.

La elección de la vía de administración de sustancias a los animales de experimentación es un proceso crítico y fundamental para mantener el bienestar del animal. Deben considerarse variables como la solubilidad y viscosidad de la droga, el volumen a inyectar, el calibre de la aguja a utilizar como así también el peso del animal (Van Zutphen LFM et al., 1993).

Para la administración del anestésico de elección se ha utilizado la vía inhalatoria, que ha sido previamente descripta. Para la administración del resto de los fármacos hemos utilizado la vía intraperitoneal, siguiendo las recomendaciones de “Principle of Laboratory Animal Science”. En la siguiente tabla se detallan características consideradas al momento de la administración de drogas en los procedimientos experimentales desarrollados con animales.

Animal	Ratón
Vía de administración	Intraperitoneal
Calibre aguja	25 G-27 G
Máximo volumen a inyectar	1,0 ml

3.1. VÍA INTRAPERITONEAL

Procedimiento experimental:

1. Tomar al animal firmemente por el lomo para inmovilizarlo.
2. Invertir su posición para que el vientre quede expuesto hacia arriba.
3. Colocar la cabeza en un plano inferior con respecto al cuerpo, reduciendo de esta forma los riesgos de lesiones en los órganos.
4. Limpiar la zona de los cuadrantes inferiores con abundante alcohol.
5. Introducir la aguja en dirección horizontal a la línea media del cuerpo.
6. Una vez que se ha atravesado el peritoneo, inclinar levemente la aguja, aproximadamente en un ángulo de 90°.
7. Introducir la sustancia en el interior del animal.
8. Extraer la aguja suavemente y reincorporar el animal a su posición habitual.

4. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS. HEMATOLÓGICOS

4.1. HEMOGLOBINA

La determinación de Hemoglobina es un parámetro crítico para el diagnóstico de las anemias, por lo que la metodología utilizada debe ser lo más exacta y precisa posible. Existen diversos métodos para la cuantificación de los niveles de Hb. En nuestros estudios se optó por el método de la Cianometahemoglobina, o método de Van Kampen y Zijlstra, recomendado por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH 1978).

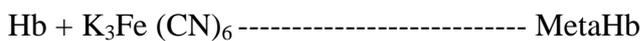
Método de la Cianometahemoglobina

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml).

Fundamento: las células rojas son lisadas y las variantes de Hemoglobina son convertidas a Cianometahemoglobina, un compuesto estable que se cuantifica a 540 nm.

Procedimiento experimental: Se toma una alícuota de la sangre y se diluye con el Reactivo de Drabkin, una solución de Ferrocianuro de potasio, Cianuro Potásico, y un detergente no iónico a pH: 7-7,4.

La función del detergente es acelerar la hemólisis, disminuir el tiempo de la reacción y evitar la aparición de precipitados proteicos. El Ferrocianuro de potasio oxida la Hemoglobina y sus derivados (Oxihemoglobina y Carboxihemoglobina) a Metahemoglobina, y finalmente, el Cianuro Potásico proporciona los iones Cianuro necesarios para formar Cianometahemoglobina. Este último presenta su máxima absorción a una longitud de onda de 540 nm.



En el siguiente cuadro se detalla el procedimiento experimental que hemos seguido para desarrollar la determinación de Hemoglobina.

	Testigo	Desconocido
Reactivo de Drabkin	2,5 ml	2,5 ml
Testigo de Hb	10 μ l	-
Muestra	-	10 μ l

Finalmente se tapan los tubos, se mezclan por inversión y luego de 3 minutos se leen las absorbancias en espectrofotómetro a 540 nm. Estabilidad de la reacción: 24 horas

Cálculos

Hb (g/dl): Abs desconocido x factor (F), donde

F: Concentración Testigo/Abs Testigo

Intervalo de referencia en ratón: 13,0 – 18,0 g/dl

4.2. ERITROPOYETINA PLASMÁTICA Y SÉRICA

Su cuantificación reviste gran importancia debido a que es un indicador fundamental de la actividad eritropoyética.

Muestra biológica:

- Plasma de ratón. Se obtuvo a partir de sangre anticoagulada con heparina, centrifugada a 10000 g durante 5 minutos.
- Suero de rata. Se obtuvo a partir de sangre que se dejó coagular 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugó 20 minutos a 1000 g.

Fundamento: la determinación de los niveles plasmáticos de Eritropoyetina se realiza con el kit Quantikine Mouse/Rat Epo Immunoassay (R&D System). Es un inmunoensayo cuantitativo del tipo sándwich, que emplea un anticuerpo monoclonal específico de ratón, el que se pone en contacto con la muestra, seguido de un complejo conjugado con un enzima. Finalmente se agrega el sustrato de dicha enzima y se mide la intensidad de color de la reacción a 450 nm, la cual es proporcional al contenido de Eritropoyetina de la muestra. Para la determinación de los valores de Epo de la muestra se utiliza una curva de calibrado realizada con estándares de concentración conocida.

Procedimiento experimental:

1. Agregar 50 µl de diluyente de ensayo a cada well de la placa.
2. Agregar 50 µl de las muestras, control y estándares a cada well.
3. Incubar 2 horas a temperatura ambiente en shaker.
4. Lavar cada well 5 veces con el buffer de lavado.
5. Agregar 100 µl del conjugado a cada well.
6. Incubar 2 horas a temperatura ambiente en shaker.
7. Lavar cada well 5 veces con el buffer de lavado.
8. Agregar 100 µl del sustrato a cada well.
9. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en shaker.
10. Agregar 100 µl de la solución de stop a cada well.
11. Determinar de la densidad óptica de cada well a 450 nm y 540, dentro de los 30 minutos.

12. Corregir la densidad óptica. Para ello se resta la lectura obtenida a 540 nm de la lectura obtenida a 450 nm.

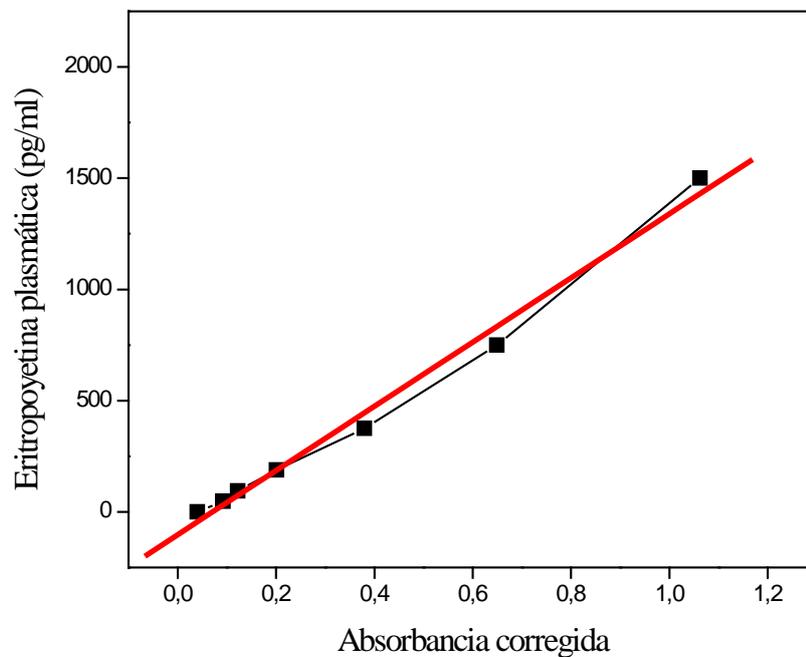
13. Construir la curva de calibrado y determinar la concentración de la muestra.

El método empleado provee un control de concentración conocida cuya absorbancia permite determinar si los valores de la curva de calibrado son correctos.

Control para suero de rata: 329 y 548 pg EPO/ml.

Control para plasma de ratón: 324 y 540 pg EPO/ml

Para las muestras de plasma de ratón se obtuvo la siguiente curva de calibrado.



Curva de Calibrado para la Determinación de Eritropoyetina Plasmática de ratón. Se muestran los valores de absorbancia de los estándares (■) y la recta obtenida en el ajuste por cuadrados mínimos.

La ecuación de esta recta es: $Y = A + BX$, donde

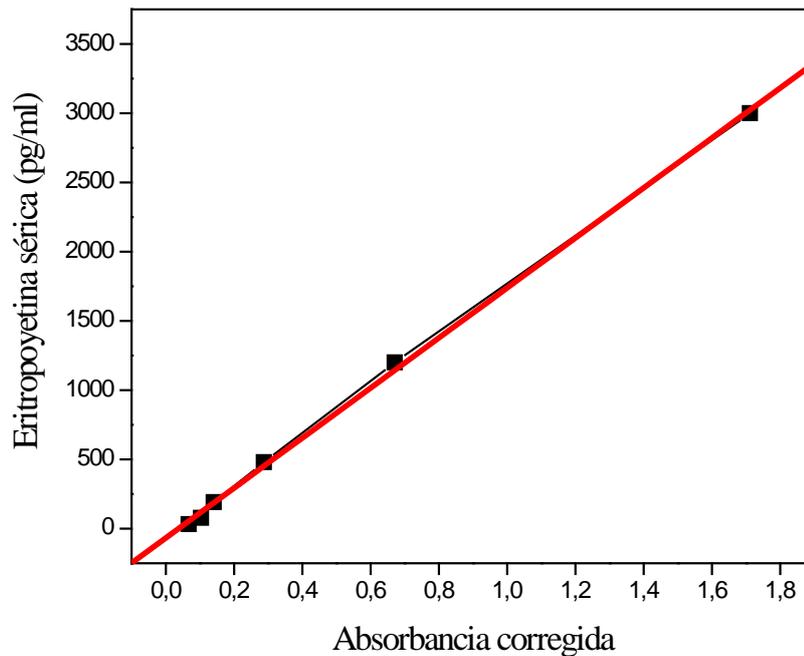
A: -102,7175

B: 1442,66398

El coeficiente de correlación obtenido fue r^2 : 0,99437

Utilizando la curva de calibrado obtenida se determinó que la concentración del control fue de 450,78 pg EPO/ml.

Para las muestras de suero de rata se obtuvo la siguiente curva de calibrado.



Curva de Calibrado para la Determinación de Eritropoyetina Sérica de Rata. Se muestran los valores de absorbancia de los estándares (■) y la recta obtenida en el ajuste por cuadrados mínimos.

La ecuación de esta recta es: $Y = A + BX$, donde

A: -68,09255

B: 1806,86629

El coeficiente de correlación obtenido fue r^2 : 0,99948

Utilizando la curva de calibrado obtenida se determinó que la concentración del control fue de 481,1948 pg EPO/ml.

Valores de referencia:

Plasma heparinizado de ratón: 151 pg/ml

Suero de rata: no detectable

4.3. HEMATOCRITO

El Hematocrito (HCT) se define como la relación entre el volumen de eritrocitos y el correspondiente volumen de sangre total. Su determinación es uno de los procedimientos más sencillos para ayudar al diagnóstico de anemias, y puede ser realizada por técnicas directas o indirectas.

Técnica directa

La técnica directa es el método recomendado por Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH 1978).

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml).

Fundamento: mediante centrifugación, el paquete de eritrocitos es separado del resto de la sangre, y posteriormente se establece la relación entre éste y el volumen de sangre total.

Procedimiento experimental: Se utilizan tubos capilares de vidrio, heparinizados. Los capilares se cargan con la muestra, preferentemente hasta las $\frac{3}{4}$ partes, se obtura uno de los extremos del capilar con plastilina y posteriormente se centrifugan a 10000g durante 5 minutos.

Utilizando un ábaco se mide la longitud total de la columna (glóbulos rojos y plasma) y la longitud de la columna eritrocitaria. El resultado se expresa como %.

Intervalo de referencia en ratón: 40 - 50 %

Intervalo de referencia en rata: 37 - 53 %

4.4. ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Los índices hematimétricos son parámetros que relacionan la Hemoglobina, el Hematocrito y recuento eritrocitario. Estos son:

- Volumen Corpuscular Medio (VCM): expresa el volumen promedio de cada eritrocito.
- Hemoglobina Corpuscular Media (HCM): expresa el contenido promedio de Hemoglobina contenido en cada eritrocito.
- Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM): expresa el contenido medio o concentración de Hemoglobina por unidad de volumen eritrocitario.

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml).

La determinación de estos índices puede realizarse mediante contadores electrónicos ó a través de cálculos manuales. En este trabajo las muestras fueron procesadas en forma automática en una autoanalizador Cell-Dyn 1400 (Abbott).

Intervalo de referencia en ratón:

VCM: 40 – 55 fl

HCM: 14,1 – 19,3 pg

CHCM: 26,0-32,0 g/dl

5. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

5.1. SANGRE PERIFÉRICA

5.1.1. Eritrocitos

El recuento de eritrocitos es la cantidad de glóbulos rojos por mm^3 . Su valoración, conjuntamente con Hemoglobina y Hematocito, es una herramienta diagnóstica de la anemia.

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml).

El recuento de células rojas puede realizarse mediante métodos manuales o automatizados. Dado que la determinación por métodos manuales suele ser poco precisa e incorpora un gran margen de error a los resultados obtenidos, consideramos adecuado utilizar un método automatizado. Para ello se utilizó el autoanalizador Cell-Dyn 1400 (Abbott).

Intervalo de referencia en ratón: $6,36 - 9,42 \times 10^{12}$ eritrocitos/L

5.1.2. Serie leucocitaria

El examen de un extendido sanguíneo reviste importancia ya que frente a alteraciones en el recuento leucocitario, permite identificar las poblaciones causantes de dicha anormalidad.

Muestra biológica: primera gota de sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml)

Fundamento: se realiza un extendido sanguíneo y posteriormente se colorea según la tinción de May Grunwald-Giemsa. En dicho extendido se realiza la identificación de cada subpoblación de células de la serie blanca.

Procedimiento experimental:

Extendido sanguíneo

1. Colocar una gota de sangre sobre un portaobjeto limpio y seco.
2. Colocar el extensor delante de la gota de sangre y desplazar el extensor hacia la gota hasta que ésta se distribuya uniformemente en el bode del extensor.
3. Desplazar el extensor hacia adelante a velocidad constante hasta que la sangre quede bien extendida.
4. Dejar secar el extendido en posición horizontal.
5. Una vez que el extendido se ha secado, debe ser coloreado según la tinción de May Grundwald-Giemsa (La preparación de los reactivos se detalla en el apéndice).

Tinción de May Grunwald-Giemsa

1. Colocar los portaobjetos sobre la bandeja de tinción.
2. Cubrir los portaobjetos con May Grundwald durante 3 minutos.
3. Sin volcar el colorante, agregar 20 gotas de agua neutra sobre el preparado y dejar actuar durante 1 minuto. El agregado de agua permite que en este período se produzca la coloración por precipitación del eosinato de azul de metileno.
4. Volcar el colorante y lavar el portaobjetos suavemente bajo chorro de agua, eliminando así los restos de colorante.
5. Cubrir los preparados con una solución de Giemsa 1/10 y dejar actuar durante 12 minutos.
6. Eliminar el colorante bajo chorro de agua.
7. Dejar secar el preparado en posición vertical.

Para obtener el valor porcentual de cada sub-población leucocitaria se observan los extendidos con una gota de aceite de inmersión en el objetivo 100X en microscopio óptico. Se cuentan en forma diferencial las células de la serie leucocitaria halladas en un campo, procediendo de la misma forma hasta haber contado 100 células de la serie blanca. Finalmente se refiere el número de cada sub-población respecto a las 100 células contadas y el valor hallado se expresa como porcentaje.

Intervalo de referencia en ratón:

Linfocitos: 73 – 85 %

Polimorfonucleares: 15 – 25 %

5.1.3. Serie eritrocitaria

La observación de un extendido sanguíneo también reviste gran importancia para la identificación y caracterización de la serie eritrocitaria.

Muestra biológica: primera gota de sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml)

Fundamento: se realiza un extendido sanguíneo y posteriormente se colorea según la tinción de May Grunwald-Giemsa. En dicho extendido se realiza la identificación de la morfología eritrocitaria.

En condiciones normales, los eritrocitos se observan como células con forma de disco bicóncavo y anucleadas, las cuales adquieren una coloración rosada-violácea. Es posible detectar diversas anomalías en la morfología de los eritrocitos. Entre ellas se pueden mencionar:

- Microcitosis: eritrocitos más pequeños que lo normal ($< 6\mu$).
- Macrocitosis: eritrocitos más grandes que lo normal ($>10\mu$).
- Anisocitosis: coexistencia de eritrocitos de distinto tamaño en un mismo extendido.
- Poiquilocitosis: eritrocitos de formas irregulares.
- Anisocromía: coexistencia de eritrocitos con distinta intensidad de coloración en un mismo extendido.
- Hipocromía: reducción de la intensidad de la tinción de los eritrocitos. Puede variar desde un ligero incremento de palidez en la zona central, hasta un área pálida de gran tamaño rodeada por un pequeño borde de citoplasma hemoglobinizado.
- Policromasia: células que toma los colorantes ácidos y básicos al mismo tiempo por alteración en el contenido de hemoglobina, de modo que exhibe una coloración similar a las células en etapas tempranas de la maduración. En este caso, el citoplasma se ha retrasado en su maduración respecto al núcleo y no ha perdido todo su ácido ribonucleico.

5.1.4. Reticulocitos

La determinación y cuantificación de este tipo celular reviste gran importancia para el estudio de la actividad eritropoyética, ya que la presencia de reticulocitos en circulación periférica es un índice de la actividad de la médula ósea.

Cuantificación de Reticulocitos

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml)

Fundamento: se basa en la detección de los restos de ARN polirribosomal que poseen estas células, mediante la utilización de colorantes supravitales. En nuestros estudios hemos utilizado el colorante Azul Brillante de Cresilo.

Procedimiento experimental:

1. Mezclar partes iguales de sangre anticoagulada y colorante Azul Brillante de Cresilo.
2. Incubar entre 30 minutos y 2 horas a temperatura ambiente.
3. Realizar un extendido sanguíneo en portaobjetos desengrasados previamente.
4. Dejar secar el extendido sanguíneo.
5. Observar los extendidos con una gota de aceite de inmersión en el objetivo de 100X en microscopio óptico.

Mientras que los eritrocitos adquieren una coloración verdosa tenue, los restos de ARN en el interior de los reticulocitos se observan de color azul, como un precipitado reticular. La observación detallada de la morfología de los reticulocitos permite determinar además diferencias en la cantidad y la intensidad de los precipitados de ARN, lo que aporta información sobre el grado de maduración de las células. Las células que presentan intensos precipitados de ARN o gran número de precipitados, indican mayor grado de inmadurez que aquellas que poseen menos ARN, ya que el mismo se va perdiendo durante la maduración celular.

Para obtener el porcentaje de reticulocitos se cuentan todas las células de la serie roja observadas en un campo y todos los eritrocitos observados en el mismo campo, continuando de esta forma hasta contar 1000 células rojas. Finalmente se refiere el número de reticulocitos hallados respecto a 100 células eritroides (%).

Intervalo de referencia en ratón: 0 – 8,3 %

5.1.5. Células con Cuerpos de Heinz

La identificación de células con Cuerpos de Heinz es una determinación que permite evaluar el grado de daño oxidativo que sufren los eritrocitos.

Muestra biológica: sangre anticoagulada obtenida con capilares heparinizados (0,1 - 0,2 mg Heparina/ml).

Fundamento: se basa en la detección de los precipitados de Hemoglobina desnaturalizada, mediante la utilización de colorantes supravitales. En nuestros estudios hemos utilizado el colorante Azul Brillante de Cresilo.

Procedimiento experimental: la identificación y recuento de estas células se realiza siguiendo el mismo procedimiento que para el recuento de reticulocitos, expresándose finalmente como el porcentaje de células con Cuerpos de Heinz halladas en 1000 eritrocitos. Es importante destacar que el tiempo y temperatura de incubación para la investigación de Cuerpos de Heinz es fundamental, ya que se ha descrito que la incubación a 37 °C induce la formación de este tipo celular.

Valor de referencia en ratón: 0 %

5.2. TEJIDOS

5.2.1. Epitelio de Túbulo Proximal

Debido a que el tejido renal posee gran número de estructuras tubulares, la identificación morfo-histológica del túbulo proximal resulta fundamental.

El criterio utilizado para su identificación es el siguiente (Canonne-Hergaux F et al., 2002):

- 1) Son predominantes en los rayos medulares externos.
- 2) Son muy abundantes en la corteza.
- 3) Poseen epitelio cúbico y lumen angosto.

A su vez, los túbulos proximales poseen 3 segmentos, denominados S1, S2 y S3; los cuales pueden ser claramente diferenciados según el siguiente criterio:

- 1) Los segmentos S1 y S2 se encuentran principalmente en la corteza, muy cercanos a los glomérulos; mientras que los segmentos S3 se hallan en el límite entre la corteza y la cara externa de la médula externa.

- 2) Los segmentos S1 y S3 se caracterizan por poseer lumen más angosto que los segmentos S2.

5.2.2. Islotes Eritroblásticos

La identificación de islotes eritroblásticos tisulares reviste gran importancia para el estudio de la actividad eritropoyética extramedular.

Muestra biológica: secciones de tejido embebido en parafina y coloreado con Hematoxilina & Eosina.

Fundamento: técnica histológica que se basa en la identificación de islotes eritroblásticos tisulares y su cuantificación mediante un score preestablecido.

Procedimiento experimental: se cuentan campos de 10X y se determina el número de islotes eritroblásticos hallados en cada campo.

Score preestablecido para el recuento de islotes eritroblásticos esplénicos y renales:

Numero de islotes/10 campos	GRADO
0-5	+
6-12 islotes	++
13-19 islotes	+++
> 20 islotes	++++

Score preestablecido para el recuento de islotes eritroblásticos hepáticos:

Numero de islotes/5 campos	GRADO
0-5	+
6-15 islotes	++
16-50 islotes	+++
51-100 islotes	++++
101-150 islotes	+++++

6. ESTADO DEL HIERRO DEL ORGANISMO

6.1. *HIERRO PLASMÁTICO*

La determinación de este parámetro es de gran importancia ya que permite estimar la cantidad de hierro disponible.

El principal inconveniente hallado al momento de desarrollar la determinación fue el pequeño volumen de muestra obtenido a partir de sangre de ratón. El kit de Roche resultó ser el más conveniente para realizar esta determinación, no sólo por los pequeños volúmenes de trabajo sino por la precisión y exactitud que posee para la determinación del hierro circulante y por el mínimo error que presenta.

Muestra biológica: plasma obtenido a partir de sangre anticoagulada con heparina, centrifugada a 10000 g durante 5 minutos.

Fundamento: El hierro se libera del complejo de Transferrina en medio ácido, se reduce a Fe^{2+} y reacciona con el reactivo de color dando un complejo que se mide a 660 nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de Fe de la muestra.

Procedimiento experimental: las muestras fueron derivadas a un centro de referencia, el que se encargó del tratamiento de las mismas y posterior determinación de los niveles de hierro circulantes mediante el uso de un autoanalizador y el kit de Roche.

6.2. *HIERRO TISULAR*

La determinación de los niveles hepáticos de hierro es fundamental para profundizar el estudio de patologías asociadas con un desbalance de este nutriente (Pérez G et al., 2005).

La medición de los niveles de hierro hepático generalmente se basa en dos métodos complementarios: la exanimación histológica (semicuantificación) y la determinación bioquímica de la concentración de Fe (cuantificación) (Beilby JP et al., 1999).

6.2.1 Evaluación semicuantitativa

Muestra biológica: secciones de tejido embebido en parafina

Fundamento: técnica histológica que se basa en la identificación de los depósitos tisulares de hierro férrico no asociados a proteína, conocido como Hemosiderina, mediante la Tinción de Perl's (Azul de Prusia).

Procedimiento experimental

1. Tinción de los depósitos de hierro según la técnica de Tinción de Perl's.
2. Identificación de los depósitos del metal en un microscopio óptico, observando con objetivo 40X.
3. Semicuantificación de los depósitos de hierro mediante un score preestablecido

El score utilizado permite distinguir y estimar la presencia de Fe hepatocelular y Fe en macrófagos, según el porcentaje de células que muestren depósitos del metal (Barton JC et al., 1995; Barton JC et al., 2005).

HIERRO HEPATOCELULAR	GRADO
Hierro no visible	0
Hierro visible en unos pocos hepatocitos	1
Hierro visible en 5-10 % de los hepatocitos	2
Hierro visible en ≥ 40 % de los hepatocitos	3
Abundante Hierro en la mayoría de los hepatocitos.	4

HIERRO EN MACRÓFAGOS	GRADO
Hierro no visible	0
Hierro visible en \leq un tercio de las células de Kupffer	1
Hierro visible en \leq dos tercios de las células de Kupffer	2
Abundante Hierro visible en $>$ dos tercios de células de Kupffer	3

6.2.2. Evaluación cuantitativa

6.2.2a Lavado

Muestra biológica: tejido hepático

Fundamento: el lavado del órgano previo a la extracción del mismo es fundamental ya que de esta forma se elimina la sangre que contiene el tejido en su interior. Este paso es muy importante debido a la gran vascularización hepática, que en caso contrario sobreestimaría los niveles de Fe debido a la cuantificación del metal que existe en el interior de los eritrocitos.

Procedimiento experimental

1. Abrir la cavidad abdominal del animal.
2. Introducir una cánula en un vaso sanguíneo de gran calibre que se dirige al hígado.
3. Cortar la arteria esplénica.
4. Abrir el dispositivo de lavado permitiendo el ingreso de la solución de lavado (solución salina 0,9 % y heparina).

Así se genera un circuito abierto que asegura la entrada de la solución de lavado y la salida de la misma junto con la sangre, evitando aumentos de presión en el hígado que eventualmente podrían dañar el tejido.

5. Lavar durante 2 minutos aproximadamente, aspirando paralelamente el líquido que se acumula en la cavidad.

La coloración es un indicio de la cantidad de sangre remanente en el hígado. El cambio en la coloración del tejido es otra herramienta importante para confirmar la finalización del lavado, dado que el habitual color pardo del tejido es reemplazado por un color marrón claro-amarillento.

6. Cerrar la llave de paso a la solución de lavado.
7. Limpiar el interior de la cavidad abdominal con gasa.
8. Extraer el hígado, evitando la ruptura de la vesícula biliar.
9. Cortar una pequeña porción del mismo y mantener a -20°C hasta su utilización.

En este paso es conveniente cortar muestras de tejido de tamaño relativamente homogéneo para la posterior cuantificación de hierro.

6.2.2b Cuantificación

Muestra: tejido hepático lavado

Fundamento: metodología basada en la digestión ácida del tejido con posterior determinación de los niveles totales de hierro férrico y ferroso, por un método colorimétrico. La optimización de la misma se basó en la modificación de metodologías desarrolladas previamente por otros autores (Deugnier Y et al., 1982; Imbert-Bismut F et al., 1999).

Procedimiento experimental

1. Pesar un tubo de vidrio por cada muestra, lavados previamente con HCl 10 %.
2. Tomar una pequeña pieza del tejido frezado y colocarla en un tubo.
3. Dejar secar las muestras en estufa a 105 °C durante toda la noche.
4. Dejar enfriar los tubos hasta que alcancen temperatura ambiente.
5. Pesar cada tubo a la cuarta cifra decimal y por diferencia calcular el peso del tejido digerido, el cual debe ser al menos 1 mg para poder realizar la determinación.
6. Realizar la digestión en tubos de plástico previamente lavados. Para ello colocar 0,8 ml de Ácido Nítrico 35% a cada muestra, y procesar un blanco con 0,8 ml de Ácido Nítrico 35 %.
7. Agitar con vortex.
8. Tapar los tubos con parafilm.
9. Colocar los tubos en un baño de agua termostatzado a 70°C durante 60 minutos. Si durante la incubación no todo el tejido fue digerido se incuban 30 minutos adicionales.
10. Dejar enfriar los tubos hasta que alcancen temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min si fuera necesario.
12. Preparar la reacción de color de la siguiente manera.

	Blanco (B)	Standard (St)	Experimental Dilución 1/10
Acido Nítrico 35 %	200 μ L	-	-
Tejido digerido	-	-	200 μ L
FeCl₃ 1 mM	-	200 μ L	-
NaOH 10 N	100 μ L	50 μ L	100 μ L
Buffer Acetato de Na	1700 μ L	1750 μ L	1700 μ L

*La preparación de los reactivos de trabajo se detalla en el apéndice.

13. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm.
14. Agregar reactivo PBTS a cada tubo, mezclar inmediatamente y leer nuevamente la absorbancia a 560 nm, entre los 6 y 20 minutos de iniciada la reacción.
15. Luego proceder de la siguiente manera.

	Blanco	Standard (St)	Muestra (M) Dilución 1/10
Tubo Blanco	500 μ L	-	-
Tubo Standard	-	500 μ L	-
Tubo Exp 1/10	-	-	500 μ L
Buffer Reductor	2 ml	2 ml	2 ml

Cálculos:

Corregir las lecturas del estándar (St) y de la muestra (M), restándoles la absorbancia del blanco.

St - B= St corregida

M - B= M corregida

Finalmente se calcula la concentración de Fe de la Muestra:

Fe Muestra (μ mol/L) = M corregida x F1,

donde F1= 1000 μ mol/L / St corregida

7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

7.1. MÉTODO DE FIJACIÓN

Este proceso tiene como objetivo interrumpir los procesos dinámicos que conducen a la degeneración, manteniendo así las estructuras lo mas conservadas posibles. A fin de preservar la estructura tridimensional y la localización de los antígenos, los tejidos deben ser tratados con un fijador que inmovilice las células y detenga los procesos de autolisis.

La fijación suele producirse por dos procesos: por la desnaturalización de la estructura secundaria y terciaria de la proteína o por el entrecruzamiento de las distintas moléculas formando grandes agregados. El primero de ellos, producido por solventes orgánicos, induce pérdida de la estructura de la proteína sin la formación de enlaces covalentes, proceso potencialmente reversible por lo que no es recomendada su utilización. El otro tipo de fijación, producida por formaldehído o glutaraldehído, es aquella generada mediante la remoción de átomos de hidrogeno y la formación de enlaces covalentes (Boenisch T, 2002).

En los protocolos desarrollados la fijación se realizó con un fijador basado en Formol, perteneciente al segundo grupo, debido a su rápida penetración, bajo costo y la adecuada preservación de la mayoría de los antígenos. Este fijador contiene Formalina 10 %, una sal neutra para mantener la osmolaridad, y un sistema buffer para mantener el pH (La preparación del fijador se detalla en el apéndice).

Fundamento: el formaldehido rompe enlaces débiles y reacciona con aminoácidos básicos formando uniones cruzadas de puentes de metileno, de manera que se preserva cierta permeabilidad a las macromoléculas, sin alterar las estructuras de las proteínas intracitoplasmáticas (Boenisch T, 2002).

Procedimiento experimental: en el presente trabajo los tejidos extraídos fueron diseccionados en pequeños trozos de 1 cm². Para desarrollar el procedimiento de fijación consideramos los siguientes detalles: a) obtención de pequeños trozos de muestra, de 1 cm², b) utilización de 15-20 volúmenes de fijador por cada volumen de tejido, c) poner en contacto todas las caras de la muestra con el fijador. En estas

condiciones, el procedimiento de fijación establecido como óptimo fue: 1 hora a temperatura ambiente seguido de 12 horas en heladera.

7.2. MÉTODO DE INCLUSIÓN

Fundamento: aunque el tejido adquiere determinada consistencia al ser fijado, esta no es suficiente para permitir la obtención de cortes seriados y de poco grosor. Por ello es necesario que el tejido se impregne de un material que una vez seco facilite la obtención del corte. En general se utilizan sustancias serosas llamadas medios de inclusión, tales como la parafina (García del Moral R, 1993), pero para realizar la inclusión de una muestra en parafina es necesario inicialmente deshidratar la muestra, debido a la hidrofobicidad del material. Este proceso puede ser llevado a cabo de diferentes maneras, ya sea utilizando alcoholes, glicolíteres o acetona, pero debe ser un procedimiento gradual cuyo tiempo dependerá del tamaño de la muestra (García del Moral R, 1993). En el presente trabajo se utiliza una escala creciente de alcoholes.

Por otro lado, debido a que el alcohol no es capaz de mezclarse con la parafina, antes de la inclusión es necesario eliminar el exceso de alcohol. Para esto se utilizan líquidos capaces de mezclarse tanto con la parafina como con el alcohol. En nuestro trabajo hemos utilizamos tolueno como líquido intermediario.

Procedimiento experimental

1. Lavado postfijación para eliminar excesos de formol.
Sumergir los cassettes en agua corriente por lo menos 15 minutos.
2. Proceso de deshidratación.
 - a. Etanol 50 durante 30 minutos.
 - b. Etanol 96 durante 2 horas.
 - c. Etanol 100 (I) durante 30 minutos.
 - d. Etanol 100 (II) durante 30 minutos.
 - e. Tolueno I durante 30 minutos.
 - f. Tolueno II durante 30 minutos.
3. Inclusión en parafina.
 - a. Parafina líquida a 55 -58 (I) durante 1 hora.

- b. Parafina líquida a 55 -58 (II) durante 1 hora.
4. Obtención del taco.
 - a. Colocar un anillo de inclusión sobre un molde de inclusión de plástico.
 - b. Volcar inicialmente un pequeño volumen de parafina líquida.
 - c. Colocar la pieza de tejido con la orientación deseada.
 - d. Coloca el volumen restante de parafina.
 - e. Deja enfriar la parafina hasta su solidificación, obteniéndose así bloques sólidos llamados tacos.

Utilizando un micrótopo se obtienen cortes de 5 μm de espesor, lo suficientemente delgados para permitir el paso de la luz. Los cortes obtenidos se colocan sobre portaobjetos previamente silanizados, procedimiento que favorece la adhesión de la muestra a los mismos (La preparación del silane se detalla en el apéndice).

Procedimiento de silanización

1. Sumergir los portaobjetos en alcohol 96 % para eliminar todos los restos de grasa.
2. Secar los portaobjetos.
3. Sumergir los portaobjetos en la solución de salinización durante 30 minutos.
4. Lavar 1 vez y rápidamente el portaobjeto silanizado en agua destilada.
5. Dejar secar los portaobjetos en un lugar libre de polvo durante 16 horas.
6. Una vez secos, apilar y guardar los portaobjetos.

8. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

8.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Fundamento: la microscopia electrónica de barrido (SEM) realiza un escaneo de la muestra mediante la utilización de un haz de luz de alta energía. Los electrones

interaccionan con los átomos que forman parte de la muestra y generan una imagen que contiene información sobre la ultraestructura de la misma.

La preparación de las muestras es algo compleja ya que por un lado deben ser carentes de líquido, de modo que las muestras biológicas usualmente requieren algún proceso de fijación que además preserve las estructuras celulares. Otra de las características más importantes que debe poseer el espécimen en estudio es la conductividad de la corriente, por lo que las muestras biológicas suelen recubrirse de algún material conductor. Dicha cobertura debe poseer un grosor crítico de manera tal que permita la conducción de la corriente sin enmascarar las características de la superficie de la muestra.

Procedimiento experimental: se trabaja con pequeños fragmentos de tejido los cuales son fijados en glutaraldehído 1%, lavados y sometidos a un proceso de post-fijación con tetróxido de osmio. Luego las muestras son deshidratadas, montadas sobre un taco utilizando un adhesivo de resina epoxy y cubiertas con una capa de oro. Mediante la utilización de un ultramicrotomo se obtienen cortes ultrafinos de 0,5-2 μm de espesor para su examinación al microscopio electrónico.

9. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Debido a que los tejidos se hallan incluidos en parafina, para su tinción se realizó la desparafinización utilizando xilol y una posterior rehidratación gradual, utilizando concentraciones decrecientes de alcohol (García del Moral R, 1993).

9.1. *HEMATOXILINA & EOSINA (H&E)*

Es una de las técnicas básicas usadas en histología e histopatología para identificar correctamente la citología del tejido.

Muestra biológica: secciones de tejido (5 μm) embebido en parafina.

Fundamento: la Hematoxilina es un colorante básico que posee afinidad por los componentes ácidos de la célula, tales como el ADN, lo que le otorga la capacidad de teñir los núcleos celulares. En este trabajo se ha utilizado la Hematoxilina de Harris, una

laca conocida por su estabilidad (conservación de 6 a 12 meses) que colorea los núcleos celulares en tonalidades violetas (García del Moral R, 1993).

Para la tinción de los componentes citoplasmáticos se utilizó Eosina, uno de los colorantes xanténicos mas conocidos. Este es un colorante ácido que colorea estructuras como filamentos citoplasmáticos y membranas intracelulares, permitiendo distinguir detalles del citoplasma celular en tonalidades rojo-rosado.

Procedimiento experimental de tinción

1. Desparafinización e hidratación de cortes.
 - a. Xilol durante 20 minutos.
 - b. Alcohol 100 % durante 5 minutos.
 - c. Alcohol 96 % durante 5 minutos.
 - d. Alcohol 70 % durante 2 minutos.
 - e. Agua destilada durante 2 minutos.
2. Tinción.

Hematoxilina de Harris. El tiempo varía según el tejido en estudio:
Hígado, Bazo y Riñón: 1 minuto y 15 segundos.
Intestino (duodeno): 1 minuto.
3. Lavado.
 - a. Agua corriente I algunos segundos.
 - b. Agua corriente II durante 5 minutos.
4. Contraste y deshidratación.
 - a. Alcohol 80 % durante 2 minutos.
 - b. Eosina durante 30 segundos.
 - c. Alcohol 96 % durante 15 segundos.
 - d. Alcohol 100 % durante 15 segundos.
 - e. Xilol durante 1 minuto.
5. Montaje con cubreobjetos y Bálsamo de Canadá.

9.2. *TINCIÓN DE PERL'S*

Es una metodología ampliamente utilizada para detectar Fe libre en forma férrica o como sales férricas (García del Moral R, 1993).

Muestra biológica: secciones de tejido (5 μ m) embebido en parafina

Fundamento: se basa en la propiedad que tiene el ferrocianuro de potasio para transformarse, en presencia de hierro férrico, en ferrocianuro férrico o Azul de Prusia, por acción del Ácido Clorhídrico que actúa como desencadenante de la reacción (García del Moral R, 1993). (La preparación de los reactivos se detalla en el apéndice)

Procedimiento experimental:

1. Desparafinización e hidratación de cortes.
 - a. Tolueno II durante 3 minutos.
 - b. Etanol 100 II durante 2 minutos.
 - c. Etanol 96 durante 2 minutos.
 - d. Etanol 50 durante 2 minutos.
 - e. Agua Destilada durante 1 minuto.
2. Agregado de Ferrocianuro Potásico al 10% durante 4 minutos.
3. Agregado de Solución de Trabajo. La duración de la incubación depende del tejido en estudio. Bazo: 10 minutos; Riñón, Hígado y duodeno: 12 minutos.
4. Lavado con Agua Destilada.
5. Contraste con Rojo Nuclear. La duración de la incubación depende del tejido en estudio. Bazo: 1 minuto.
Riñón, Hígado y duodeno: 1 minuto y 30 segundos.
6. Lavado con Agua Destilada.
7. Deshidratación.
 - a. Etanol 50 Etanol 50 durante 15 segundos.
 - b. Etanol 96 durante 15 segundos.
 - c. Etanol 100 durante 15 segundos.
 - d. Tolueno durante 15 segundos.
8. Montaje con cubreobjetos y Bálsamo de Canadá.

10. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

La inmunohistoquímica es una técnica ampliamente conocida que se basa en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo y que permite poner en evidencia la localización celular del antígeno de interés.

Con el objetivo de visualizar el antígeno en estudio se utilizan anticuerpos en forma individual o secuencial y la unión de los mismos se evidencia mediante marcadores, tales como enzimas, fluorocromos, iones metálicos coloidales, etc.

10.1. TÉCNICA ENZIMÁTICA. INMUNOPEROXIDASA

Muestra biológica: secciones de tejido (5 µm) embebido en parafina

Fundamento: la inmunohistoquímica enzimática emplea una enzima como marcador. Acomplejada al anticuerpo mediante unión covalente. Las enzimas más comúnmente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Debido a la versatilidad y amplia aplicación que posee la marcación con peroxidasa, hemos elegido este sistema de detección para nuestros estudios inmunohistoquímicos.

Esta técnica se basa en la utilización de la enzima peroxidasa, obtenida del rábano picante. El agregando del sustrato de la enzima y de una molécula productora de color llamada cromógeno, genera un precipitado de color que pone en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo (García del Moral R, 1993).

Existe una gran variedad de metodologías que utilizan esta enzima y suelen clasificarse según el número de anticuerpos empleados o por el uso de complejos enzimáticos o polímeros conjugados (Boenisch T, 2002).

Aspectos técnicos

El empleo de esta técnica requiere del conocimiento previo de algunos aspectos técnicos, claves para el desarrollo de una adecuada tinción inmunohistoquímica. Uno de ellos es la pérdida de reactividad de muchos antígenos durante la fijación del tejido en formol, lo cual requiere de un proceso de desenmascaramiento del antígeno conocido como recuperación de epitopes.

El principio de esta metodología se basa en el tratamiento de la muestra con enzimas proteolíticas (Cattoretti G et al., 1993) o en la aplicación de calor por tiempos variables, una técnica más recientemente descrita y que ha mostrado mejores resultados (Pileri SA et al., 1997). Debido a que la recuperación de antígeno es dependiente del antígeno en estudio, en nuestro caso fue necesario realizar pruebas iniciales con el objetivo de determinar si era necesaria la recuperación de epitopes para las proteínas en estudio. Para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo de recuperación antigénica por calor.

Procedimiento experimental

Este procedimiento se realiza luego de la rehidratación de las muestras, y previamente a la incubación con el anticuerpo primario.

1. Colocar los cortes en Buffer citrato 2,1 g/l.
2. Llevar las muestras al microondas 40 segundos.
3. Colocar las muestras en una olla presión, y contar 15 minutos desde que comienza el hervor.
4. Enfriar a temperatura ambiente.

* La preparación de los reactivos de trabajo se detalla en el apéndice.

Otro aspecto técnico crítico a considerar fue la actividad de la peroxidasa endógena, originada por la enzima presente en los eritrocitos de las muestras tisulares, como así también por enzimas tisulares como la catalasa y la citocromo oxidasa. El principal problema de esto es la posible reacción de la enzima endógena con el sustrato, causando una tinción inespecífica que origina resultados falsos positivos (Garcia del Moral R, 1993).

Para evitar esto se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena mediante el tratamiento de las muestras con H₂O₂ 3% en PBS durante 15 minutos, previamente a la incubación del anticuerpo primario. Algunos protocolos sugieren la utilización de H₂O₂ 3% en metanol, pero esto no se recomienda para aquellos especímenes en los que se identificarán marcadores de la superficie de la célula, como es nuestro caso (Boenisch T, 2002).

Finalmente, en cada inmunomarcación es necesario incluir un control negativo que permita confirmar la ausencia de uniones inespecíficas del anticuerpo secundario al tejido en estudio. Para ello se toma alguna de las muestras y se omite la incubación con

el anticuerpo primario manteniendo igual el resto del procedimiento de inmunomarcación.

10.2. PROTOCOLOS

10.2.1. Método con polímero conjugado

Esta metodología utiliza un polímero de Dextrán marcado con aproximadamente 70 moléculas de la enzima y 10 moléculas del anticuerpo. Dentro de esta categoría pueden mencionarse diversos varios sistemas como el EPOS y el EnVision.

En nuestro caso hemos empleado el sistema EnVision (Dako Cytomation), en el cual, a diferencia del sistema EPOS, el polímero se halla conjugado con el anticuerpo secundario; de modo que la inmunotinción se realiza incubando primero con el anticuerpo primario seguido del polímero (Figura 7).

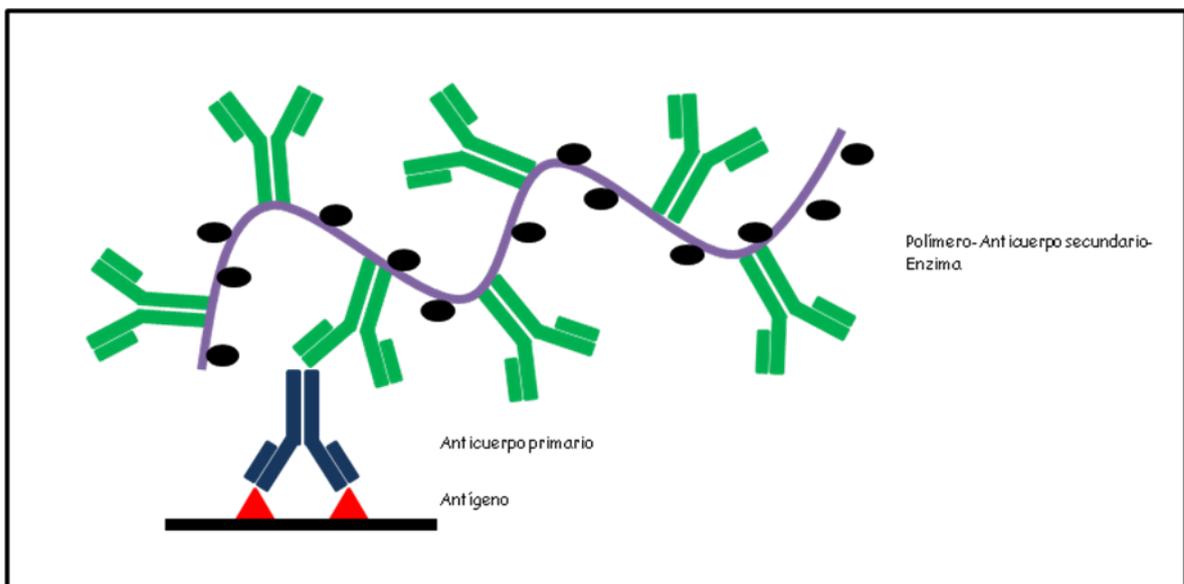


Figura 7. Inmunohistoquímica con método de Polímero Conjugado (EnVision).

Una de las principales ventajas de la utilización de este sistema es la reducción en el número de pasos de incubación requeridos, lo cual reduce la posibilidad de errores. Además, prolongando los tiempos de incubación con ambos anticuerpos se pueden utilizar diluciones mayores que las habituales.

Finalmente, y no menos importante, es la calidad de la marcación obtenida, debido a que la presencia de gran número de enzimas favorece una amplificación de la señal permitiendo detectar la misma aún cuando la muestra posee pequeñas cantidades del antígeno, las que posiblemente sería difícil de detectar con un sistema de marcación común.

Procedimiento experimental inmunohistoquímico desarrollado con el sistema EnVision

1. Rehidratación.
 - a. Xilol durante 20 minutos en estufa a 60° C.
 - b. Xilol durante 20 minutos a temperatura ambiente.
 - c. Alcohol 100 % durante 5 minutos.
 - d. Alcohol 96 % durante 5 minutos.
 - e. Alcohol 70 % durante 5 minutos.
 - f. Alcohol 50 % durante 5 minutos.

2. Lavado en PBS durante 5 minutos.

* La preparación del reactivo se detalla en el apéndice.

3. Bloqueo de peroxidasa endógena.
 - a. H₂O₂ 3 % durante 7 minutos y 30 segundos.
 - b. H₂O₂ 3 % nuevo, durante 7 minutos y 30 segundos.
4. Lavado en PBS durante 5 minutos.
5. Incubación con el anticuerpo primario en cámara húmeda.

El tiempo de incubación depende de la proteína en estudio: a) detección de DMT1: 1 hora a temperatura ambiente, b) detección de Prohepcidina: overnight a 40C.
6. Lavado en PBS durante 5 minutos.
7. Incubación con el anticuerpo secundario (EnVision) durante 30 minutos en cámara húmeda.
8. Lavado en PBS durante 5 minutos.
9. Revelado.

Agregar 50-80 µl del revelador a cada portaobjeto.
El tiempo de revelado depende de la proteína y el tejido en estudio.

	DMT1	Prohepcidina
Riñón	50 segundos	1 minuto 30 segundos
Duodeno	40 segundos	1 minuto 30 segundos
Hígado	50 segundos	-
Bazo	1 minuto	-

10. Contraste.

a. Hematoxilina de Harris.

El tiempo depende del tejido en estudio

	Hematoxilina de Harris
Riñón	4 segundos
Duodeno	4 segundos
Hígado	2-3 segundos
Bazo	5 segundos

- b. Agua corriente I durante 2-3 segundos.
- c. Agua corriente II durante 5 minutos.
- d. Alcohol 50 % durante 15 segundos.
- e. Alcohol 70 % durante 15 segundos.
- f. Alcohol 96 % durante 15 segundos.
- g. Alcohol 100 % durante 15 segundos.
- h. Xilol durante 1 minuto.

5 Montaje con cubreobjetos y Bálsamo de Canadá.

10.2.2. Método indirecto en dos pasos

Este método utiliza un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado directamente con la enzima, seguido por la solución del sustrato cromógeno (Figura 8). A diferencia del sistema EnVision, la señal obtenida es menos amplificada ya que cada anticuerpo secundario suele estar unido a una enzima. Para superar este inconveniente,

es fundamental conocer la relación anticuerpo/enzima al momento de la elección del anticuerpo secundario. En nuestro caso hemos elegido anticuerpos secundarios con una relación enzima/anticuerpo= 4. De esta forma se tiene la certeza de que cada anticuerpo tendrá asociadas 4 enzimas, amplificando la señal de tinción y favoreciendo así la detección de antígenos aunque los mismos se hallen en pequeñas cantidades.

La principal desventaja de esto se debe a que la presencia de 4 enzimas en un solo anticuerpo puede ocultar sitios de unión del anticuerpo por un efecto estérico. Para evitar este problema y tener una mayor certeza en la detección del antígeno hemos trabajado con grandes concentraciones de anticuerpo secundario, asegurándonos así la disponibilidad de sitios libres para su unión al anticuerpo primario.

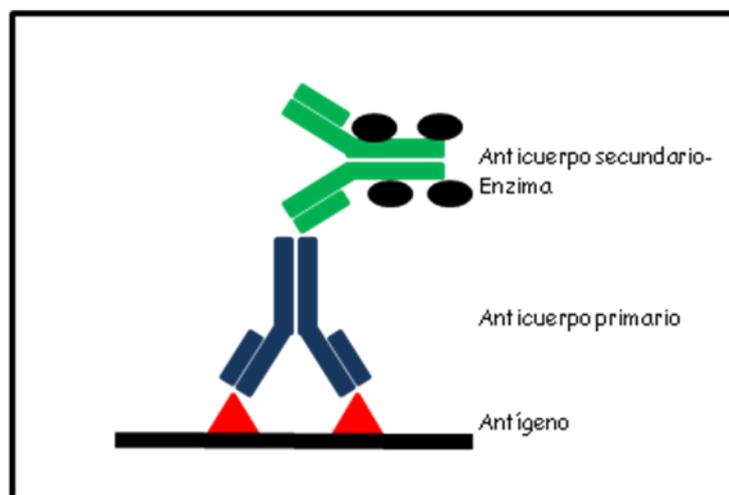


Figura 8. Inmunohistoquímica con método indirecto en dos pasos

Procedimiento experimental inmunohistoquímico indirecto en dos pasos

1. Rehidratación.
 - a. Xilol durante 20 minutos en estufa a 60° C.
 - b. Xilol durante 20 minutos a temperatura ambiente.
 - c. Alcohol 100 % durante 5 minutos.
 - d. Alcohol 96 % durante 5 minutos.
 - e. Alcohol 70 % durante 5 minutos.
 - f. Alcohol 50 % durante 5 minutos.

2. Lavado en PBS durante 5 minutos.

* La preparación del reactivo se detalla en el apéndice.

3. Bloqueo de peroxidasa endógena.
 - a. H₂O₂ 3 % durante 7 minutos y 30 segundos.
 - b. H₂O₂ 3 % nuevo, durante 7 minutos y 30 segundos.
4. Lavado en PBS durante 5 minutos.
5. Incubación con PBS conteniendo suero normal de cabra 5% durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Incubación overnight en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluído en PBS con suero normal de cabra 5%.
7. Lavado en PBS durante 5 minutos.
8. Incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos en cámara húmeda.
9. Lavado en PBS durante 5 minutos.
10. Revelado.
 - a. Preparar la solución de revelado (DAB) unos minutos antes de usar. La concentración final de DAB es: 0,66 mg/ml.
* La preparación del reactivo se detalla en el apéndice.
 - b. Agregar 50-80 µl del revelador a cada portaobjeto.
El tiempo de revelado depende de la proteína y el tejido en estudio.

	DMT1	Prohepcidina	Eritropoyetina
Riñón	50 seg	1 min 30 seg	1 min 30 seg

11. Contraste.
 - a. Solución de Hematoxilina Gill.
El tiempo depende del tejido en estudio.

	Solución Hematoxilina Gill
Riñón	4 segundos

- b. Agua corriente I durante 2-3 segundos.
- c. Agua corriente II durante 5 minutos.
- d. Alcohol 50 % durante 15 segundos.
- e. Alcohol 70 % durante 15 segundos.
- f. Alcohol 96 % durante 15 segundos.
- g. Alcohol 100 % durante 15 segundos.
- h. Xilol durante 1 minuto.

12. Montaje con cubreobjetos y Bálsamo de Canadá.

10.2.3. Anticuerpos primarios

- Anticuerpo primario a-DMT1. Anticuerpo policlonal purificado anti-ratón, desarrollado en conejo, común a las isoformas I y II de DMT1. Dilución: 1:500 en duodeno, hígado y bazo. Dilución: 1:1000 en riñón.
- Anticuerpo primario a-Prohepcidina. Anticuerpo policlonal IgG anti-ratón desarrollado en conejo (Alpha Diagnostic). Dilución: 1:100.
- Anticuerpo primario a-Eritropoyetina. Especies reactivas: rata, ratón, humano. Desarrollado en gallina (Sigma-Aldrich). Dilución: 1:100

10.2.4. Anticuerpos secundarios

- Anticuerpo secundario polímero-HRP marcado, a-conejo, desarrollado en cabra. EnVision+Sistema Diaminobenzidina (Dako Cytomation)
- Anticuerpo secundario IgG (completo) ligado a peroxidasa, a-conejo, desarrollado en burro (Amersham Bioscience). Dilución: 1:100
- Anticuerpo secundario IgG (H+L) ligado a peroxidasa, a-gallina, desarrollado en cabra (Alpha Diagnostic). Dilución: 1:500

11. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

11.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de un experimento consiste en la organización de cada unidad experimental según el tratamiento a recibir y las posibles influencias interferentes, de modo que el éxito de un experimento depende ampliamente del diseño experimental elegido (Van Zutphen LFM et al., 1993; Festing MF et al., 2004).

11.1.1. Elección del diseño

Existe una gran variedad de diseños posibles, cada uno de los cuales lleva aparejado un test estadístico apropiado (Festing MF et al., 2004). En nuestro caso, hemos realizado diseños pareados y diseños en bloque.

- **Diseño pareado**

Es un diseño ampliamente utilizado en la literatura biomédica en el que los animales se agrupan de a pares, según alguna variable que incorpore heterogeneidad al experimento como puede ser el sexo, peso, edad, etc.

En nuestros estudios los animales se aparearon por peso antes de la administración del tratamiento, de manera que cada par tuviera la mayor homogeneidad posible; y se alojó cada componente del par en la misma jaula. Finalmente, durante el desarrollo del protocolo, cada jaula tuvo una ubicación determinada la cual se mantuvo a lo largo de toda la experiencia.

Utilizando este modelo, los valores de cada tratamiento fueron promediados, las diferencias existentes entre los pares fueron eliminadas con el tratamiento estadístico, y las diferencias entre tratamientos reflejaron solamente el efecto del tratamiento en estudio.

- **Diseño en bloques**

Es otro diseño ampliamente recomendado por la literatura que surge como una extensión del test para muestras apareadas, con la ventaja que permite controlar una fuente de variación dada por la diferencia entre bloques (Van Zutphen LFM et al., 1993).

El bloqueo permite aumentar la precisión ya que subdivide un experimento en mini-experimentos, cada uno de los cuales es pensado como un subset de unidades experimentales las que deben hallarse en las mismas condiciones, lo mas homogéneas posibles. En este tipo de diseño los animales fueron separados según la cantidad de tratamientos, y además fueron separados o segregados en bloques. El número de bloques fue dependiente del experimento desarrollado, pero siempre debe ser entre 2 y 6, aunque no puede ser menor que el número de tratamientos. Además cada bloque debe tener animales de todos los tratamientos.

La segregación en bloques debe realizarse en base a alguna variable que se conoce o se cree que puede incorporar heterogeneidad al experimento. En nuestro caso fueron segregados según el peso y ubicación de las jaulas en el bioterio, lo que además permite homogeneizar variables como temperatura y humedad dentro de cada bloque. Durante el desarrollo del protocolo, cada bloque tuvo una ubicación determinada, la cual fue mantenida a lo largo de toda la experiencia.

En el análisis estadístico, las variaciones entre bloques son eliminadas dado que la comparación de tratamiento se realiza siempre dentro de cada bloque. Por otro lado, este diseño posee una alta precisión dado que las variaciones inter-individuales dentro de cada bloque son muy pequeñas debido a la formación selectiva de los bloques.

11.1.2. Randomización

Este es un procedimiento fundamental previo al desarrollo de un protocolo de trabajo que se basa en dividir las posibles variaciones inter-individuos en forma equitativa entre grupos controles y experimentales (Van Zutphen LFM et al., 1993).

El procedimiento de randomización puede llevarse a cabo seleccionando alguna variable de interés, que el investigador considere que puede afectar los resultados obtenidos. En nuestro caso los animales se han segregado según el peso, generando grupos de trabajo cuyo peso sea lo más homogéneo posible, de modo que la variación de este parámetro no sea la causante de los grandes cambios en los resultados obtenidos.

11.1.3. Elección al azar

La elección al azar es otro proceso importante que se utiliza para minimizar variables que podrían introducir errores en el experimento en desarrollo. Es un procedimiento que se debe realizar con anterioridad al inicio del experimento y por única vez.

Se suele utilizar para la selección del orden en que los animales recibirán un tratamiento, etc. En nuestro caso se ha realizado la elección al azar para establecer el orden en que se realizarían las inyecciones y el orden en que se realizaría cada extracción sanguínea. Es un proceso sencillo en el que utilizamos una pieza de papel para cada animal, cada una de las cuales es numerada y sometida a un sorteo para la elección del orden en que se procesará cada animal.

11.1.4. Distribución de animales

La determinación del número de animales que serán alojados en cada jaula no deja de ser un parámetro importante al momento de asegurar el bienestar del animal y la subsecuente validez de los resultados obtenidos.

Según UFAW/Royal Society, U.K. (1987), para alojar ratones de hasta 30 g en grupo, cada animal debe tener 60 cm² dentro de la jaula.

El tamaño de nuestras jaulas de trabajo es: 27 cm x 17 cm = 459 cm²

Por ello,

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ ratones/jaula} &= 459 \text{ cm}^2 / 60 \text{ cm}^2 \\ &= 7.65 \end{aligned}$$

11.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

11.2.1. Tamaño de muestra

La determinación de la unidad experimental es un paso fundamental para obtener resultados estadísticamente válidos. En el estudio con animales, suele creerse que un

animal constituye una unidad experimental, pero muchas veces esto no es cierto. Es por ello, que antes de iniciar un protocolo experimental es de gran importancia determinar el tamaño de la muestra que nos asegure que los resultados obtenidos tienen validez estadística.

Existen 3 métodos principales para la determinación del tamaño de la muestra: a) determinación por ecuaciones matemáticas, b) métodos basados en experiencias previas, c) método de la Ecuación Recursiva (Van Zutphen LFM et al., 1993).

En nuestros estudios hemos utilizado el método de la Ecuación Recursiva para establecer el número de animales necesarios en cada procedimiento experimental (Mead R 1988). Según este método, el número de grados de libertad asociados con el error residual de un experimento (E) debe ser entre 10 y 20.

Cuando se trabaja solamente con 2 grupos experimentales, se calcula según:

$$E = N - T$$

Donde; N (total de grados de libertad): corresponde al número de unidades experimentales

T (grados de libertad de tratamientos): corresponde al número de tratamientos

Cuando se trabaja con un modelo en bloques, se calcula según:

$$E = N - T - B$$

Donde; N (total de grados de libertad): número de unidades experimentales -1

T (grados de libertad de tratamientos): número de tratamientos -1

B (grados de libertad de bloque): número de bloques -1

De esta forma, se calcula un valor de N que permita obtener un error residual entre 10 y 20. Dicho N, será el número de unidades experimentales totales que se utilizarán, las cuales serán distribuidas en el número de tratamientos y bloques existentes.

11.2.2. Normalidad

La normalidad ó distribución normal de los datos a estudiar es uno de los principales supuestos que deben comprobarse antes de comenzar un análisis estadístico.

11.2.2.a Prueba de Bondad de Ajuste X^2 . Chi Cuadrado.

Esta prueba se basa en la comparación entre la frecuencia observada en un intervalo de clase y la frecuencia esperada (E_i) en dicho intervalo (Steel R et al., 1993). Es decir, intenta determinar si las frecuencias observadas en la muestra están lo suficientemente cerca de las frecuencias esperadas en una distribución normal.

Inicialmente se plantearon la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1)

H_0 : las observaciones tienen distribución normal

H_1 : las observaciones no tienen distribución normal

Posteriormente los datos se agruparon en intervalos de clase, donde el número de intervalos se determinó según la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ intervalos: } 1 + 3,32 \log (\text{número de observaciones})$$

Luego se calculó:

La frecuencia observada (O_i) de cada intervalo, como el número de valores que pertenecen a cada intervalo

La frecuencia esperada (E_i) de cada intervalo como:

$$E_i: P_i \cdot n$$

donde P_i : probabilidad de que el valor tenga distribución normal

n : número total de observaciones

A continuación se determinó el estadístico X^2 de cada intervalo como:

$$X^2: (O_i - E_i)^2 / E_i$$

Y el X^2 total como:

$$X^2 = \sum_{i:1}^k (O_i - E_i)^2 / E_i$$

Finalmente se comparó X^2 hallado con el valor crítico de la distribución Chi Cuadrado (X^2), trabajando con grados de libertad:

$$N^{\circ} \text{ intervalos} - 1$$

y utilizando $\alpha=0,05$

Posibles resultados

- Si el $X^2_{\text{Hallado}} < X^2_{\text{Tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto determina que las observaciones poseen distribución normal. No hay evidencias que indiquen que la distribución normal no proporciona un ajuste adecuado.
- Si el $X^2_{\text{Hallado}} > X^2_{\text{Tabla}}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto determina que no hay evidencias que las observaciones presenten distribución normal. En este caso puede transformarse la variable en estudio y posteriormente continuar con el análisis estadístico.

En los parámetros estudiados en nuestro caso, siempre pudo comprobarse la normalidad de modo que no fue necesaria la transformación de los datos.

11.2.3. Homoscedasticidad

La homoscedasticidad se define como la homogeneidad de varianzas, lo que implica que todas las muestras provienen de poblaciones con igual variabilidad. Debido a que nunca se tiene certeza de la homoscedasticidad de las muestras, es necesario conocer y comprobar este supuesto antes de realizar los test estadísticos adecuados.

Ya que existen diversas pruebas para comprobar este supuesto es necesario conocer cuál es la mejor prueba y bajo que número de muestras es aplicable cada una.

11.2.3.a. Prueba F de Fisher

Esta prueba se utiliza para comparar la varianza de 2 poblaciones, de modo que sólo puede ser utilizada para comprobar homoscedasticidad cuando se trabaja con un diseño pareado.

Inicialmente se plantearon la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1)

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Luego se calculó el estadístico F, como la razón de las 2 varianzas, con la mayor varianza en el numerador.

$$F = S_1^2 / S_2^2$$

Siendo: S_1 el desvío estándar de la población 1
 S_2 el desvío estándar de la población 2

Finalmente se comparó F con el valor crítico de la distribución de probabilidad F , trabajando con grados de libertad:

n_1-1 en el numerador, siendo n_1 el numero de muestras de la población 1

n_2-1 en el denominador, siendo n_2 el numero de muestras de la población 2

y utilizando $\alpha=0,05$

Posibles resultados

- Si el $F_{\text{Hallado}} < F_{\text{Tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto indica que no se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las dos poblaciones.
- Si el $F_{\text{Hallado}} > F_{\text{Tabla}}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto indica que se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las dos poblaciones. En este caso puede transformarse la variable en estudio y posteriormente continuar con el análisis estadístico.

En los parámetros estudiados en nuestro caso, siempre pudo comprobarse la homoscedasticidad de modo que no fue necesaria la transformación de los datos.

11.2.3.b. Prueba de Bartlett

Esta prueba se utiliza para comparar la varianza de más de 2 poblaciones, de modo que puede ser utilizada para comprobar homoscedasticidad cuando se trabaja con un diseño en bloques.

En una prueba sensible a alejamientos del supuesto de normalidad, y se ha comprobado que es una de las pruebas más poderosas para poblaciones normales (23). Para utilizar esta prueba, el número de muestras (n) no necesita ser igual en todos los tratamientos, pero para asegurar la validez de la prueba se aconseja que no sea menor a 3, y que en la mayoría de los casos sea mayor a 4 ó 5.

Inicialmente se plantearon la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1)

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_k^2$$

H_1 : al menos una σ^2 es diferente

Luego se calculó el estadístico B

$$B = 1/C [(N-k) \ln S^2 - \sum_{i:1}^k (n_i-1) \ln S_i^2]$$

Donde, $C = 1 + [k+1 / 3(N-k)]$, si se trabaja con n iguales:

$$C = 1 + [1 / 3(k-1)] [\sum_{i:1}^k (1 / n_i - 1) - (1 / N - k)], \text{ si se trabaja con n diferentes}$$

La notación correspondiente es:

k: número de poblaciones.

n_i : tamaño de cada población.

N: $n_1 + n_2 + \dots + n_k$

S_i^2 : varianza de cada población, estimada como el desvío estándar.

S^2 : varianza total estimada, siendo ésta,

$$S^2 = \sum_{i:1}^k S_i^2 (n_i - 1) / N - k$$

Finalmente se comparó B con el valor crítico de la distribución X^2 , trabajando con grados de libertad k-1, y utilizando $\alpha=0,05$

Posibles resultados

- Si el $B_{\text{Hallado}} < X^2_{\text{Tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto indica que no se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las poblaciones.
- Si el $B_{\text{Hallado}} > X^2_{\text{Tabla}}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto indica que al menos una de las varianzas es significativamente diferente. En este caso puede transformarse la variable en estudio y posteriormente continuar con el análisis estadístico

En los parámetros estudiados en nuestro caso, siempre pudo comprobarse la homoscedasticidad de modo que no fue necesaria la transformación de los datos.

11.2.4. Análisis de Varianza. ANOVA

El análisis de varianza es un método altamente versátil para el análisis de datos cuantitativos, el cual puede ser utilizado para analizar simples experimentos como aquellos que involucran la comparación de medias de 2 grupos, como así también para diseños más complejos.

La aplicabilidad de este test estadístico requiere que los datos cumplan con 3 suposiciones, las cuales deben ser comprobadas (Festing MF et al., 2004). Estas son: a) homoscedasticidad; b) normalidad; c) independencia.

11.2.4.a. ANOVA en una vía (“t” de Student)

Es el análisis estadístico utilizado para determinar diferencias entre 2 medias, de modo que es el elegido cuando se trabaja con un diseño pareado (Festing MF et al., 2004).

Para el análisis estadístico inicialmente se plantearon la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1).

$$H_0: \bar{y}_1 = \bar{y}_2$$

$$H_1: \bar{y}_1 \neq \bar{y}_2$$

Luego, se calculó la diferencia entre los valores de cada par y se construyó una tabla como se muestra a continuación.

Par	Tratamiento		Diferencia
	1	2	(1-2)
A	y _{1A}	y _{2A}	d ₁
B	y _{1B}	y _{2B}	d ₂
...
n			d _i

Posteriormente se calculó la varianza de las diferencias como:

$$S_d^2 = \frac{\sum_{i:1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}$$

Donde:

\bar{d} : media de las diferencias

n: número de pares

Luego se calculó el estadístico t

$$t = \frac{\bar{d}}{(S_d / \sqrt{n})}$$

Y finalmente se comparó el t hallado con el valor crítico para la distribución t, trabajando con grados de libertad n-1, y utilizando $\alpha=0,05$.

Posibles resultados

- Si el $t_{\text{hallado}} < t_{\text{tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto implica que no se detectaron diferencias significativas entre las medias de las dos poblaciones.
- Si el $t_{\text{hallado}} > t_{\text{tabla}}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto implica que las medias de las dos poblaciones presentan diferencias significativas.

11.2.4.b. ANOVA en dos vías

Es el análisis estadístico utilizado para determinar diferencias entre grupos experimentales cuando se trabaja con un diseño experimental en bloques. En estos diseños hay una fuente de variación asociada con los tratamientos, una fuente de variación asociada con los bloques, y por otro lado la interacción bloque x tratamiento provee una estimación de la variación del error y es utilizada para el término error residual (Festing MF et al., 2004).

Para el análisis estadístico inicialmente se plantearon la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1).

H_0 : todas las medias son iguales

H_1 : al menos una media es diferente

Luego, utilizando los valores de las muestras se construyó una tabla de ANOVA como se muestra a continuación.

Fuente	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	Fm
Tratamientos	K-1	$\sum T_i^2/n - T^2/N$	SC/gl	$CM_{\text{trat}}/CM_{\text{res}}$
Bloques	n-1	$\sum T_j^2/K - T^2/N$	SC/gl	$CM_{\text{bloq}}/CM_{\text{res}}$
Error Residual	(K-1) (n-1)	$SC_{\text{tot}} - (SC_{\text{trat}} + SC_{\text{bloq}})$	SC/gl	
Error Total	N-1	$\sum \sum y_{ij}^2 - T^2/N$		

Donde,

i: tratamientos.

j: bloques.

y_{ij} : valor de muestra de tratamiento i y bloque j.

T_i : suma de valores de cada tratamiento.

T_j : suma de valores de cada bloque.

T: suma de todos los valores.

n: número de bloques.

N: número total de respuestas.

K: número de tratamientos.

De esta manera se obtuvo un valor F entre tratamientos y un valor F entre bloques.

Luego se determinó el valor crítico para la distribución F, utilizando la tabla F:

F para tratamiento, utilizando gl_{tratam} en el numerador y gl_{res} en el denominador

F tabla para bloque, utilizando gl_{bloq} en el numerador y gl_{res} en el denominador

Y finalmente se comparó el F hallado con el valor crítico para la distribución F, utilizando $\alpha=0,05$

Posibles resultados

- Si el $F_{trat hallado} < F_{trat tabla}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto implica que no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.
- Si el $F_{trat hallado} > F_{trat tabla}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto implica que al menos uno de los tratamientos presenta diferencias significativas.
- Si el $F_{bloq hallado} < F_{bloq tabla}$, entonces se acepta la hipótesis H_0 . Esto implica que no se detectaron diferencias significativas entre los bloques.
- Si el $F_{bloq hallado} > F_{bloq tabla}$, entonces se rechaza la hipótesis H_0 . Esto implica que al menos uno de los bloques presenta diferencias significativas.

11.2.5. Comparaciones múltiples

Cuando son comparados diversos tratamientos, el análisis ANOVA sólo nos indica si hay evidencias que dichos tratamientos son estadísticamente diferentes. Si dicho análisis detecta diferencias, luego es necesario conocer qué grupos son los que presentan las diferencias. En estos casos es necesario realizar un test de comparación múltiple en el que todos los tratamientos en estudio se comparan entre sí. Dado que existen diversos test de comparación múltiple, es necesario conocer lo que se desea estudiar para elegir el test más adecuado (Festing MF et al., 20049).

11.2.5.a Test de Tukey modificado

En este test, uno de los mas recomendados para comparar medias de diferentes tratamientos, inicialmente se calcula un “allowance” llamado D, que indica la mínima diferencia existente entre las medias que es considerada significativa.

En nuestro caso hemos trabajado siempre con igual número de réplicas por tratamiento, de modo que el “allowance” se calculó de la siguiente manera:

$$D= Q \sqrt{(CM_{res}/n)}$$

Donde:

CM: cuadrado medio del residual, proveniente del análisis de ANOVA.

n: número de repeticiones por tratamiento.

Q: estadístico de amplitud total estudentizada, que se obtuvo en una tabla F, trabajando con,

k: número de tratamientos.

gl del residual: proveniente del análisis de varianza.

$\alpha=0,05$

Luego se construyó una tabla con las medias de cada tratamiento ordenadas de mayor a menor, y se compararon todas las medias calculando las diferencias entre ellas.



Tratamiento	Media (\bar{y}_i)	$\bar{y}_i - \bar{y}_4$	$\bar{y}_i - \bar{y}_1$	$\bar{y}_i - \bar{y}_3$
2	\bar{y}_2			
3	\bar{y}_3			-
1	\bar{y}_1		-	
4	\bar{y}_4	-		

Finalmente se observaron todas las diferencias calculadas. Aquella diferencia que supera al “allowance” D indica los tratamientos que presentan diferencias significativas entre ellos.

SECCIÓN III. RESULTADOS

CAPÍTULO I:

***ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS
ANIMALES***

1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA

El modelo murino de Anemia Hemolítica desarrollado hace décadas fue esencial para nuestros estudios sobre la eritropoyesis y el metabolismo del Fe. El diseño experimental implementado para el desarrollo del modelo de Anemia Hemolítica con la droga Fenilhidrazina (FHZ) se adecuó a los objetivos planteados inicialmente en nuestro Plan de Trabajo. Estos estudios significaron un aporte innovador por la caracterización morfológica, bioquímica y hematológica de la eritropoyesis y el metabolismo del Fe de la cepa CF1 en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas no totalmente descritas en la literatura.

1.1 DESARROLLO DE ANEMIA HEMOLÍTICA EN RATÓN

1.1.a. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA MÍNIMA DE FENILHIDRAZINA.

De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, los ratones hembras CF1 divididos en 4 (cuatro) grupos experimentales denominados en adelante “Grupo Anémico” (n=12) recibieron concentraciones crecientes de FHZ administrada vía intraperitoneal (i.p) los días 0 y 2. Las concentraciones de FHZ ensayadas fueron: a) 10 mg/kg; b) 20 mg/kg; c) 60 mg/kg; d) 100 mg/kg. El grupo No Anémico (control) (n=12) recibió dosis i.p. de 0,5 ml de solución salina estéril (NaCl 0,9 %) los días 0 y 2.

La instauración de la anemia y la recuperación de la eritropoyesis se evaluaron en sangre periférica cada 2 días hasta el día 8 del protocolo (n=4), mediante técnicas hematológicas convencionales. La características morfológicas y tintoriales de células sanguíneas se evaluaron en extendidos sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa.

Cuando se analizó el tipo de estudio estadístico a aplicar a partir del número de grupos de trabajo (cinco) se optó por un diseño experimental en Bloques. Los bloques fueron segregados según el peso de los animales y su ubicación en el Bioterio. Esta

segregación no sólo permitió homogeneizar el peso, sino que además permitió homogeneizar variables como la temperatura y humedad dentro de cada bloque.

Para iniciar el análisis estadístico se determinó la Homocedasticidad y Normalidad de las variables en estudio de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El análisis de varianza (ANOVA) en 2 vías, utilizando un $\alpha=0,05$, determinó la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, mediante un análisis de comparaciones múltiples (Tukey modificado), utilizando un $\alpha=0,05$, se determinaron los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En la primera etapa del análisis de los efectos de FHZ en las concentraciones estudiadas se determinó que las dosis de 60 y 100 mg FHZ/kg peso, indujeron la máxima respuesta hemolítica. El día 2 del protocolo se vio una disminución estadísticamente significativa del HCT y la Hb, en relación directa a la concentración de FHZ, respecto al día 0. Esta respuesta fue más evidente aun el día 4. Los días 6 y 8 ambos parámetros mostraron una tendencia a retornar a valores basales (Figura 9).

La cuantificación de los Reticulocitos no mostró cambios en las concentraciones menores de 20 mg/kg FHZ respecto a la condición control; mientras que en las dosis de 60 y 100 mg/kg se pudo observar un incremento estadísticamente significativo de Reticulocitos los días 4 y 6, cuyos valores retornaron a los basales el día 8. Los cambios en el número de Reticulocitos no fueron dependientes de la concentración de FHZ (Figura 10).

El recuento de células de la serie eritrocitaria con Cuerpos de Heinz mostró el día 2 del protocolo experimental un marcado incremento estadísticamente significativo en todas las concentraciones de FHZ testeadas. Se determinó una respuesta dependiente de la concentración de FHZ sólo en las concentraciones de 10 y 20 mg/kg. El día 4, el número de células con Cuerpos de Heinz continuó elevado en las concentraciones de FHZ de 10 y 20 mg/kg, mientras que las concentraciones de 60 y 100 mg/kg mostraron una brusca disminución en el recuento de dichas células. En el día 6, en la mayoría de las concentraciones de FHZ estudiadas el recuento de los Cuerpos de Heinz mostró una tendencia a retornar a valores basales, excepto en la concentración de 20 mg/kg de FHZ, que presentó un leve incremento respecto al día 4. Finalmente, el día 8 del protocolo, el número de células con Cuerpos de Heinz fue similar al control en todas las dosis de FHZ estudiadas (Figura 10).

La observación de los extendidos sanguíneos de ratones tratados con FHZ mostró abundante destrucción de eritrocitos, detritus celular e intensa poiquilocitosis y anisocitosis, sin observarse cambios dependientes de la concentración de FHZ (Figura 11). Por el contrario, los extendidos sanguíneos pertenecientes a ratones no anémicos no presentaron cambios en la serie eritrocitaria (Figura 11). La observación de la serie leucocitaria no mostró alteraciones en animales anémicos y no anémicos.

Mediante el análisis de los parámetros hematológicos pudimos determinar que la dosis de 60 mg/kg fue la concentración de FHZ que indujo la crisis hemolítica más severa, sin comprometer la supervivencia de los animales.

El grado de daño oxidativo producido por la concentración de 60 mg FHZ/kg peso se puso en evidencia principalmente por el elevado número de eritrocitos con Cuerpos de Heinz. La respuesta compensadora destinada a restaurar la actividad del eritrón se evidenció por el elevado número de Reticulocitos.

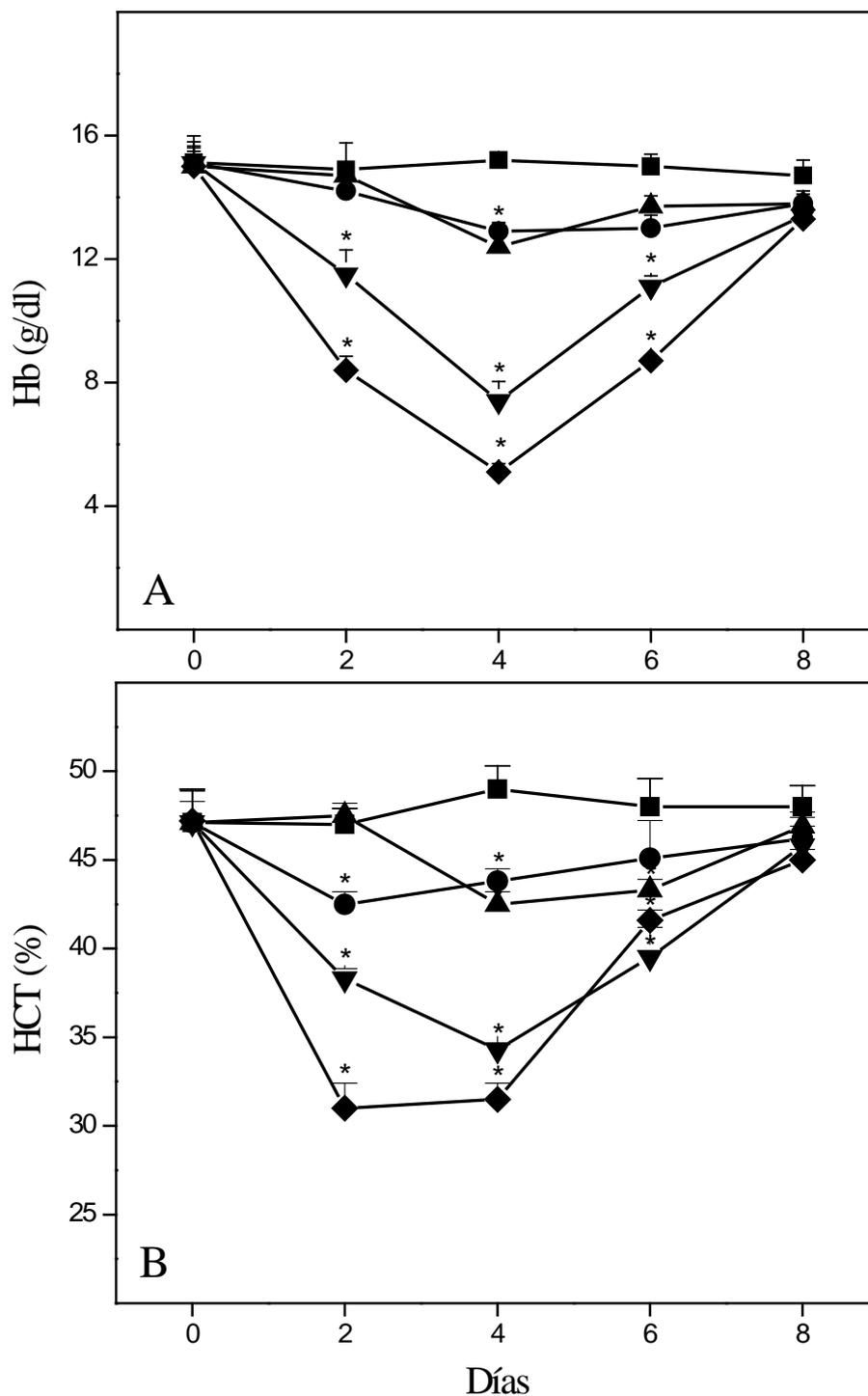


Figura 9. Hemoglobina y Hematocrito de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Dosis de FHZ: 10 mg/Kg (●); 20 mg/Kg (▲); 60 mg/Kg (▼); y 100 mg/Kg (◆). Dosis de solución salina: NaCl 0,9 %: (■). Disminución de Hb (A) y HCT (B) en los ratones Anémicos los días 2 y 4 retornando a valores basales el día 6 (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

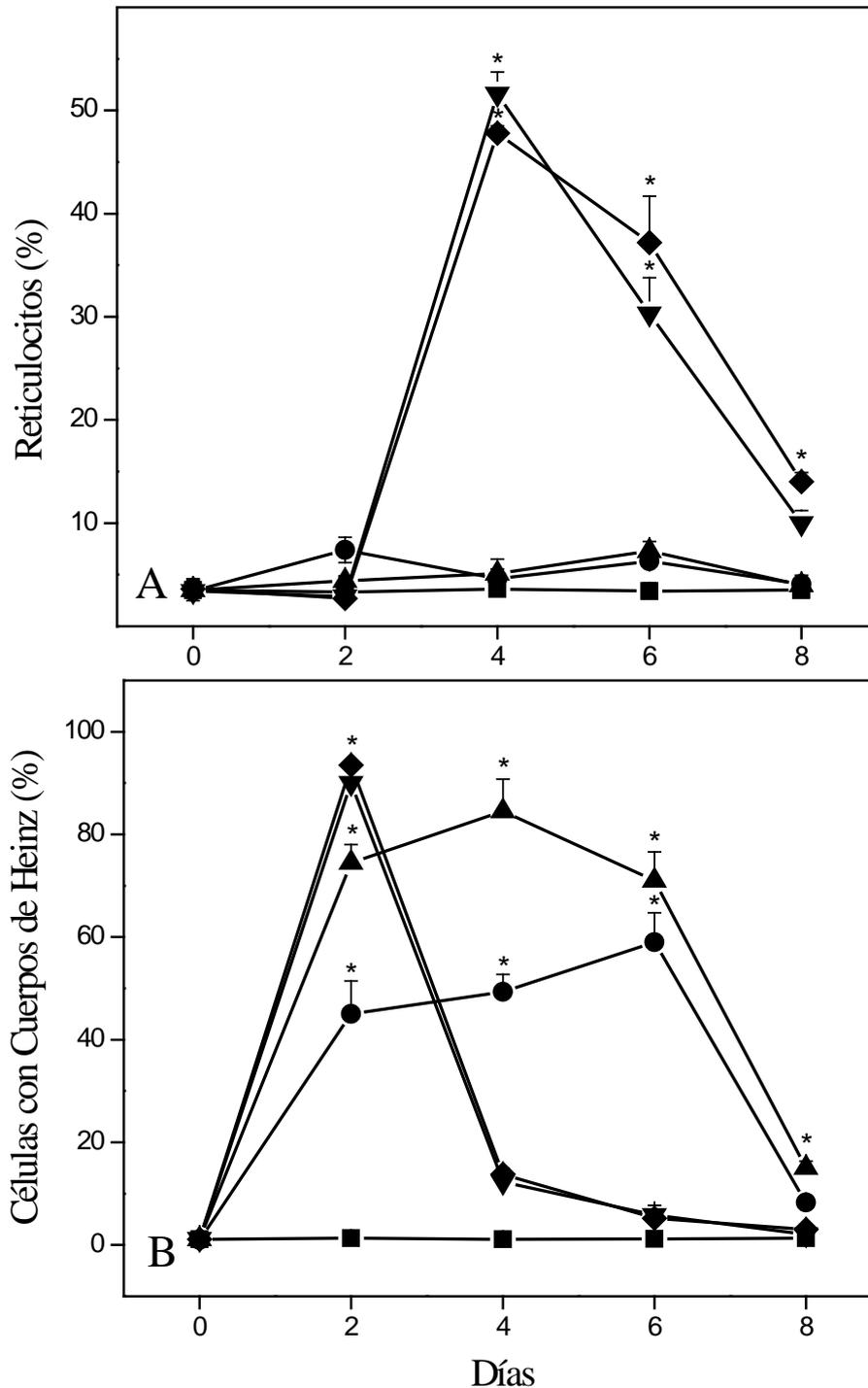


Figura 10. Recuento de Reticulocitos y Células con Cuerpos de Heinz de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Dosis de FHZ: 10 mg/Kg (●); 20 mg/Kg (▲); 60 mg/Kg (▼); y 100 mg/Kg (◆). Dosis de solución salina: NaCl 0,9 %: (■). Incremento en el Recuento de Reticulocitos los días 4 y 6 en las dosis de 60 y 100 mg/kg peso (A) (n=4). Incremento en el número de Células con Cuerpos de Heinz en todas las dosis testeadas (día 2), y disminución el día 4 en las dosis de 60 y 100 mg/kg (B) (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (p < 0.05). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

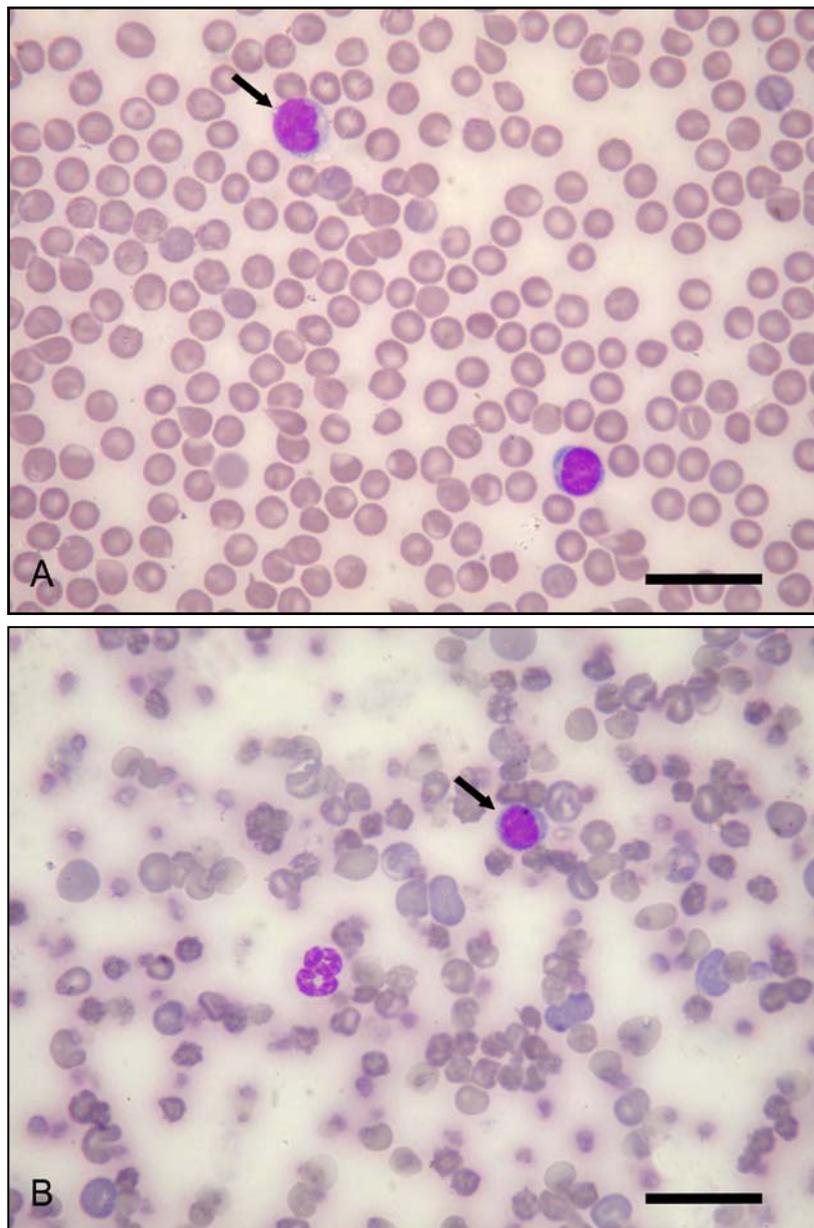


Figura 11. Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ ó se trataron con solución salina. Los extendidos sanguíneos se colorearon con May Grünwald-Giemsa (n=4). No Anémicos (A): Morfología eritrocitaria típica sin alteraciones en la serie leucocitaria. Anémicos día 2 (B): Cambios estructurales en la serie eritrocitaria, sin cambios en la serie leucocitaria. Leucocito (flecha). X 1000 (A, B). Escala: 30 μm

1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA

Una vez establecida la concentración óptima de FHZ (60 mg/kg) que induce Anemia Hemolítica aguda sin afectar la sobrevivencia del ratón, se avanzó con las pruebas hematológicas y se encararon estudios morfológicos y ultraestructurales.

Con este objetivo, se implementó el siguiente protocolo experimental en el que se administró una dosis única de FHZ. Los animales fueron divididos en dos grupos: a) Anémicos (n=18): recibieron 60 mg/kg de Fenilhidrazina i.p. (0,5 ml) los días 0 y 2; b) No Anémicos (n=18): recibieron salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. (0,5 ml) los días 0 y 2. Cada dos días y hasta el día 8 se extrajeron muestras sanguíneas para los siguientes estudios hematológicos: Hb, HCT, recuento de Reticulocitos, de células con Cuerpos de Heinz, de Eritrocitos y determinación de los Índices Hematimétricos (n=6). La morfología de células sanguíneas se evaluó en extendidos sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa. Los mismos días, un lote de cada grupo de animales (n=3) fue sacrificado y se realizó la disección de los órganos, que fueron procesados para estudios morfológicos y ultraestructurales.

Dado que se utilizaron 2 grupos de trabajo, se realizó un diseño experimental Pareado donde los animales se aparearon antes de la administración del tratamiento, de manera que cada par tuviera la mayor homogeneidad posible. El criterio utilizado para armar los pares fue el peso y la edad. Con este tipo de estudio se redujeron al mínimo las diferencias existentes entre los pares, por lo que las diferencias estadísticas halladas entre tratamientos reflejaron solamente el efecto del tratamiento en estudio.

Para iniciar el análisis estadístico se determinó la Homocedasticidad y Normalidad de las variables en estudio (Materiales y Métodos). El análisis de varianza (ANOVA) en 1 vía utilizando un $\alpha=0,05$ determinó la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos. En este diseño no fue necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples, ya que al trabajar con 2 grupos solamente, la existencia de diferencias estadísticamente significativas indica que un tratamiento es diferente respecto al otro.

1.2.1. EVALUACIÓN DE ERITROPOYESIS EN LA ANEMIA HEMOLÍTICA

ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS

Los cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos en la Anemia Hemolítica inducida por FHZ se muestran en la Tabla 1. El recuento de células con Cuerpos de Heinz, indicativo de daño oxidativo eritrocitario, mostró un notorio incremento los días 2 y 4 del protocolo experimental, pudiéndose evidenciar abundantes células con Cuerpos de Heinz en circulación (Figura 12).

Se pudo observar un marcado aumento en el número de Reticulocitos en ratones Anémicos el día 4 del protocolo experimental, comportamiento asociado al incremento del Volumen Corpuscular Medio (VCM) desde el día 4. La presencia de Reticulocitos en sangre periférica también se puso en evidencia en los extendidos sanguíneos coloreados con colorante supravital. Se pudieron observar Reticulocitos con variada cantidad de precipitados de ARN de acuerdo a su madurez, ya sea focalizados en una pequeña zona de la célula o cubriéndola casi en su totalidad (Figura 12).

Por otro lado, en los ratones Anémicos se observó un elevado valor de Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) el día 4, que podría ser interpretado como producto de la excesiva hemólisis intravascular. Luego, la HCM mostró una tendencia a retornar a valores basales los días 6 y 8. Finalmente, el día 8 del protocolo experimental todos los parámetros mostraron una tendencia a normalizarse.

Por otro lado, durante la crisis hemolítica los extendidos sanguíneos de los animales tratados con FHZ mostraron marcada destrucción eritrocitaria y alteraciones de la serie roja como anisocitosis, poiquilocitosis y policromasia (Figura 13), cambios que se atenuaron en la etapa de recuperación posthemólisis.

De la observación de la fórmula leucocitaria de los ratones Anémicos y No Anémicos (control) se deduce que no hay cambios en la serie leucocitaria durante el desarrollo del procedimiento experimental (Figura 13).

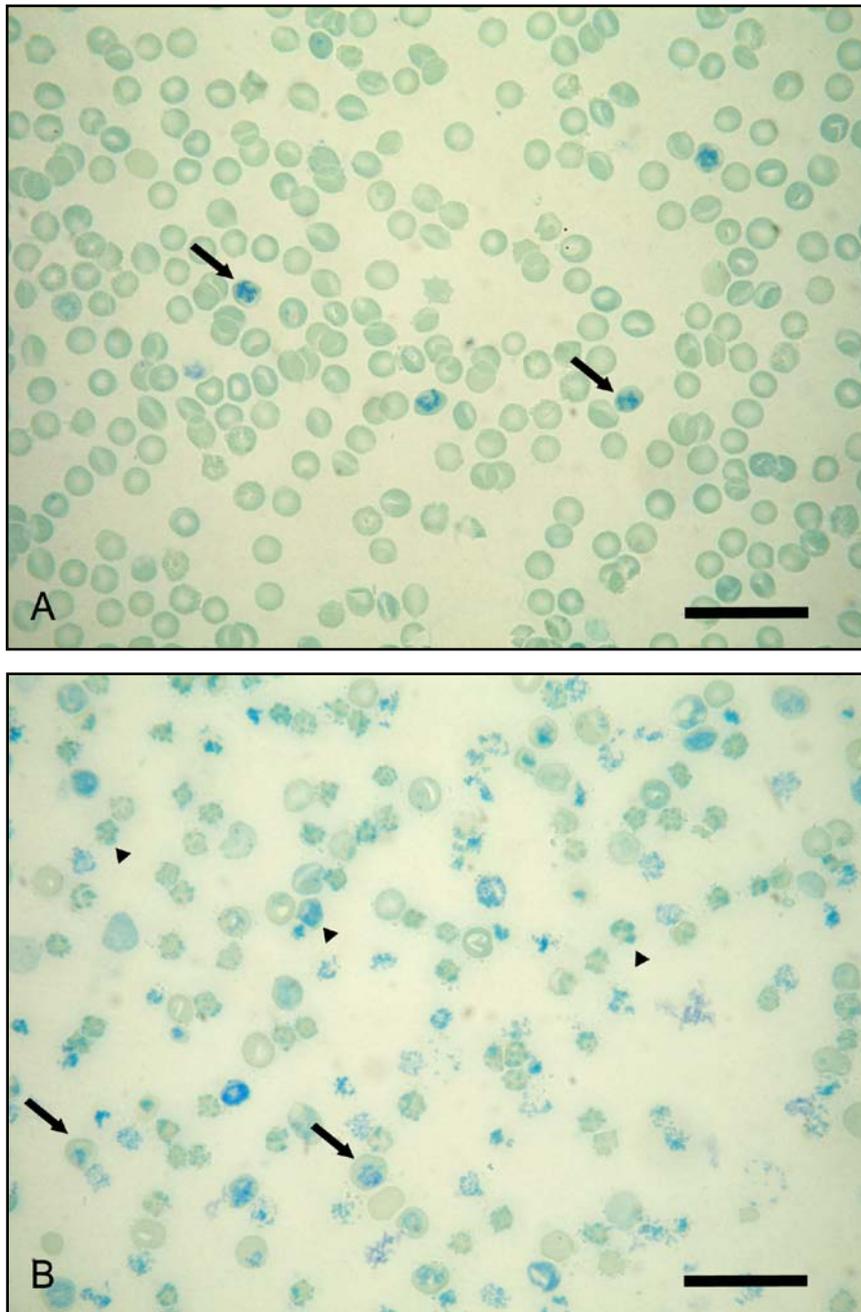


Figura 12. Extendidos sanguíneos de ratones No Anémicos y Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ o se trataron con solución salina. Los reticulocitos se colorearon con Azul Brillante de Cresilo (n=6). No Anémico (A): Eritrocitos con morfología de disco bicóncavo y reticulocitos (flecha). Anémico día 4 (B): Destrucción eritrocitaria, aumento de reticulocitos (flecha) y presencia de células con Cuerpos de Heinz (cabeza de flecha). X 1000 (A, B). Escala: 30 µm

Parámetro	Control Día 0	Experimental Día 2	Experimental Día 4	Experimental Día 6	Experimental Día 8
Hb (g/dL)	15.1 ± 0.50	11.5 ± 0.80	7.4 ± 0.63	11.1 ± 0.35	14.4 ± 0.6
ER (x10 ¹² /L)	8.1 ± 1.5	7.4 ± 1.4	5.2 ± 1.9	6.4 ± 1.8	7.9 ± 1.2
HCT (%)	47.0 ± 1.8	38.3 ± 0.57	34.3 ± 0.28	39.5 ± 1.7	45.8 ± 1.1
VCM (fL)	51.5 ± 3.5	57.4 ± 3.9	60.9 ± 4.2	81.0 ± 3.5	69.0 ± 2.4
HCM (pg)	18.1 ± 2.6	27.7 ± 2.7	32.3 ± 2.8	26.8 ± 2.9	23.2 ± 2.1
Reticulocitos (%)	3.4 ± 1.2	2.9 ± 0.84	51.6 ± 2.12	30.3 ± 3.5	10.0 ± 1.2
Cuerpos de Heinz (%)	1.2 ± 1.2	90.0 ± 3.2	12.3 ± 0.98	5.8 ± 1.96	2.1 ± 1.2

Tabla 1. Parámetros Hematológicos en Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Los datos se expresan como la media ± desvío estándar (P <0.05). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

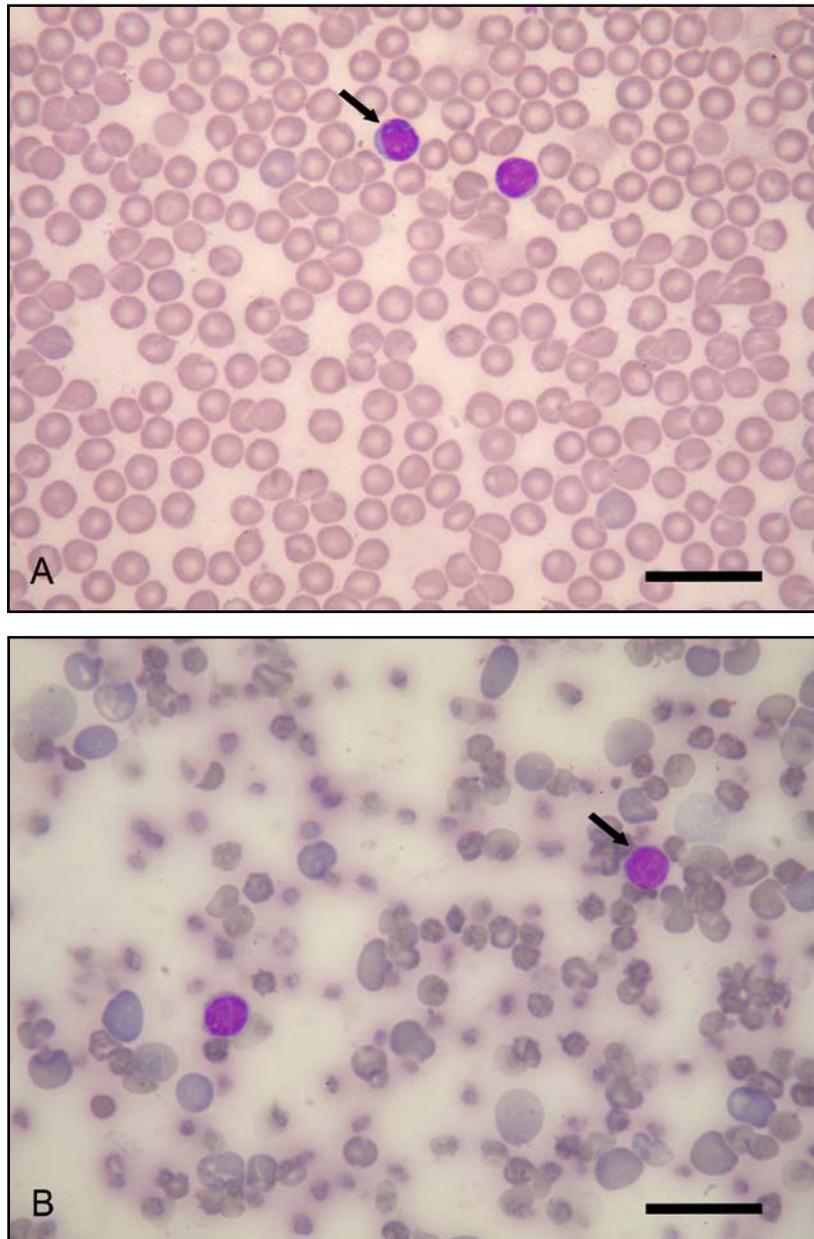


Figura 13. Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ ó se trataron con solución salina. Los extendidos sanguíneos se colorearon con May Grünwald-Giemsa (n=6). No Anémicos (A): Morfología eritrocitaria de disco bicóncavo sin alteraciones en la serie leucocitaria. Anémicos día 2 (B): Destrucción eritrocitaria, anisocitosis y poiquilocitosis, sin cambios en la serie leucocitaria. Leucocito (flecha). X 1000 (A, B). Escala: 30 μ m

1.2.2. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS EXTRAMEDULAR

1.2.2.a. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Los estudios morfológicos de bazo, hígado y riñón, nos permitieron evaluar el compromiso de órganos extramedulares en la recuperación de eritrón en la etapa post-crisis hemolítica.

En primer término realizamos la evaluación estructural de los órganos de los ratones No Anémicos y en todos los casos se observó la homogeneidad celular característica de animales en buen estado general de salud.

La Figura 14A muestra la arquitectura del bazo organizada en dos estructuras bien definidas, pulpa blanca y la pulpa roja. El hígado muestra la disposición característica de cordones de hepatocitos entre los sinusoides hepáticos, sin detectarse alteraciones morfológicas (Figura 14B). El riñón mostró las estructuras glomerulares y tubulares que identifican a las nefronas con morfología característica del tejido sano (Figura 14C).

Cuando se evaluaron los tejidos de ratones Anémicos se observaron cambios estructurales bien definidos que describiremos a continuación. El bazo de ratones Anémicos, mostró marcada hiperplasia eritroide con abundante congestión eritrocítica en la pulpa roja, depósitos de hemosiderina y elevado número de megacariocitos y macrófagos tisulares los días 4 y 6 (Figura 15). También se vio intensa esplenomegalia, siendo marcada el día 4 (Tabla 2). Los cambios en el peso del riñón coincidieron temporalmente con el bazo, aunque fueron de menor magnitud. El hígado también mostró variaciones en su peso, observándose los valores más elevados el día 6 (Tabla 2).

Como indicador de la respuesta eritropoyética al estímulo hipóxico de la anemia, fue decisiva la identificación de Islotes Eritroblásticos en los órganos estudiados. En el bazo estas estructuras celulares se localizaron principalmente en la pulpa roja. Otro hallazgo de estos estudios histológicos fue la observación de Islotes Eritroblásticos en el hígado y riñón donde se los identificó asociados principalmente a vasos sanguíneos (Figura 15). Cuando se evaluó la morfología y disposición de los Islotes Eritroblásticos se vieron

marcadas diferencias tejido específicas, ya que en hígado y riñón los Islotes mostraron organización nodular, mientras que en bazo fueron difusos o no-nodulares.

A partir de estas observaciones histológicas decidimos cuantificar los Islotes Eritroblásticos mediante un score preestablecido según se describe en Materiales y Métodos. Este procedimiento fue útil para analizar con mayor precisión la relación entre Islotes Eritroblásticos y la magnitud de la eritropoyesis y de esta manera determinar el grado de compromiso de los órganos extramedulares en la restauración posthemólisis de la eritropoyesis.

Como se muestra en la Tabla 3, el bazo mostró un aumento en el número de Islotes Eritroblásticos desde el día 4, alcanzando el mayor número el día 6. El hígado mostró una respuesta temporal similar al bazo, mostrando el mayor recuento de Islotes hacia el día 6, aunque la intensidad de dicha respuesta fue menor. La evaluación histológica del riñón mostró un menor número de Islotes, evidenciándose el mayor número el día 6 del protocolo, sugiriendo menor compromiso eritropoyético de este tejido.

Parámetro	Control Día 0	Experimental Día 2	Experimental Día 4	Experimental Día 6	Experimental Día 8
Peso (mg)					
Bazo	100 ± 30	310 ± 40	580 ± 50	460 ± 40	150 ± 30
Hígado	1320 ± 30	2000 ± 30	1850 ± 40	2200 ± 30	1500 ± 40
Riñón	200 ± 20	230 ± 10	360 ± 30	245 ± 10	230 ± 15

Tabla 2. Peso del Bazo, Hígado y Riñón de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Los datos se expresan como la media ± desvío estándar ($p < 0,05$). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

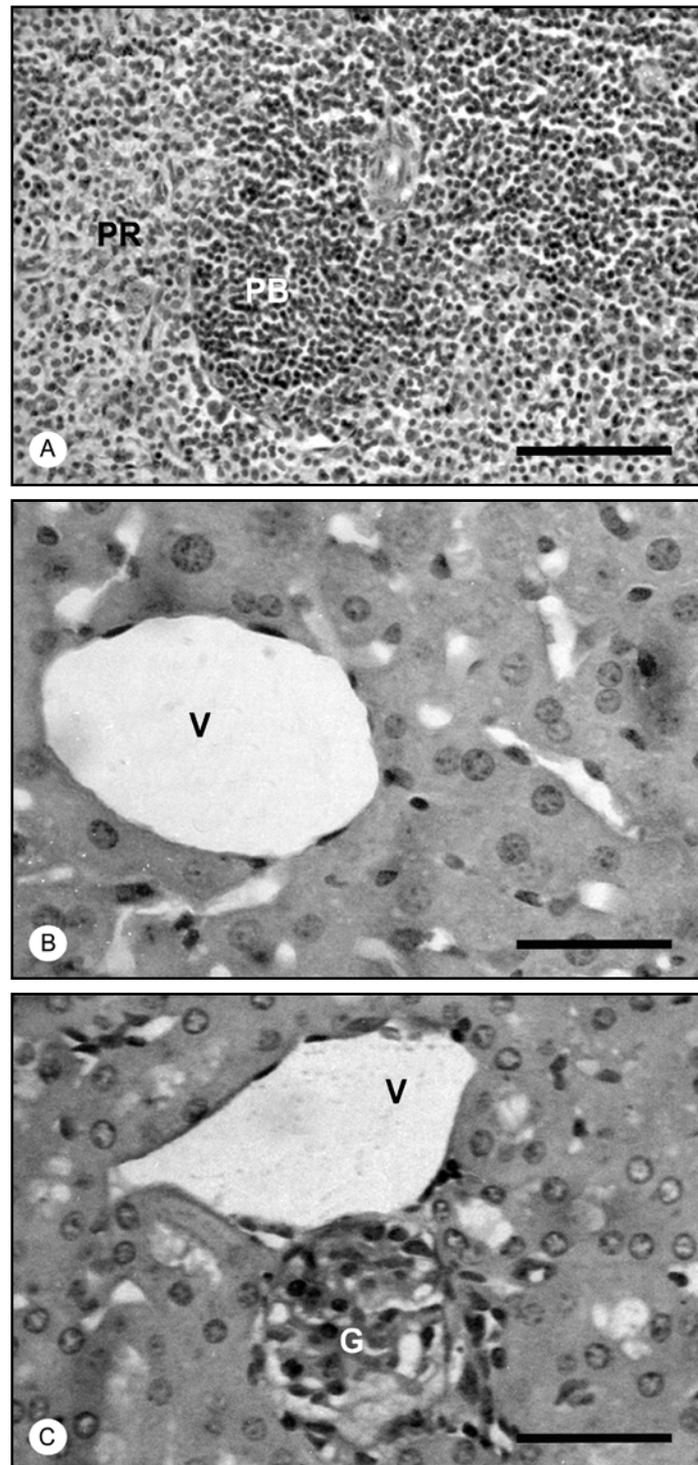


Figura 14. Bazo, Hígado y Riñón de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales No Anémicos (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra uniformidad celular en Tejido Esplénico (A), Hepático (B) y Renal (C). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca; V: Vaso sanguíneo, G: Glomérulo. X 50 (A), X 450 (B, C). Escala: 300 μ m (A), 30 μ m (B, C). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

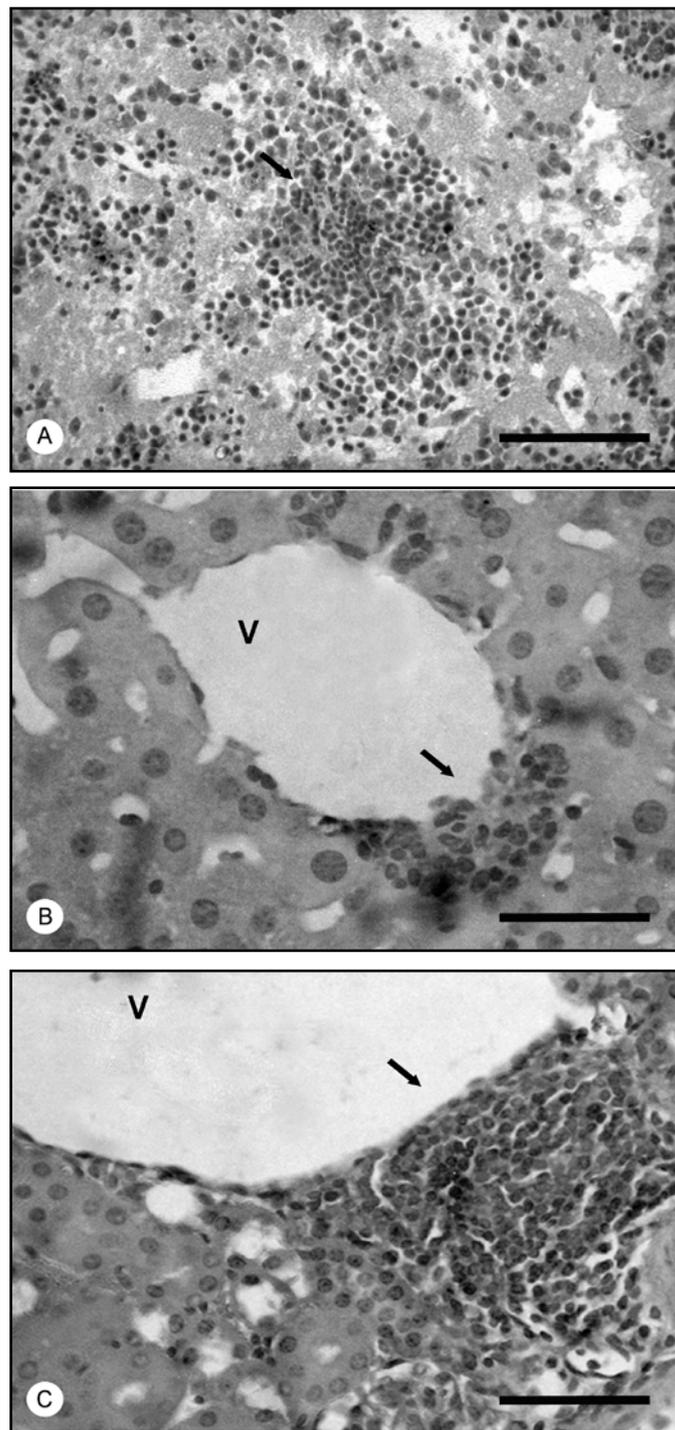


Figura 15. Bazo, Hígado y Riñón de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) (día 6) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Bazo (A): Hiperplasia eritroide e Islotes Eritroblásticos difusos (flecha). Hígado (B): Islotes Eritroblásticos nodulares, asociados a vaso sanguíneo (flecha). Riñón (C): Islotes Eritroblásticos nodulares, asociados a vaso sanguíneo (flecha). V: Vaso sanguíneo. X 50 (A), X 450 (B, C). Escala: 300 μ m (A), 30 μ m (B, C). (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

	Días	Control	Experimental
Bazo	0	+	+
	4	+	++
	6	+	++++
Hígado	0	+	+
	4	+	++
	6	+	+++
Riñón	0	+	+
	4	+	+
	6	+	++

Tabla 3. Cuantificación de Islotes Eritroblásticos en Tejido Esplénico, Hepático y Renal de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) (día 6) fue y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. La cuantificación de los islotes se realizó según se describe en Materiales y Métodos (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

1.2.2.b. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Los cambios estructurales descritos en el bazo son característicos de la Anemia Hemolítica y reflejan la conocida función hemocaterética esplénica. Para avanzar en el conocimiento de la relación estructural y funcional del bazo en el modelo de Hemólisis encaramos estudios ultraestructurales mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El bazo de ratones sin tratamiento (No Anémicos) mostró el entretejido reticular que caracteriza a este tejido (Figura 16). Los eritrocitos se observan con su típica morfología bicóncava, principalmente asociados al tejido fibroso, como así también eritrocitos atravesando trabéculas esplénicas y destacando su flexibilidad (Figura 16 B, C).

El efecto oxidativo de la FHZ sobre las estructuras celulares y tisulares se evidenció en el tejido esplénico de ratones Anémicos los días de severa hemólisis (día 3 y 4). Se

vieron importantes alteraciones del parénquima y abundantes eritrocitos con inclusiones en la membrana, denominadas Cuerpos de Heinz (Figura 17A).

La minuciosa observación de imágenes de barrido posibilitó captar la transformación de eritrocitos bicóncavos en células con Cuerpos de Heinz y luego la posterior transición a eritrocitos dañados por la actividad lítica esplénica, conocida como “picoteo” esplénico (Figura 17B). Se observaron, además eritrocitos con morfología de esferocitos, severamente dañados por el Sistema Retículo Endotelial (Figura 17C).

Cuando los parámetros hematológicos mostraron una tendencia a la recuperación de la anemia (día 7 del protocolo experimental), la ultraestructura del bazo evidenció mayor homogeneidad celular, con células de la serie roja con su morfología habitual (Figura 18).

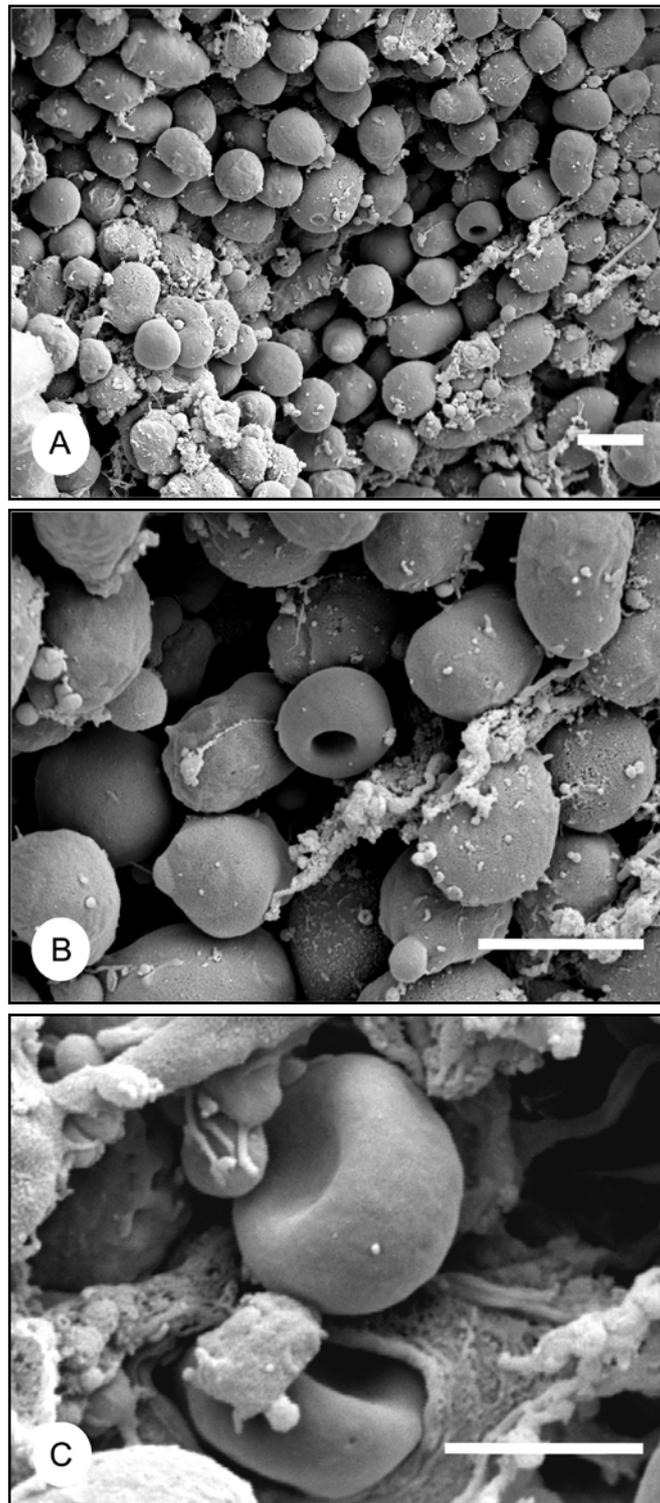


Figura 16. Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido fue procesado para SEM según se describe en Materiales y Métodos. Celularidad normal (A) y típicos eritrocitos bicóncavos (B, C). X 6000 (A), X 15000 (B), X 18000 (C). Escala: 2 μ m. (Roque M y col. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

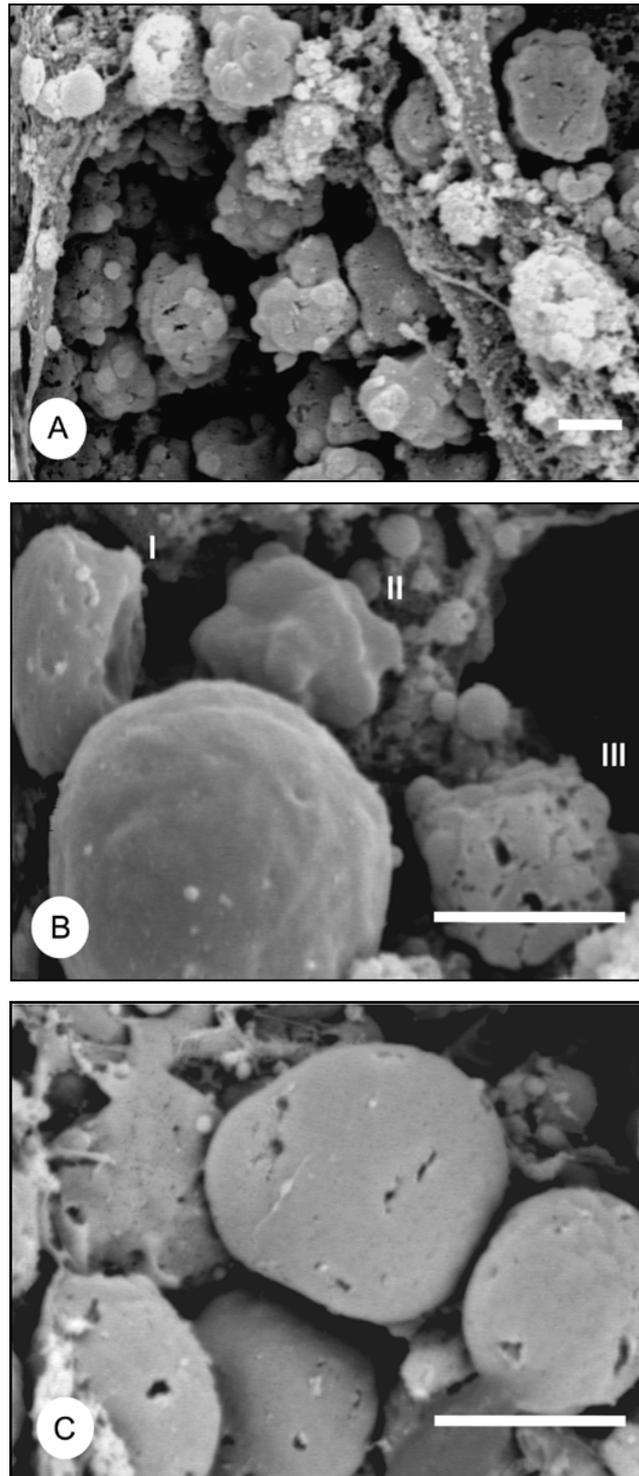


Figura 17. Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) (día 4) fue sacrificado y el bazo fue procesado para SEM según se describe en Materiales y Métodos. En A se muestran abundantes eritrocitos con Cuerpos de Heinz. En B se muestran los estadios de la transformación de eritrocitos (I) en células con protuberancias (II) y células dañadas por el “picoteo” esplénico (III). En C se muestran eritrocitos con morfología de esferocitos, dañados por el SRE. X 10000 (A), X 18000 (B, C). Escala: 2 μ m. (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008).

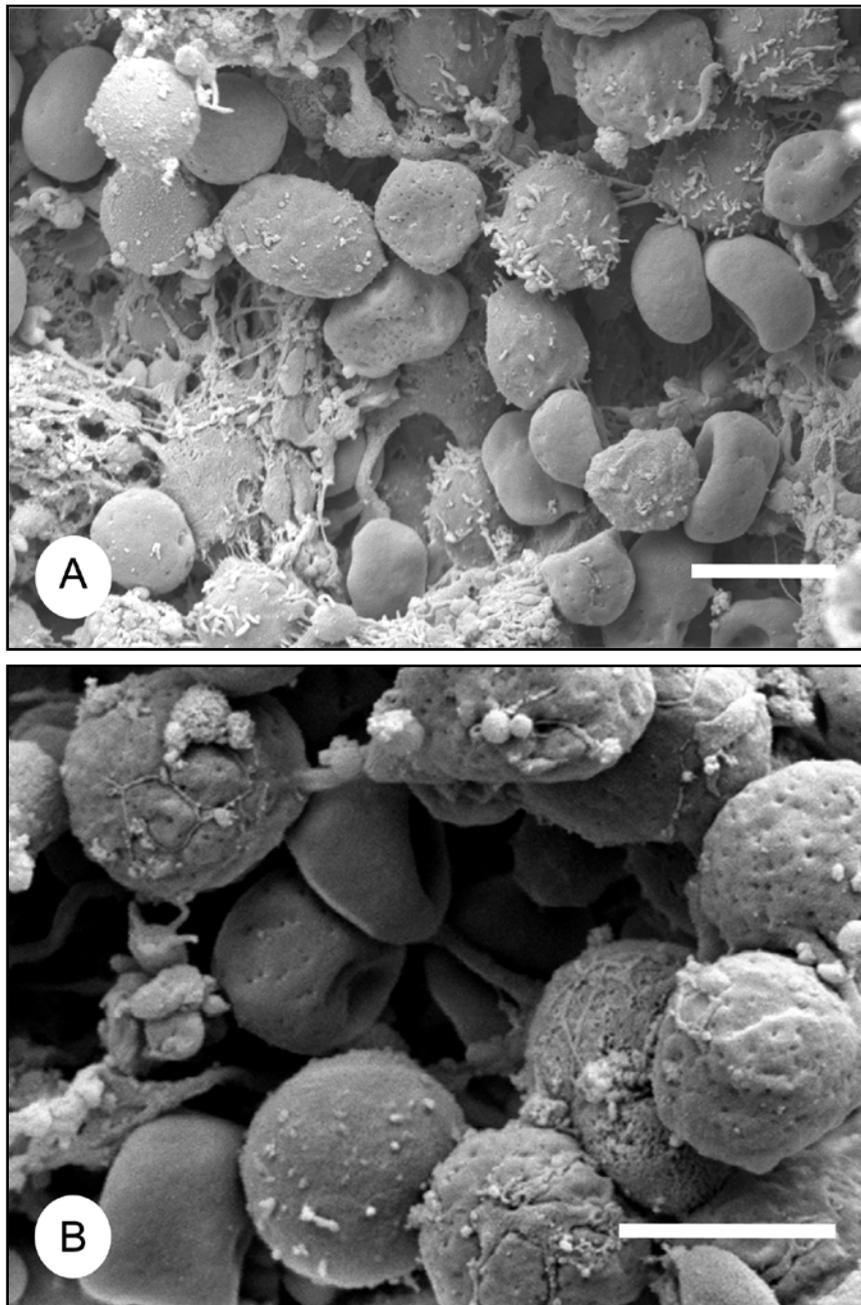


Figura 18. Microscopía Electrónica de Barrido del Parénquima Esplénico de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) (día 7) fue sacrificado y el bazo fue procesado para SEM según se describe en Materiales y Métodos. Se muestran eritrocitos re-estableciendo su morfología normal. X 10000 (A), X 15000 (B). Escala: 2 μ m. (Roque M et al. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2008)

2. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA CON INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ERITROPOYESIS

El modelo de inhibición farmacológica de la eritropoyesis se diseñó para avanzar en el conocimiento de la respuesta eritropoyética frente a la Anemia Hemolítica, en condiciones de inhibición del eje Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA).

2.1 DESARROLLO DEL MODELO

De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, los ratones hembras CF1 se dividieron en 3 grupos: a) No Anémicos (Control) (n=20): solución salina estéril i.p. (NaCl 0,9 %) diariamente, entre los días 0 y 9, y los días 10 y 12; b) Anémicos (n=20): solución salina estéril i.p. (NaCl 0,9 %) diariamente, entre los días 0 y 9; y Fenilhidrazina (FHZ) 60 mg/kg peso i.p. los días 10 y 12; c) Tratados con Enalapril + Inducción de Anemia (n=20): dosis de Enalapril 10 mg/kg peso i.p. diariamente entre los días 0 y 9; y FHZ 60 mg/kg peso i.p. los días 10 y 12.

La instauración de la anemia y la recuperación de la eritropoyesis se evaluaron entre el día 0 y 20 mediante parámetros hematológicos convencionales (n=4). La morfología de las células sanguíneas se observó en extendidos de sangre periférica coloreados con May Grünwald-Giemsa.

Los días 0, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 un lote de animales (n=3) fue sacrificado y los tejidos fueron removidos para estudios histológicos.

Debido al número de grupos de trabajo se realizó un diseño experimental en Bloques, donde los bloques fueron segregados según el peso de los animales y su ubicación en el Bioterio. Este criterio de segregación permitió homogeneizar el peso, y variables como la temperatura y humedad dentro de cada bloque.

Para iniciar el análisis estadístico se determinó la Homocedasticidad y Normalidad de las variables en estudio (Materiales y Métodos). El análisis ANOVA en 2 vías, utilizando un $\alpha=0,05$, determinó la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, mediante un análisis de comparaciones múltiples, Tukey modificado, utilizando un $\alpha=0,05$, se determinaron los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

2.2. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS

2.2.1. ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS

En la Figura 19 se muestran los cambios en los parámetros hematológicos de ratones tratados con FHZ más Enalapril, y de los ratones tratados con FHZ sin Enalapril.

El tratamiento con Enalapril produjo una disminución en los valores de Hb y HCT desde el día 4 del protocolo, comportamiento que fue más evidente a los 10 días de tratamiento (Figura 19). Desde el día 10 del protocolo experimental se vio un marcado descenso estadísticamente significativo en Hb y HCT, principalmente entre los días 12 y 14, lo que indica la presencia de una marcada destrucción eritrocitaria y la instauración de la anemia (Figura 19).

A partir del día 16 comenzó la recuperación de la anemia, comportamiento evidenciado por el incremento en los valores de Hb y HCT en ambos grupos tratados con FHZ. Es importante mencionar que en esta etapa del protocolo se vieron los cambios más significativos entre ratones tratados con FHZ + Enalapril, y ratones tratados con FHZ sin Enalapril. El análisis de los parámetros hematológicos mostró que la Hb y HCT de los tratados con Enalapril + FHZ retornaron a valores basales el día 20, mientras que en los tratados con FHZ sin Enalapril este comportamiento se vio desde el día 18 (Figura 19). Los parámetros de los animales inyectados con solución salina no mostraron cambios significativos durante los 20 días.

La observación de los extendidos sanguíneos también puso en evidencia la crisis hemolítica en ambos grupos anémicos, tratados y sin tratar con Enalapril, entre los días 12 y 14 (Figura 20). Se observó una disminución del número de eritrocitos y presencia de restos celulares producto de la intensa destrucción celular. Se pudieron ver además, alteraciones eritrocitarias características del proceso hemolítico, como presencia de eritrocitos de forma y tamaño irregular, como así también policromasia (Figura 20).

A partir del día 16 del protocolo experimental, las alteraciones estructurales de la serie eritrocitaria disminuyeron aunque se mantuvo policromasia marcada, sin observarse diferencias entre animales tratados con Enalapril más FHZ y tratados con FHZ sin Enalapril. La serie leucocitaria no mostró cambios en los animales durante el desarrollo de la experiencia.

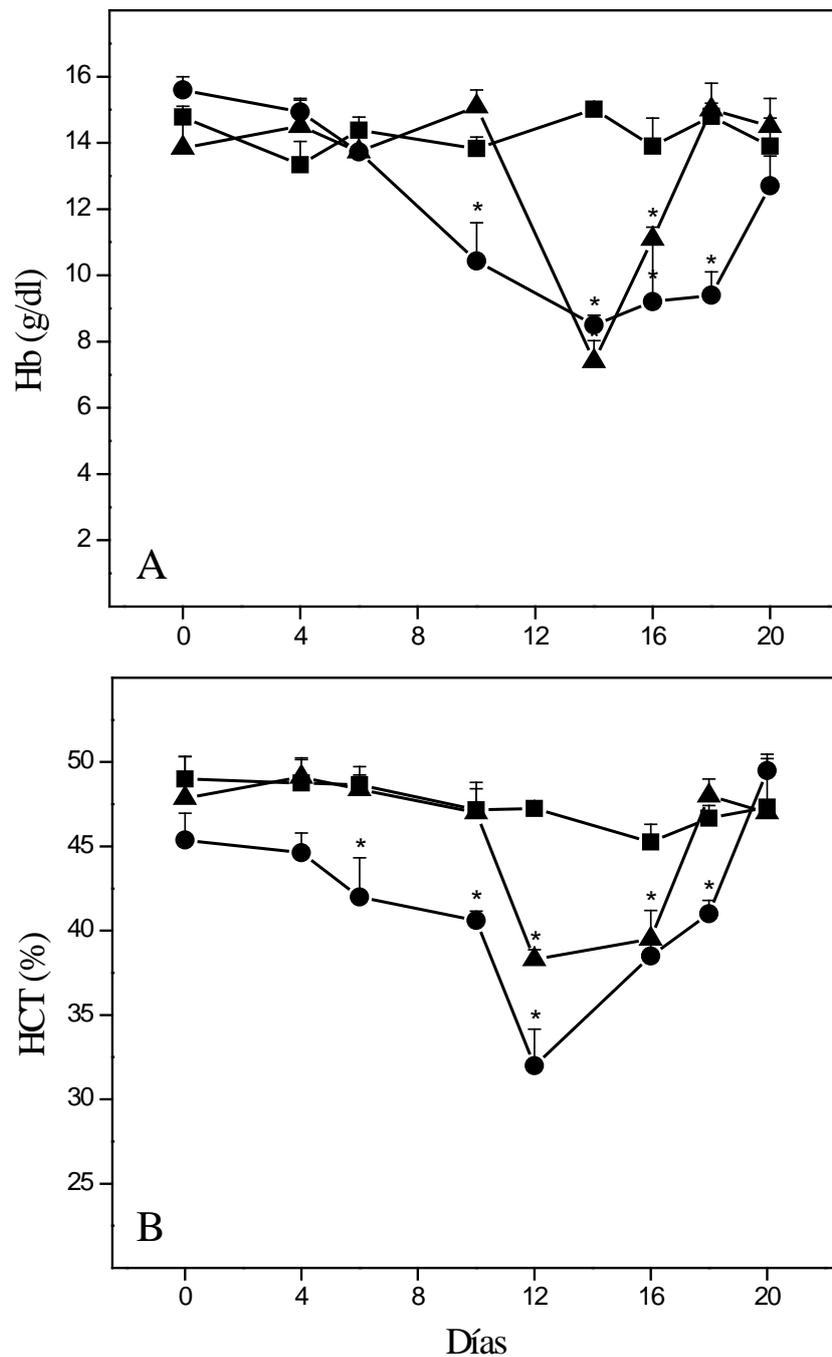


Figura 19. Hemoglobina y Hematocrito de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril. Ratones hembras tratados con Enalapril + FHZ: ●; y ratones sin tratar con Enalapril y tratados con FHZ: ▲. Se muestra una disminución en HCT y Hb de ratones tratados con Enalapril. Los valores de Hb y HCT se normalizaron el día 18 en los tratados con FHZ sin Enalapril, mientras que esto ocurrió el día 20 en los tratados con FHZ + Enalapril (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

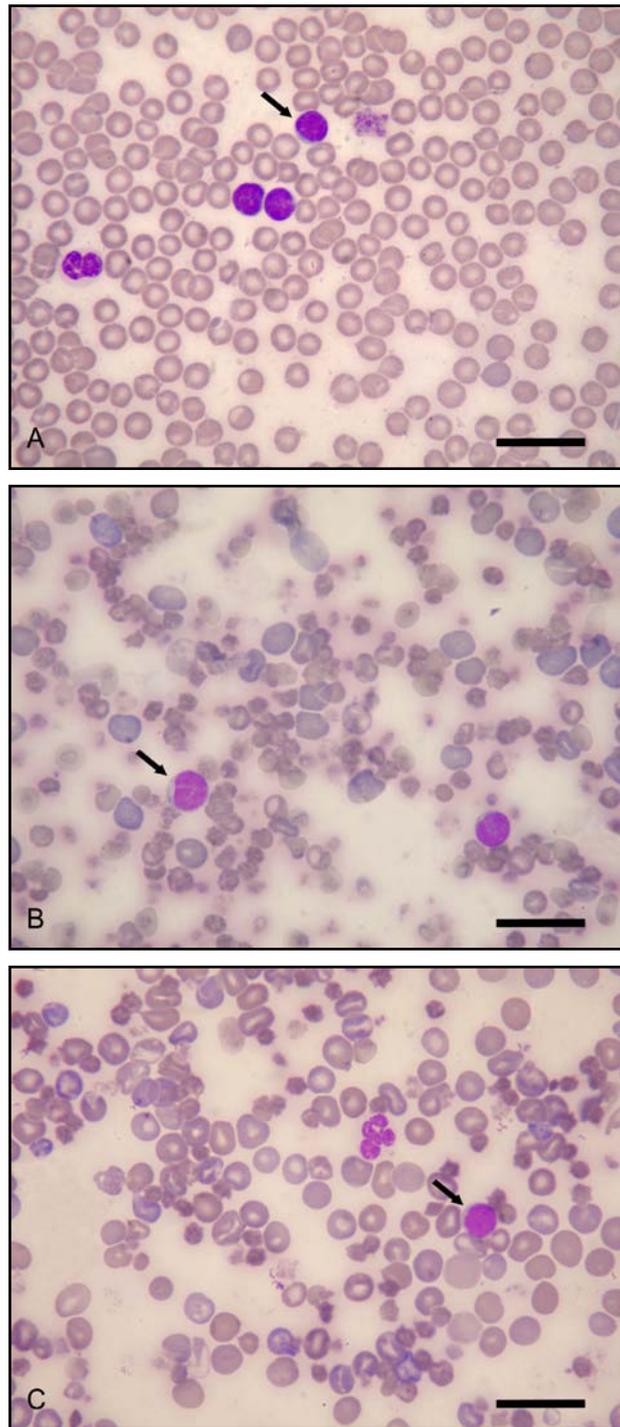


Figura 20. Fórmula Leucocitaria de ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril. Los extendidos sanguíneos se colorearon con May Grünwald-Giemsa según se describe en Materiales y Métodos (n=4). En A se muestra morfología eritrocitaria típica (día 0). En B se muestra intensa lisis celular y alteraciones de la serie eritrocitaria como anisocitosis y poiquilocitosis (día 12). En C se muestra tendencia a la restauración de la morfología eritrocitaria (día 16). No se observan cambios en la serie leucocitaria. Leucocito: flecha. X 1000 (A, B, C). Escala: 30 μ m.

2.3. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS EXTRAMEDULAR

ESTUDIOS ESTRUCTURALES

2.3.1. MORFOLOGÍA DE TEJIDOS

La estructura macroscópica del bazo, hígado y riñón de ratones No Anémicos (control) no mostró alteraciones en el modelo de Anemia Hemolítica con Inhibición Farmacológica de la Eritropoyesis y el análisis histológico mostró uniformidad celular con morfología conservada (Figura 21).

Cuando se estudiaron los cambios macroscópicos y microscópicos en tejidos de ratones tratados con FHZ y tratados con Enalapril + FHZ se vieron los resultados más relevantes.

En ambos grupos Anémicos, el bazo mostró evidentes cambios macroscópicos como una marcada esplenomegalia, principalmente el día 16.

Los estudios histológicos realizados en el bazo de los animales tratados con FHZ sin Enalapril mostraron excesiva congestión eritrocítica, expansión de la pulpa roja, presencia de hemosiderina, macrófagos y abundantes megacariocitos, principalmente entre los días 12 y 16 (Figura 22 A). Estos cambios ocasionaron alteraciones en la típica organización de la pulpa roja. Asimismo, el tejido esplénico de los ratones tratados con Enalapril + FHZ mostró un comportamiento similar, pero principalmente entre los días 14 y 18 (Figura 22 B).

Por otro lado, durante los días de intensa hemólisis se observaron Islotes Eritroblásticos con organización difusa en tejido esplénico de ratones tratados con FHZ sin Enalapril y tratados con Enalapril + FHZ (Figura 22).

Durante la etapa de recuperación del estado anémico se vieron los principales cambios entre tejido esplénico de ratones tratados con FHZ sin Enalapril y los tratados con Enalapril + FHZ, observándose una diferencia temporal en la respuesta de ambos grupos de animales. Hacia el día 18 del protocolo experimental la estructura de la pulpa roja se reestructuró en los animales tratados con FHZ sin Enalapril, mientras que en los tratados con Enalapril + FHZ la reorganización del tejido se evidenció el día 20. En

ambos casos, se recuperó la estructura del bazo, mostrando las características morfológicas que presentaron los animales No Anémicos (Figura 23).

Los resultados que reflejarían la participación del riñón en la recuperación de la eritropoyesis posthemólisis fueron alentadores. En los ratones tratados con FHZ sin Enalapril se vieron abundantes Islotes Eritroblásticos, con disposición perivascular y organización nodular, cambios observados principalmente entre los días 14 y 18. Cuando se evaluó el riñón de los ratones tratados con Enalapril + FHZ también se observaron Islotes Eritroblásticos con localización perivascular y organización nodular. La principal diferencia con respecto al tejido de animales tratados con FHZ sin Enalapril fue el rango temporal de la respuesta, ya que en los ratones tratados con Enalapril + FHZ los Islotes se identificaron principalmente entre los días 18 y 20 del protocolo experimental (Figura 24). En ambos casos no se observaron alteraciones de la estructura del riñón.

La evaluación de la relación estructural y funcional del hígado de ratones tratados con FHZ sin Enalapril mostró uniformidad celular, morfología conservada e islotes eritroblásticos nodulares con localización perivascular (Figura 25A). Sin embargo, el hígado de los ratones tratado con Enalapril + FHZ mostró morfología celular alterada con anormalidades citoplasmáticas y nucleares entre los días 16 y 20, sin evidenciarse Islotes Eritroblásticos (Figura 25B).

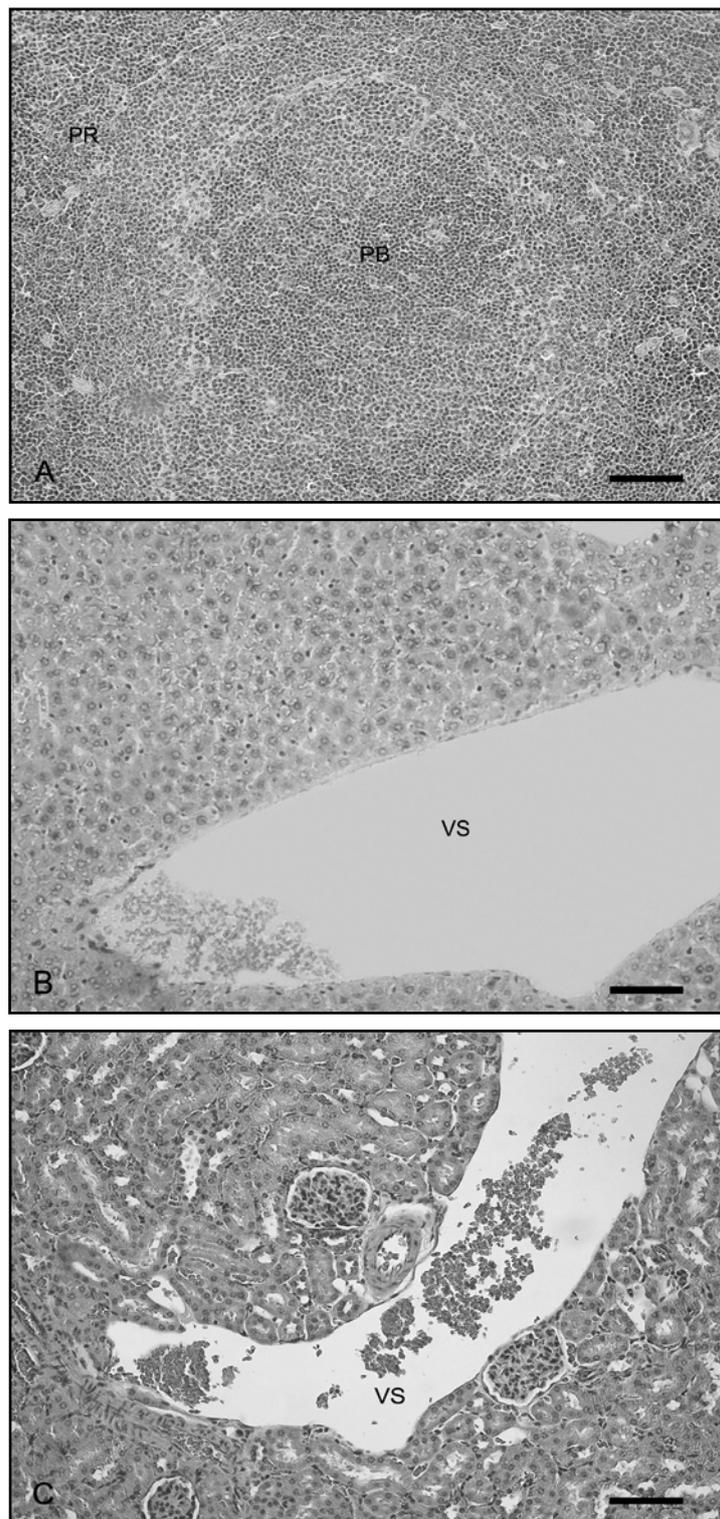


Figura 21. Bazo, Hígado y Riñón de ratones No Anémicos. Un grupo de animales ($n=3$) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra uniformidad celular en Tejido Esplénico (A), Hepático (B) y Renal (C). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca; VS: Vaso sanguíneo. X 200 (A, B, C). Escala: 150 μm . (Veuthey TV et al. ARS Pharmaceutica 2008).

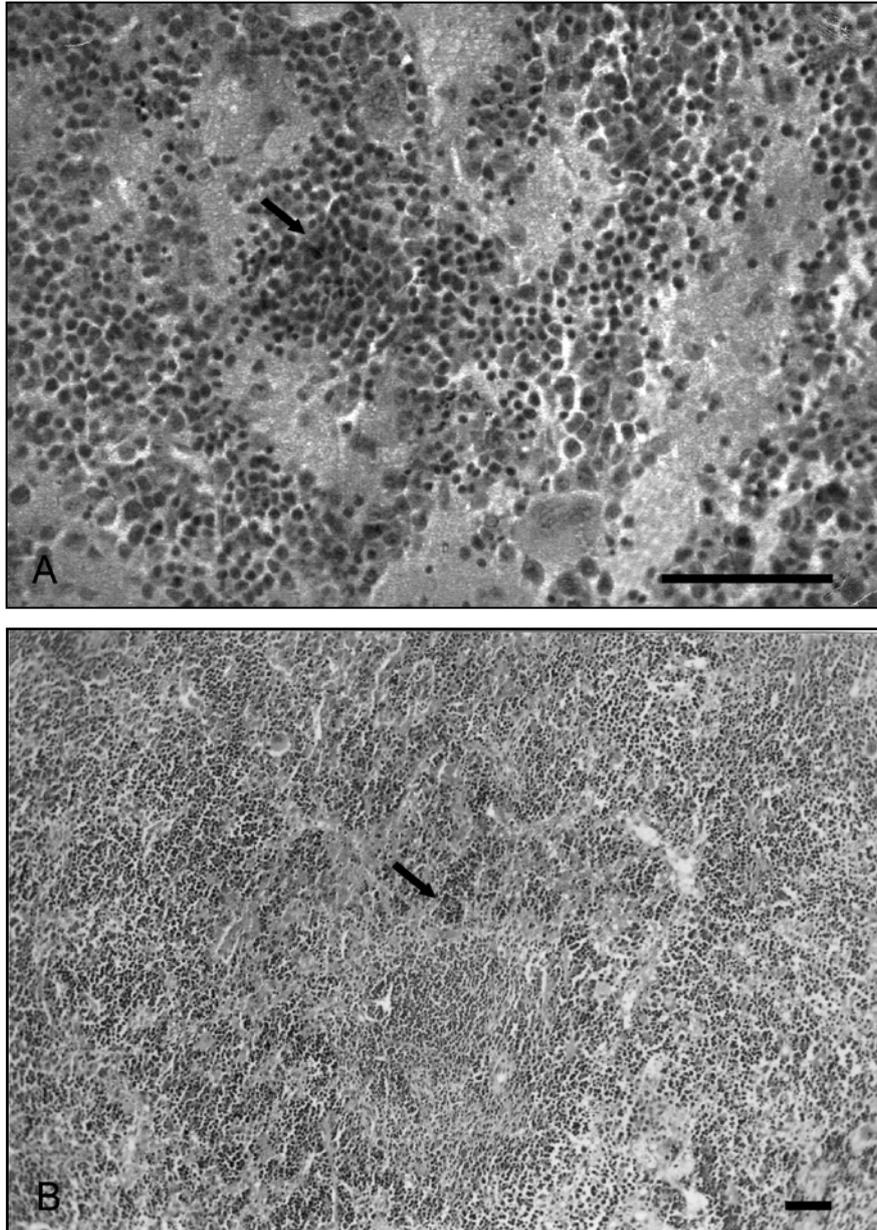


Figura 22. Bazo de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril. Ratones hembras tratados con Enalapril + FHZ y ratones sin tratar con Enalapril y tratados con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Tratados con FHZ sin Enalapril (A): Congestión eritrocítica, expansión de la pulpa roja, Islotes Eritroblásticos difusos (flecha) y megacariocitos (día 16). Tratados con Enalapril + FHZ (B): Congestión, hiperplasia eritroide e Islotes Eritroblásticos difusos (flecha) (día 18). X 400 (A), X 100 (B). Escala: 150 μ m.

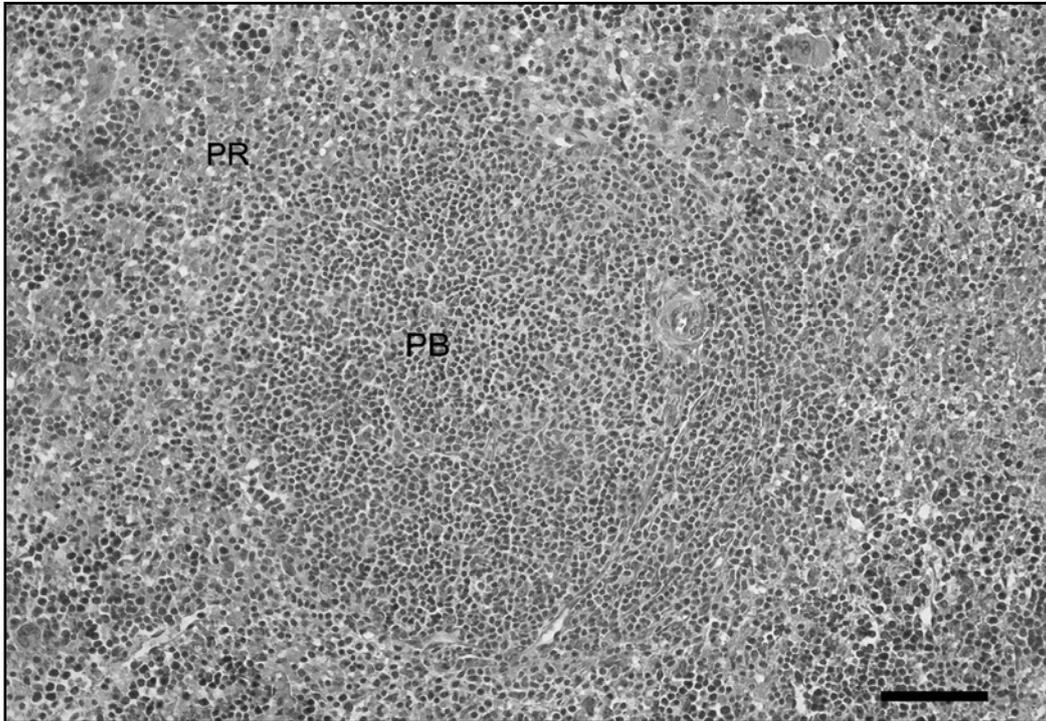


Figura 23. Bazo de Ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril. Ratones hembras se trataron con Enalapril + FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra reorganización de la pulpa roja (día 20). PB: Pulpa blanca; PR: Pulpa roja. X 200. Escala: 150 μ m. (Veuthey TV et al. ARS Pharmaceutica 2008).

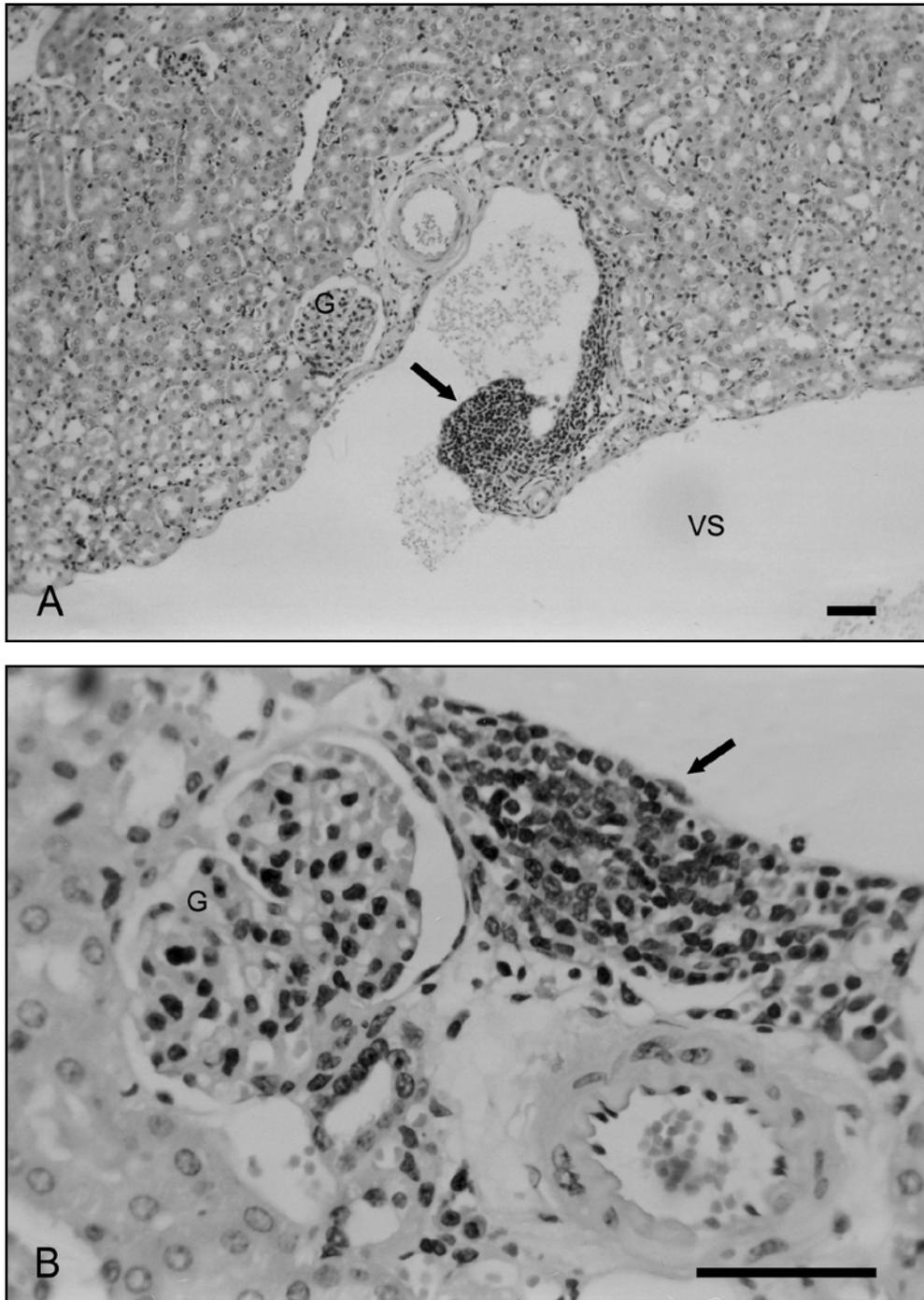


Figura 24. Riñón de ratones tratados con Fenilhidrazina y Enalapril. Ratones hembras tratados con Enalapril + FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Se muestran Islotes Eritroblásticos en nódulos discretos (flecha), con localización perivascular, sin observarse alteraciones en la morfología tisular (día 18). G: Glomérulo. VS: Vaso sanguíneo. X 100 (A), X 400 (B). Escala: 150 μ m.

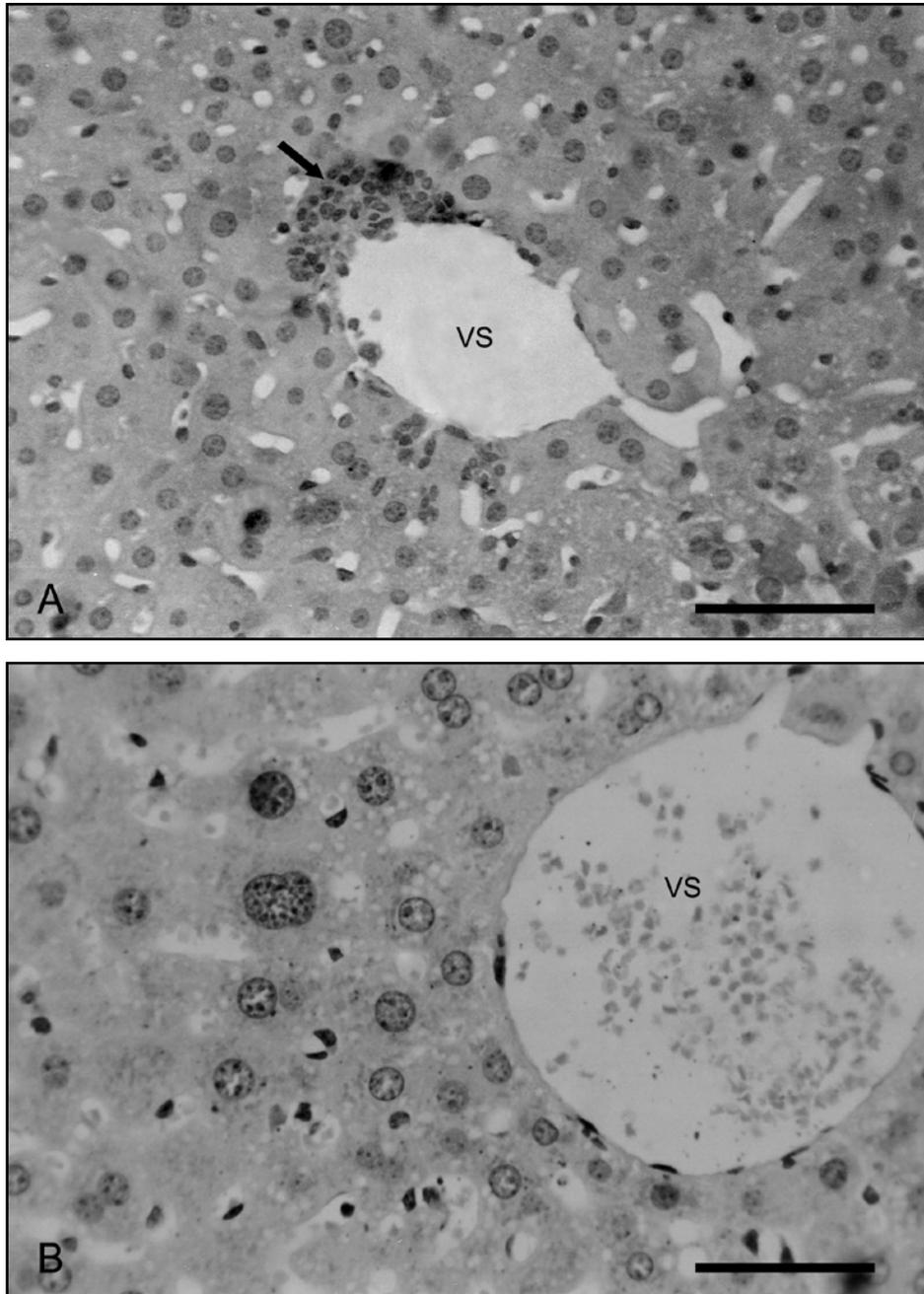


Figura 25. Hígado de ratones tratados con FHZ, con y sin Enalapril. Ratones hembras tratados con Enalapril + FHZ y ratones sin tratar con Enalapril y tratados con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. Tratados con FHZ sin Enalapril (A): se muestran Islotes Eritroblásticos nodulares, con localización perivascular (Flecha) (día 16). Tratados con Enalapril + FHZ (B): se observan alteraciones morfológicas (día 18). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A, B). Escala: 150 μ m. (Veuthey TV et al. ARS Pharmaceutica 2008).

2.3.2. SEMICUANTIFICACIÓN DE ISLOTES ERITROBLÁSTICOS

La presencia de agregados celulares eritroblásticos descripta refleja funciones eritropoyéticas en los órganos estudiados. Por lo tanto, para evaluar el grado de actividad se semicuantificaron los Islotes Eritroblásticos en bazo, hígado y riñón, mediante un score preestablecido, según se describe en Materiales y Métodos (Tabla 4).

El bazo de los animales tratados con FHZ sin Enalapril mostró incremento en el número de Islotes Eritroblásticos desde el día 12, alcanzando su máximo valor el día 16 y retornando a niveles basales el día 18. En cambio, bazo de los animales tratados con Enalapril + FHZ recién mostró un incremento en el número de Islotes Eritroblásticos el día 16, que comenzó a descender en días posteriores.

El riñón de los animales tratados con Enalapril + FHZ evidenció abundantes Islotes Eritroblásticos el día 20, mientras que en los animales tratados con FHZ sin Enalapril los cambios se observaron entre los días 12 y 18. La semicuantificación de Islotes Eritroblásticos hepáticos mostró compromiso de este tejido el día 16 en los animales tratados con FHZ sin Enalapril, sin observarse actividad hepática en los animales tratados con Enalapril + FHZ.

Días del protocolo	Ratones tratados con FHZ (FHZ)			Ratones tratados con Enalapril y FHZ (E + FHZ)	
	Bazo	Riñón	Hígado	Bazo	Riñón
0	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
12	++	++	+	+	+
14	++	++	+	+	+
16	++++	++	+++	+++	+
18	+	++	+	++	++
20	+	+	+	++	+++

Tabla 4. Semicuantificación de Islotes Eritroblásticos en Tejido Esplénico, Hepático y Renal de ratones tratados con Fenilhidrazina, con y sin Enalapril. Ratones hembras tratados con Enalapril + FHZ y ratones sin tratar con Enalapril y tratados con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para histología y se coloreó con Hematoxilina & Eosina según se describe en Materiales y Métodos. La semicuantificación de los islotes se realizó según se describe en Materiales y Métodos (Veuthey TV et al. ARS Pharmaceutica 2008).

3. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

El modelo murino de Sobrecarga de Fe desarrollado en la cepa CF1 de ratones fue diseñado para inducir disfunciones metabólicas de la ruta del Fe análogas a las descritas en humanos en patologías crónicas que presentan elevados niveles de Fe en el SRE, con o sin hipoferremia. El diseño experimental implementado se adecuó a los objetivos planteados inicialmente en nuestro Plan de Trabajo.

3.1 DESARROLLO DEL MODELO

Para desarrollar el modelo de Sobrecarga de Fe se utilizaron concentraciones crecientes de Fe-Dextrán con el objetivo de determinar la dosis óptima del fármaco inductor capaz de inducir el exceso de Fe, sin comprometer la supervivencia del animal.

Con este propósito, los ratones hembra se dividieron en 3 grupos: a) Experimental A (n=10): 0.5 g Fe-Dextrán/Kg peso i.p. los días 0 y 10 del protocolo experimental; b) Experimental B (n=10): 1.0 g Fe-Dextrán/Kg peso i.p. los días 0 y 10 del protocolo experimental; c) Control (n=10): solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. los días 0 y 10. Para evaluar el estado hematológico de los animales, cada 10 días (n=4) se evaluó Hb, HCT, fórmula leucocitaria y Ferremia para evaluar el estado hematológico. Los mismos días, un lote de cada grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el hígado fue utilizado para la determinación del contenido de Fe total en este tejido.

Para el análisis estadístico, se utilizó un diseño en Bloques, donde los animales fueron segregados en los distintos bloques según su peso y según la ubicación de los bloques en el Bioterio. De esta forma se homogeneizó el peso, y otras variables como la temperatura y la humedad dentro de cada bloque.

En el análisis estadístico se determinó la Homocedasticidad y Normalidad de las variables en estudio (Materiales y Métodos). Luego, mediante un análisis de varianza (ANOVA) en 2 vías, con $\alpha=0,05$, se determinó la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, mediante un análisis de comparaciones múltiples se determinaron los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS Y EL ESTADO DEL HIERRO

3.2.1. ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS

El análisis de parámetros hematológicos no mostró cambios significativos en los valores de Hemoglobina y Hematocrito en los dos grupos de animales con Sobrecarga de Fe durante los 30 días del protocolo experimental, evidenciándose valores similares a los observados en los animales sin tratar (Figura 26).

Asimismo, de la observación de los extendidos sanguíneos se desprende que no hubo cambios en la morfología de la serie eritrocitaria y leucocitaria en las condiciones ensayadas, observándose celularidad similar a la hallada en extendidos sanguíneos de ratones sin tratar (Figura 27).

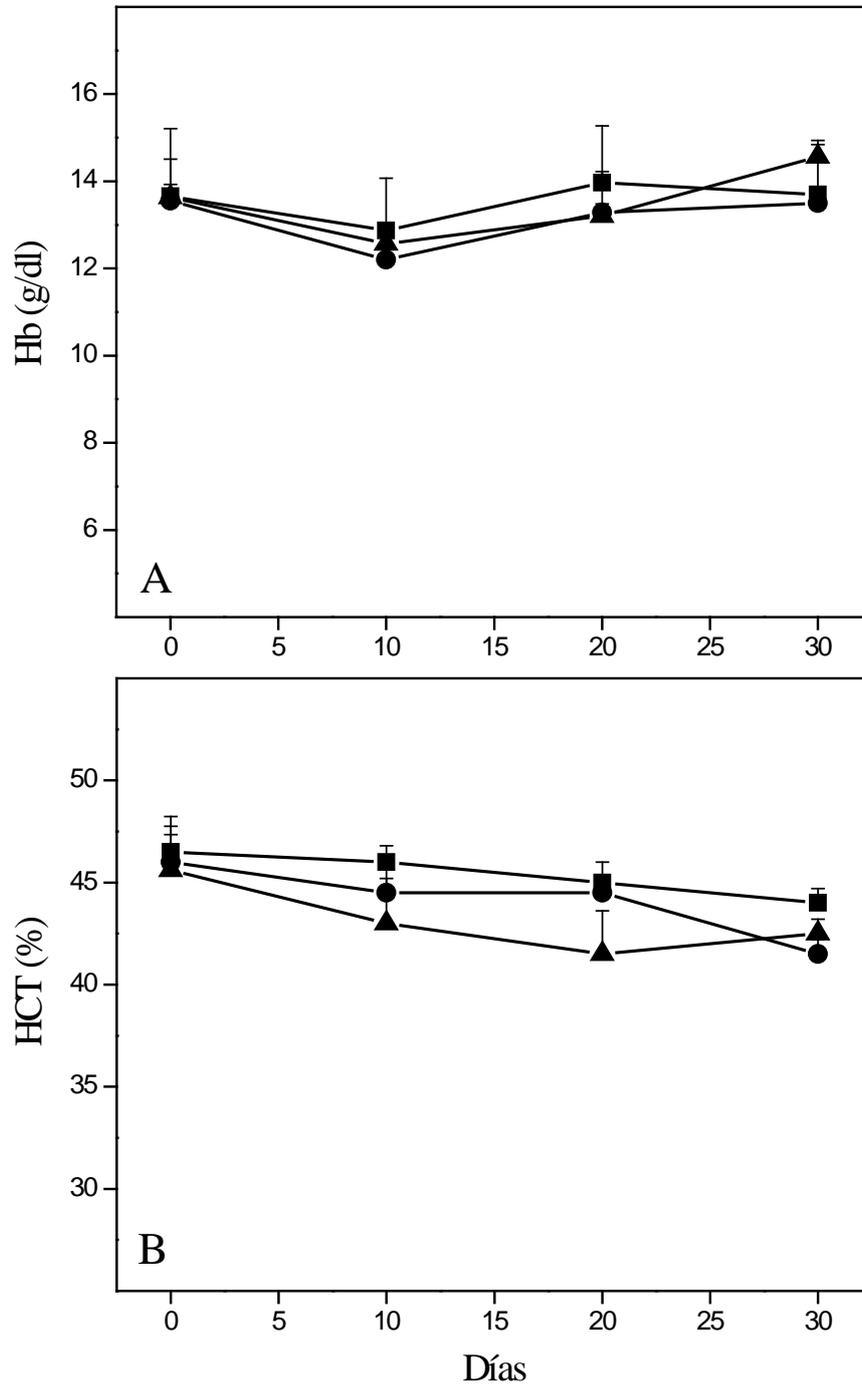


Figura 26. Hemoglobina y Hematocrito de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Solución Salina (■), con 0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso (●) y con 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso (▲). No se observan cambios en Hb (A) y HCT (B) durante el protocolo (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

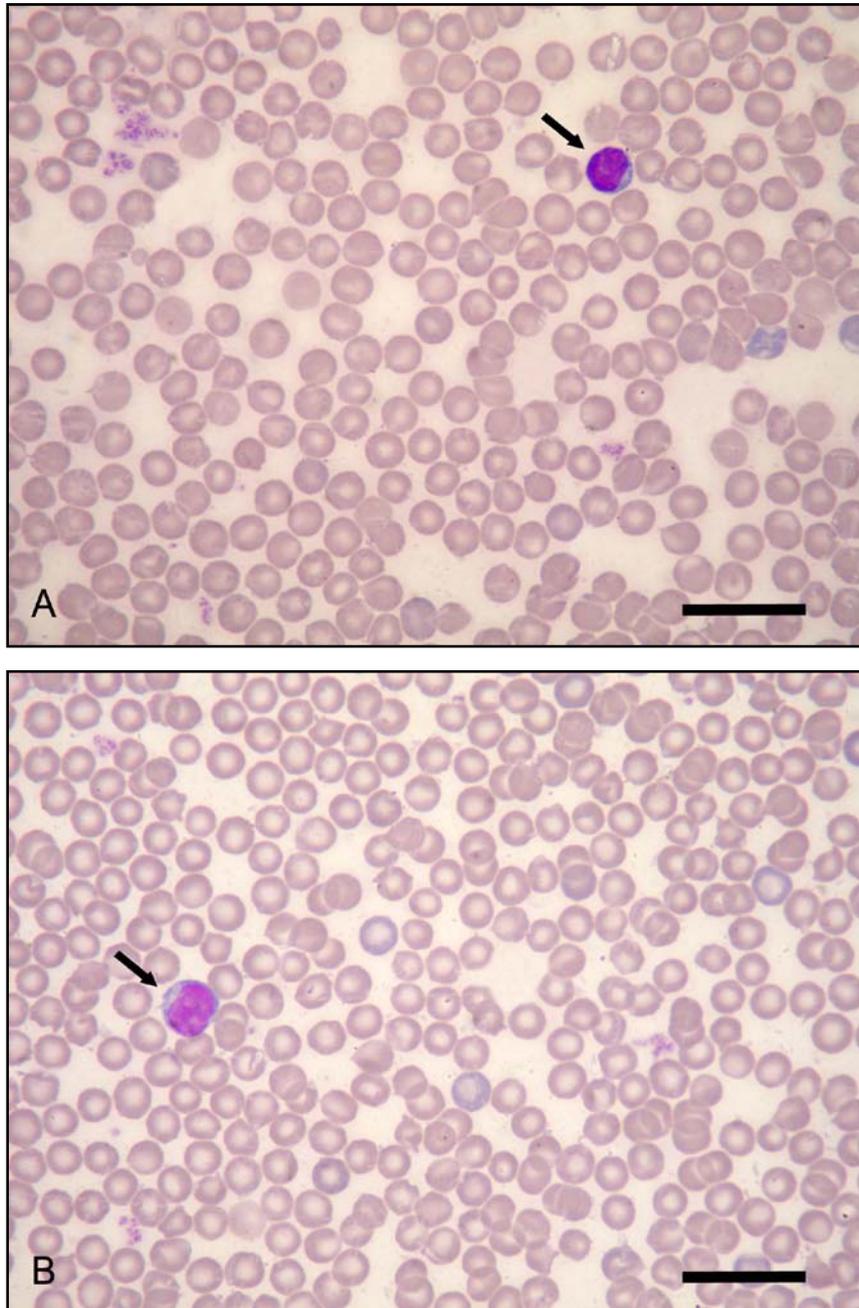


Figura 27. Fórmula leucocitaria de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras (n=20) se trataron con Solución Salina y con Fe-Dextrán. Los extendidos sanguíneos se colorearon con May Grünwald-Giemsa (n=4). Sin sobrecarga de Fe (control) (A): Morfología eritrocitaria típica sin cambios en la serie leucocitaria. Con Sobrecarga de Fe, día 20 (B): Morfología eritrocitaria normal sin cambios en la serie leucocitaria. Leucocito: flecha. X 1000 (A, B). Escala: 30 μ m

3.2.2. EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL HIERRO

3.2.2.a. HIERRO PLASMÁTICO

Los niveles plasmáticos de Fe no mostraron cambios significativos en los animales del grupo control durante el desarrollo del protocolo experimental. Se determinó un incremento paulatino de la Ferremia en las dosis de Fe-Dextrán ensayadas (0,5 y 1 g Fe-Dextrán/Kg peso). Estos cambios fueron estadísticamente significativos el día 20 en el grupo de ratones que recibieron la mayor dosis del agente inductor (1 g Fe Dextrán/Kg peso) (Figura 28).

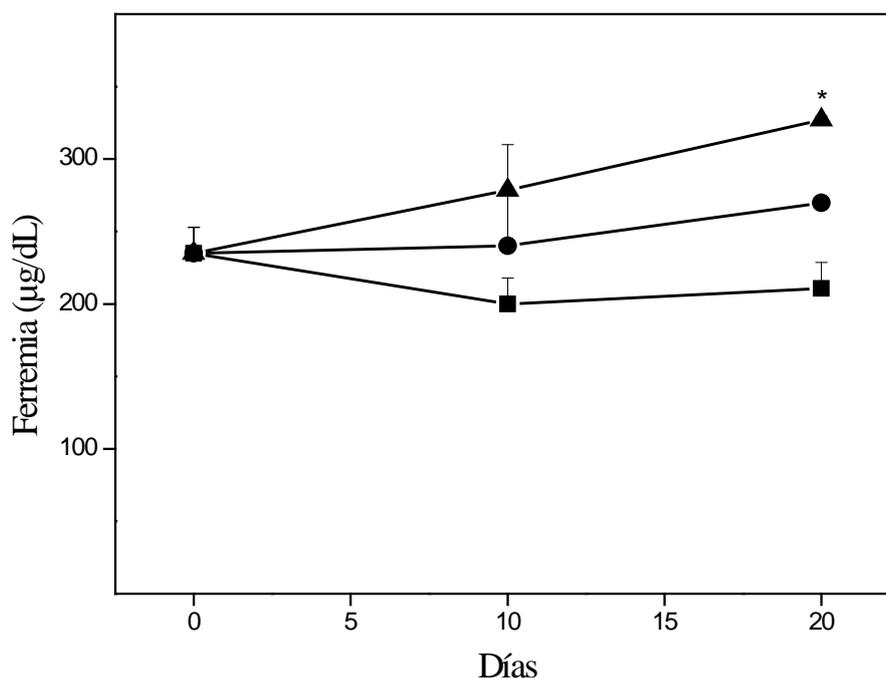


Figura 28. Hierro Plasmático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Solución Salina (■), con Fe-Dextrán con 0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso (●) y con 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso (▲). El día 20 se observa un incremento significativo en la Ferremia de los ratones tratados con 1 g Fe Dextrán/Kg peso (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

3.2.2.b. HIERRO TISULAR

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

Cuando se realizó la disección del tejido hepático observamos un cambio en la coloración típica del hígado en los ratones tratados con Fe-Dextrán, presentando color pardo oscuro que evidenció el exceso de Fe. Esta coloración también fue evidente en el peritoneo (Figura 29).

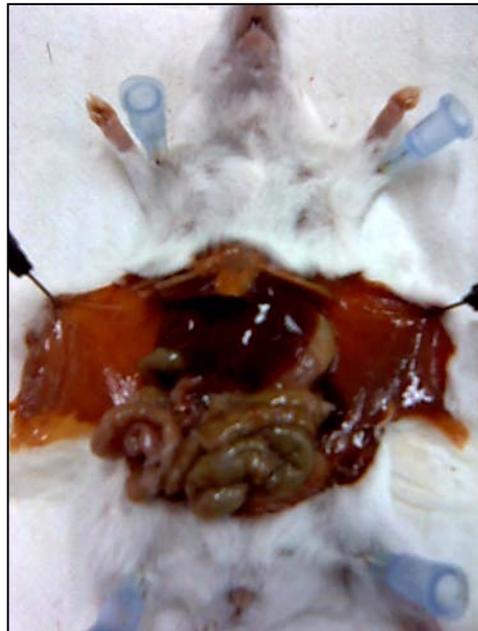


Figura 29. Mucosa de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán.

EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA

La valoración del Fe en hígado por Perl's no mostró depósitos de Fe^{3+} en los ratones sin tratamiento (control), mientras que el Fe^{3+} en exceso fue evidente en el hígado de ratones tratados con Fe-Dextrán desde el día 10 del protocolo (Figura 30).

En el día 20, se observaron abundantes pigmentos de Fe como hemosiderina, respecto al día 10 en ambos grupos con Sobrecarga de Fe. Cabe mencionar, que la dosis de 1g Fe-Dextrán/Kg peso indujo exceso de Fe que se visualizó como sólidos depósitos, que afectaron a las células de Kupffer y a los hepatocitos (Figura 31).

Luego de la identificación de Fe en hígado se realizó la semicuantificación del Fe^{3+} mediante un score preestablecido, que diferencia el Fe presente en los Hepatocitos y en las células de Kupffer (Tabla 5). El score establecido no mostró diferencias en el Fe de depósito en células de Kupffer en las dos dosis de Fe testeadas (0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso y 1 g Fe-Dextrán/Kg peso), tanto el día 10 como el día 20. Sin embargo, el día 20 pudimos observar un grado mayor de Fe hepatocelular en el tejido de ratones tratados con la mayor dosis de Fe-Dextrán.

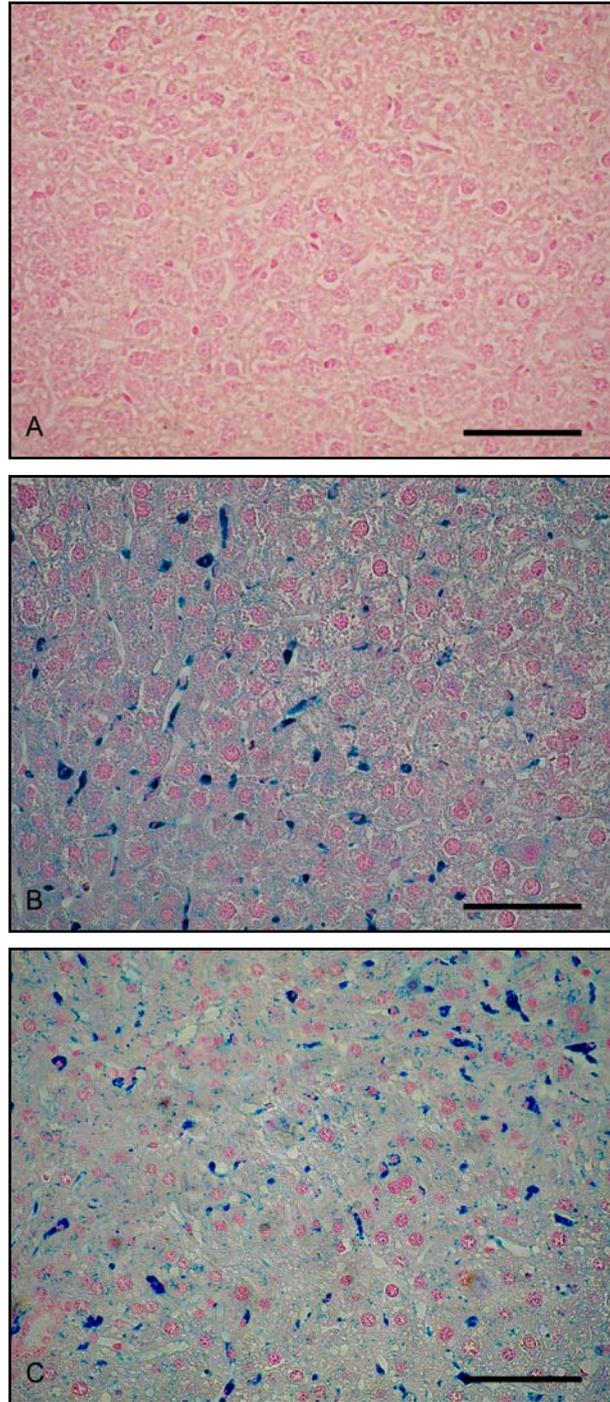


Figura 30. Tinción de Perl's del Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) (día 10) fue sacrificado y el tejido se procesó y se coloreó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Sin tratar (control) (A): No se observan pigmentos de Fe. Dosis 0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso (B): Pigmentos de Fe. Dosis 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso (C): Pigmentos de Fe. X 400 (A, B, C). Escala: 150 μ m

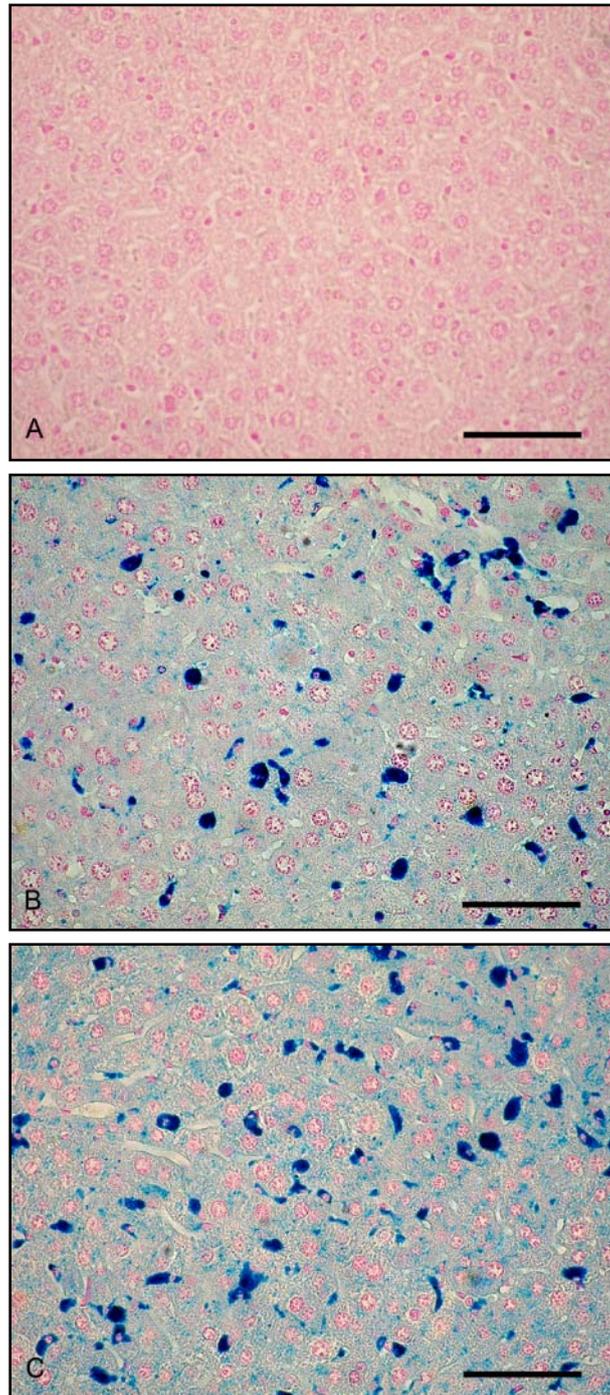


Figura 31. Tinción de Perl's del Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) (día 20) fue sacrificado y el tejido se procesó y se coloreó para la Tinción de Perl's según en Materiales y Métodos. Sin tratar (A): No se observan pigmentos de Fe. Dosis 0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso (B): Pigmentos de Fe. Dosis 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso (C): Abundantes pigmentos de Fe en forma de concreciones. X 400 (A, B, C). Escala: 150 μ m.

	Hepatocitos con Fe			Células de Kupffer con Fe		
	(Grado)			(Grado)		
	Día 0	Día 10	Día 20	Día 0	Día 10	Día 20
Sin Tratar	0	0	0	0	0	0
0.5 g/Kg	0	3	3	0	2	3
1.0 g/Kg	0	3	4	0	2	3

Tabla 5. Semicuantificación de los depósitos de Fe de Tejido Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado (días 0, 10, 20) y el tejido se procesó y coloreó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. La semicuantificación de los pigmentos de Hierro se realizó según se describe en Materiales y Métodos, con un score que expresa en grado el porcentaje de hepatocitos y células de Kupffer que poseen Fe.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

La cuantificación de los niveles totales de Fe hepático se realizó mediante la digestión ácida del tejido con posterior determinación de los niveles totales de Fe^{2+} y Fe^{3+} por un método colorimétrico, según se describe en Materiales y Métodos.

Entre los días 0 y 20 se vio un incremento estadísticamente significativo en los niveles totales de Fe en hígado de ratones tratados con ambas dosis de Fe-Dextrán (Figura 32). Dicho aumento fue más evidente en los ratones tratados con 1g Fe-Dextrán/Kg peso. Los ratones sin tratamiento (control) no mostraron cambios en los niveles de Fe hepático.

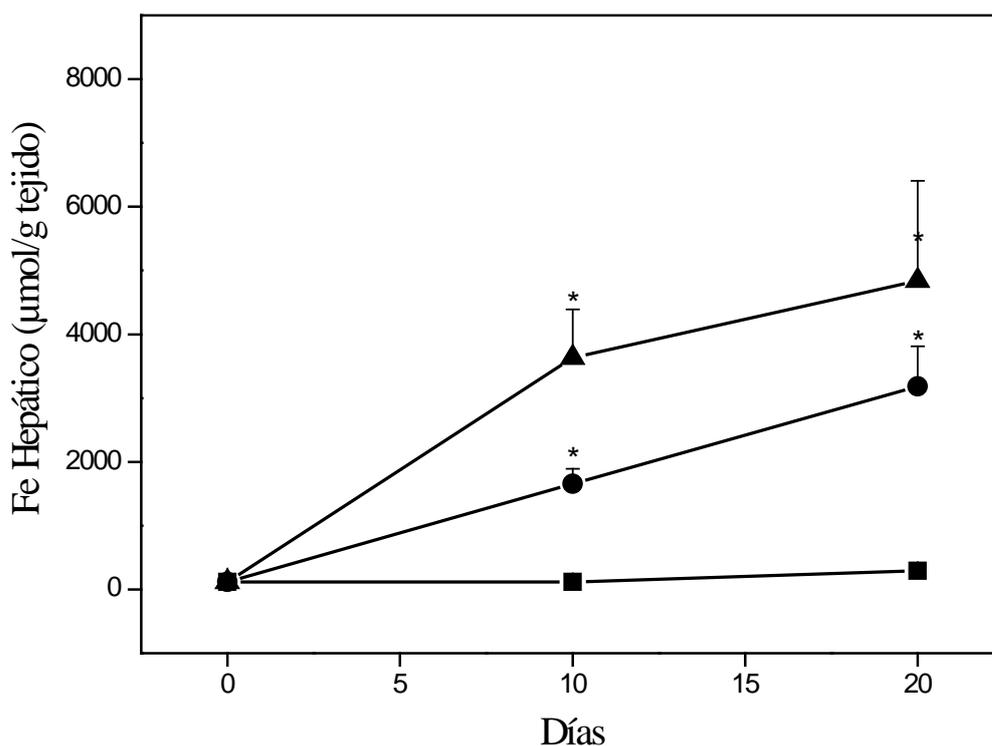


Figura 32. Cuantificación de Fe Hepático de ratones con y sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Solución Salina (■), con 0,5 g Fe-Dextrán/Kg peso (●) y con 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso (▲). Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado (días 0, 10, 20) y el tejido hepático se procesó para la cuantificación de Fe según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra incremento en los niveles de Fe en ambos grupos de ratones con exceso de Fe. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

4. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA

En las condiciones fisiopatológicas estudiadas en los dos modelos experimentales descritos, Anemia Hemolítica y Sobrecarga de Fe, la expresión de Hepcidina y de DMT1 son reguladas por diferentes señales. Para evaluar la expresión de ambas proteínas cuando coexisten situaciones bien definidas como: a) exceso de Fe; b) balance normal de Fe con alta demanda, como es la Anemia Hemolítica, se diseñó el modelo Acoplado de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica.

4.1 DESARROLLO DEL MODELO

De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, ratones hembras CF1 se dividieron en 4 grupos de animales: a) Sin tratar (control) (n=27): solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. los días 0, 10, 20 y 22; b) Anémicos (n=27): solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. los días 0 y 10, y Fenilhidrazina (FHZ) 60 mg/Kg peso i.p. los días 20 y 22; c) Sobrecarga de Fe (n=27): 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso los días 0 y 10, solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. los días 20 y 22; d) Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica (n=27): 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso i.p. los días 0 y 10, y FHZ 60 mg/Kg peso i.p. los días 20 y 22.

La inducción de anemia y la compensación de la eritropoyesis se evaluó (n=4) los días 0, 10, 20, 22, 23, 24, 26, 28 y 30 del protocolo experimental mediante Hb, Eritropoyetina, HCT, Recuento de Reticulocitos y células con Cuerpos de Heinz. Se cuantificaron los niveles de Fe plasmático de los grupos animales. La morfología de las células sanguíneas se observó en extendidos de sangre periférica coloreados con May Grünwald-Giemsa.

Los días 0, 10, 20, 22, 24, 25, 26, 28 y 30 un subgrupo de animales de cada grupo fue sacrificado (n=3) y el hígado fue utilizado para la determinación del contenido de Fe total.

En este caso, dado que se trabajó con 4 grupos de animales, el análisis estadístico se realizó por un diseño experimental en Bloques. Se trabajó con 4 bloques que fueron segregados según el peso de los animales y su ubicación en el Bioterio. Esta segregación no sólo permitió homogeneizar el peso, sino que además permitió homogeneizar variables como la temperatura y la humedad dentro de cada bloque. En el análisis estadístico se determinó la Homocedasticidad y Normalidad de las variables en estudio (Materiales y Métodos). Luego, mediante un análisis ANOVA en 2 vías, con $\alpha=0,05$, se determinó la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, mediante un análisis de comparaciones múltiples (Tukey modificado) con $\alpha=0,05$, se determinaron los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

4.2. EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS

4.2.1. ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS

Los valores de Hb y HCT no mostraron diferencias significativas durante los primeros 20 días en los 4 grupos de animales descriptos anteriormente (a, b, c, d) (Figura 33).

Como muestra la Figura 33, la anemia se manifestó por bajos valores de Hb y de HCT entre los días 23 y 24 en ambos grupos tratados con FHZ, aunque sin poder hallarse diferencias significativas entre ambos grupos de animales, sugiriendo un grado de anemia similar. Sin embargo, es importante mencionar que estos parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ratones tratados y no tratados con FHZ.

Las principales diferencias halladas en la Hb y el HCT se observaron en el período de recuperación del estado anémico, cuando ambos parámetros mostraron diferencias significativas entre los animales con Anemia sin Sobrecarga de Fe y los animales con Sobrecarga de Fe y Anemia. En este caso, los parámetros hematológicos de los Anémicos con Sobrecarga de Fe alcanzaron valores normales el día 30, mostrando un

retraso temporal con respecto a los animales Anémicos sin Sobrecarga de Fe, cuyos parámetros retornaron a valores basales entre los días 26 y 28 (Figura 33).

El número de Reticulocitos mostró variaciones en ambos grupos Anémicos, observándose un importante aumento de estas células el día 24. A partir de ahí, los valores se mantuvieron elevados durante 2 días y finalmente se vio una disminución los días 28 y 30, sin hallarse diferencias significativas entre ambos grupos tratados con FHZ (Figura 34).

Al igual que el recuento de Reticulocitos, sólo los ratones Anémicos mostraron cambios en el número de células con Cuerpos de Heinz. El día 23 se observó un brusco incremento, aunque sin detectarse diferencias significativas entre ambos grupos. Los valores de células con Cuerpos de Heinz comenzaron a disminuir a partir de los días 24 y 25, retornando a valores normales los días 28 y 30 (Figura 35).

El estudio estadístico mostró diferencias en el recuento de células con Cuerpos de Heinz el día 25, cuando los animales del modelo Acoplado de Sobrecarga y Anemia presentaron valores menores respecto a aquellos Anémicos sin Sobrecarga.

La observación de los extendidos sanguíneos no mostró cambios en la serie blanca de los animales durante el procedimiento experimental (Figura 36). Por el contrario, en los animales tratados con FHZ la serie eritrocitaria mostró típicas alteraciones estructurales asociadas al proceso hemolítico como anisocitosis, poiquilocitosis, anisocromía y abundante destrucción celular, aunque sin detectarse diferencias entre ambos grupos anémicos (Figura 36).

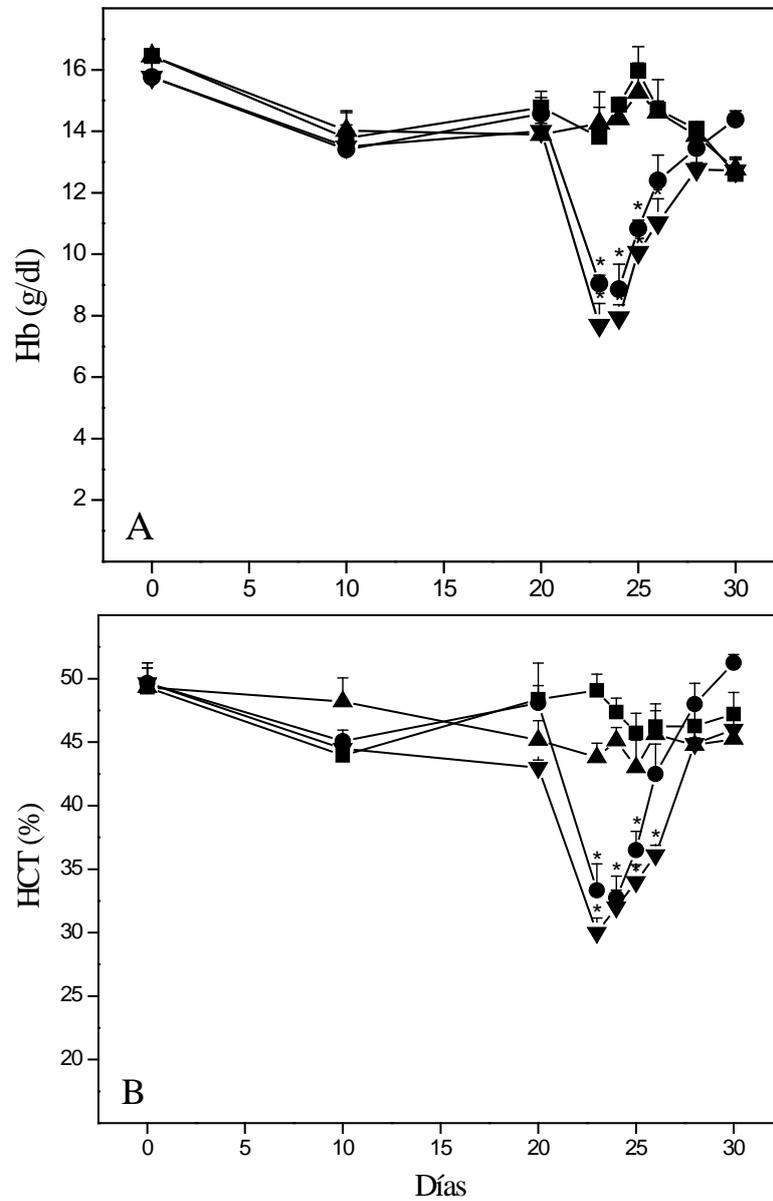


Figura 33. Hemoglobina y Hematocrito de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Se muestran bajos valores de Hb (A) y HCT (B) en ambos grupos Anémicos los días 23-24, alcanzando valores basales el día 30 en ratones con Sobrecarga de Fe y Anemia, y los días 26-28 en ratones anémicos sin Sobrecarga de Fe (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

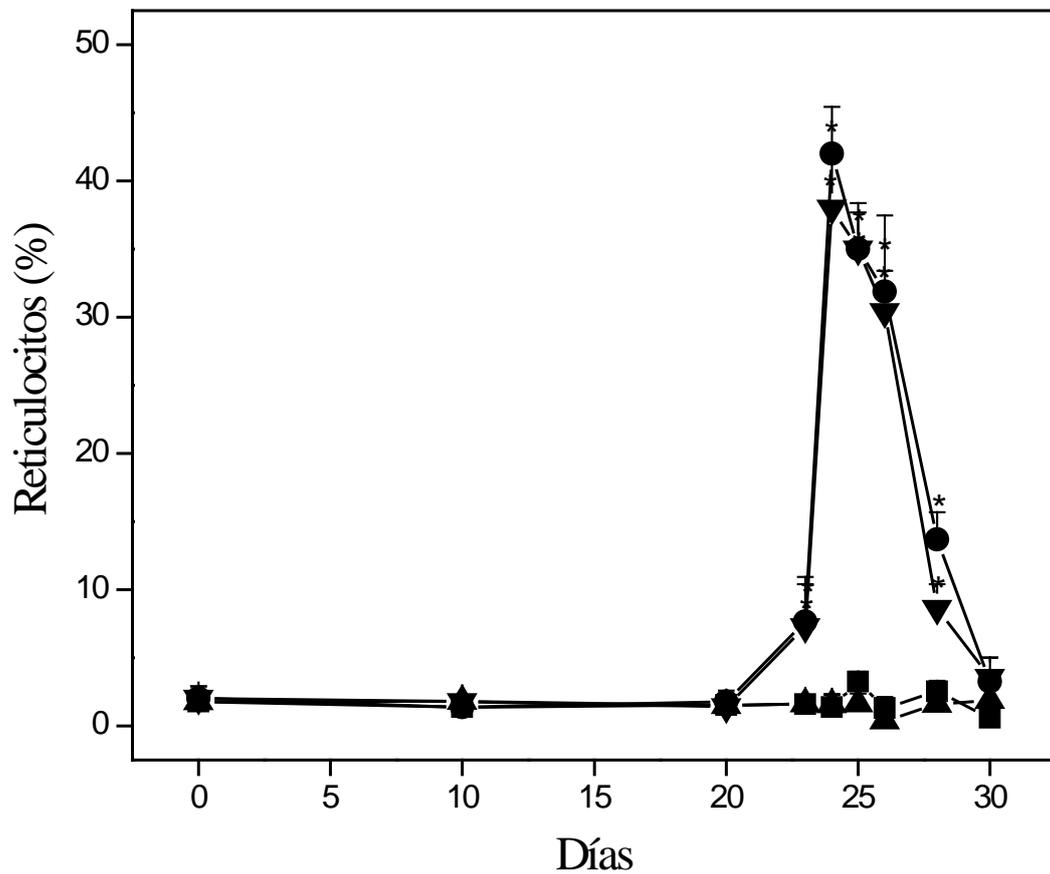


Figura 34. Recuento de Reticulocitos de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Se muestra un incremento de Reticulocitos en grupos Anémicos (días 20-26), y el retorno a valores basales (día 30) (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

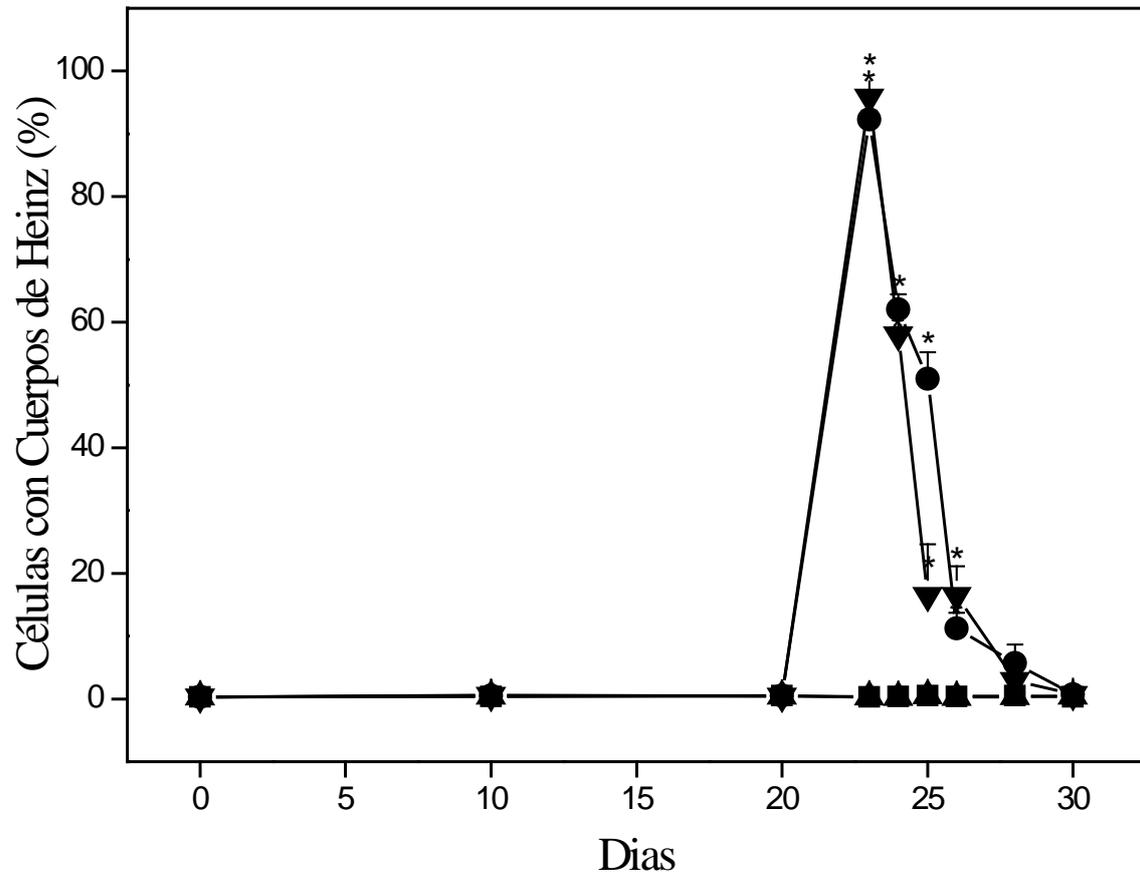


Figura 35. Recuento de Células con Cuerpos de Heinz de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de F seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Se observa un brusco incremento en las células con Cuerpos de Heinz el día 23 en ambos grupos Anémicos y una disminución desde el día 24 (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

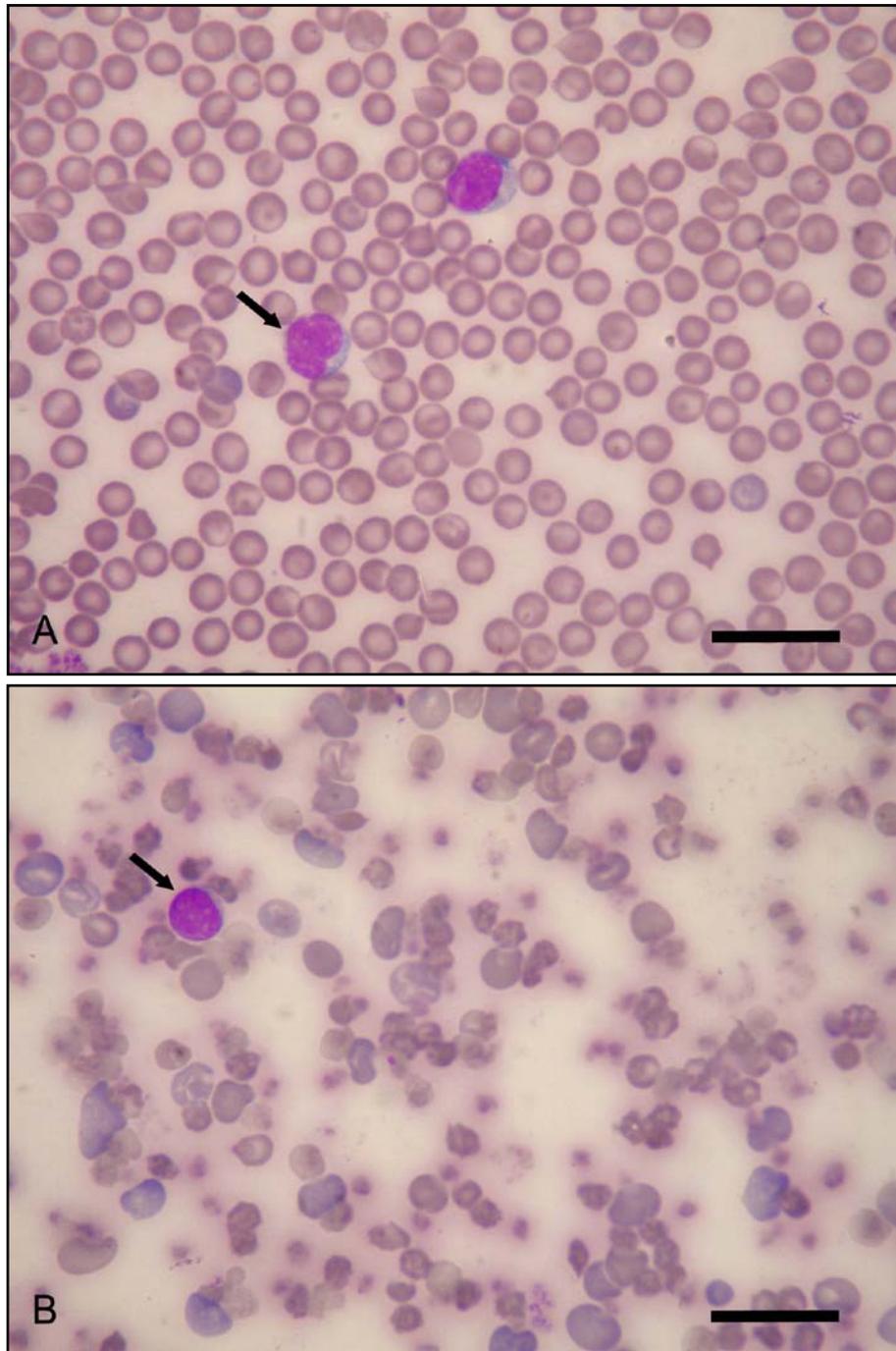


Figura 36. Fórmula Leucocitaria de ratones No Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Los extendidos sanguíneos se colorearon con May Grünwald-Giemsa (n=4). Sin tratamiento (A): Morfología normal de la serie eritrocitaria y leucocitaria. Con Sobrecarga y Anemia (B): Cambios morfológicas en la serie eritrocitaria, sin cambios en la serie leucocitaria (día 22). Leucocito: flecha. X 1000 (A, B). Escala: Escala: 30 μ m.

4.3. EVALUACIÓN DEL ESTÍMULO ERITROPOYÉTICO

4.3.1. ERITROPOYETINA PLASMÁTICA

La cuantificación de los niveles de Eritropoyetina plasmática mostró cambios estadísticamente significativos en el grupo Anémico sin Sobrecarga de Fe y en el grupo Anémico con Sobrecarga de Fe, respecto a los valores del grupo No Anémicos (Figura 37).

Ambos grupos de Anémicos, con y sin sobrecarga de Fe previa, mostraron un marcado incremento de Epo durante la crisis hemolítica, principalmente entre los días 23 y 25, observándose valores 10 a 15 veces mayores que en condiciones basales. Estos cambios no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos tratados con FHZ (Figura 37).

Asimismo, hacia el día 26 del protocolo se observó una rápida disminución en los valores de Epo en ambos grupos Anémicos, con valores que retornaron a los niveles basales los días 28 y 30. En todos los casos, las diferencias halladas entre animales del modelo de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia y animales Anémicos sin Sobrecarga no mostraron significancia estadística.

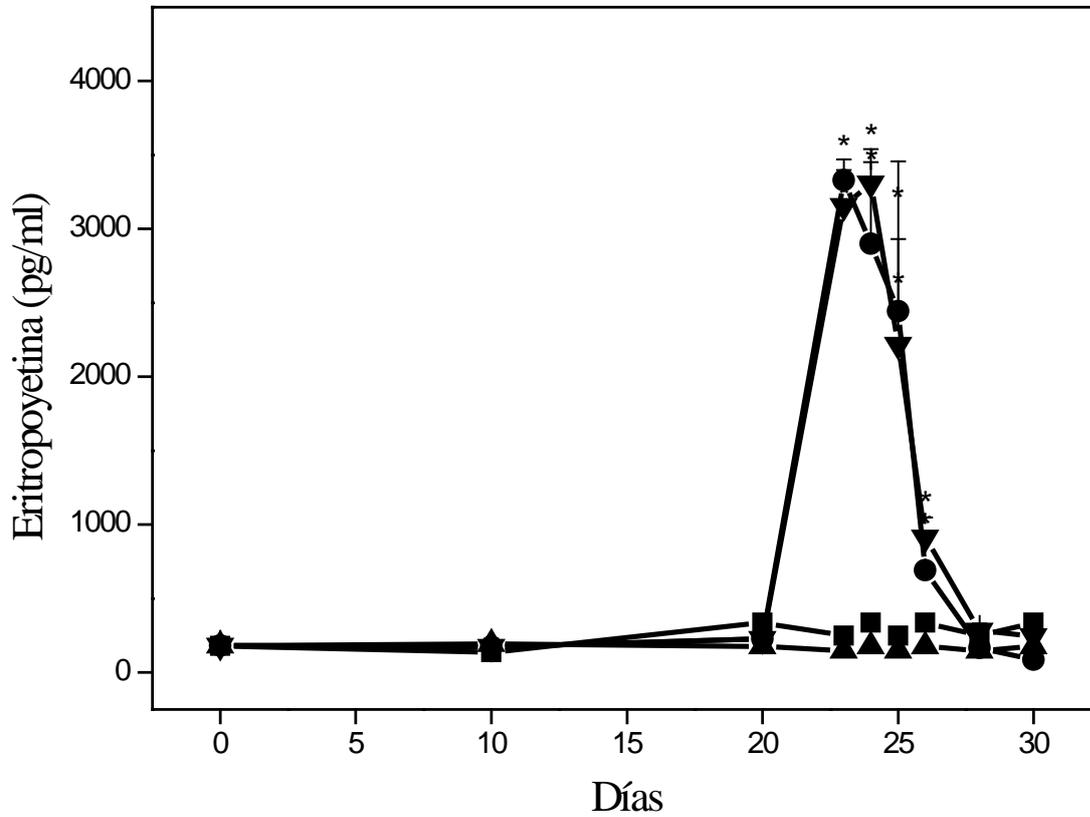


Figura 37. Eritropoyetina Plasmática de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Se observa un incremento significativo en los niveles de Epo durante la crisis hemolítica y una posterior disminución hacia valores normales en ambos grupos Anémicos (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

4.4. EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL HIERRO

4.4.1. HIERRO PLASMÁTICO

Los ratones no tratados con Fe-Dextrán no mostraron cambios en la Ferremia durante los 30 días del protocolo, mientras que se vio un aumento de este parámetro en ambos lotes con Sobrecarga de Fe (con y sin anemia) entre los días 0 y 20, aunque sin detectarse diferencias significativas entre ellos (Figura 38).

Desde el día 20, en los animales con Sobrecarga de Fe sin Anemia los niveles de Fe plasmático se mantuvieron elevados hasta el día 28, retornando a valores basales el día 30. Sin embargo, aquellos con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia mostraron un marcado descenso en la Ferremia entre los días 22 y 26, un período de intensa hemólisis, con un porcentaje de cambio del 50 % aproximadamente (Figura 38). Los animales con Anemia sin Sobrecarga de Fe mostraron una disminución en la Ferremia del 36 % (días 20 al 24). Este comportamiento muestra una diferencia temporal en la respuesta entre animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia y animales Anémicos sin Sobrecarga de Fe (días 22-26 vs días 20-24).

Es importante mencionar que no se hallaron diferencias significativas en los menores valores de Ferremia alcanzados por ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia y Anémicos sin Sobrecarga de Fe.

Durante la etapa de recuperación de la anemia, ambos grupos Anémicos mostraron diferencias en la restauración de los niveles de Ferremia. Los ratones con Sobrecarga de Fe y Anemia mostraron una tendencia a la recuperación entre los días 28 y 30, presentando un retardo respecto a la respuesta observada en los ratones Anémicos sin Sobrecarga, quienes mostraron un comportamiento similar desde el día 26.

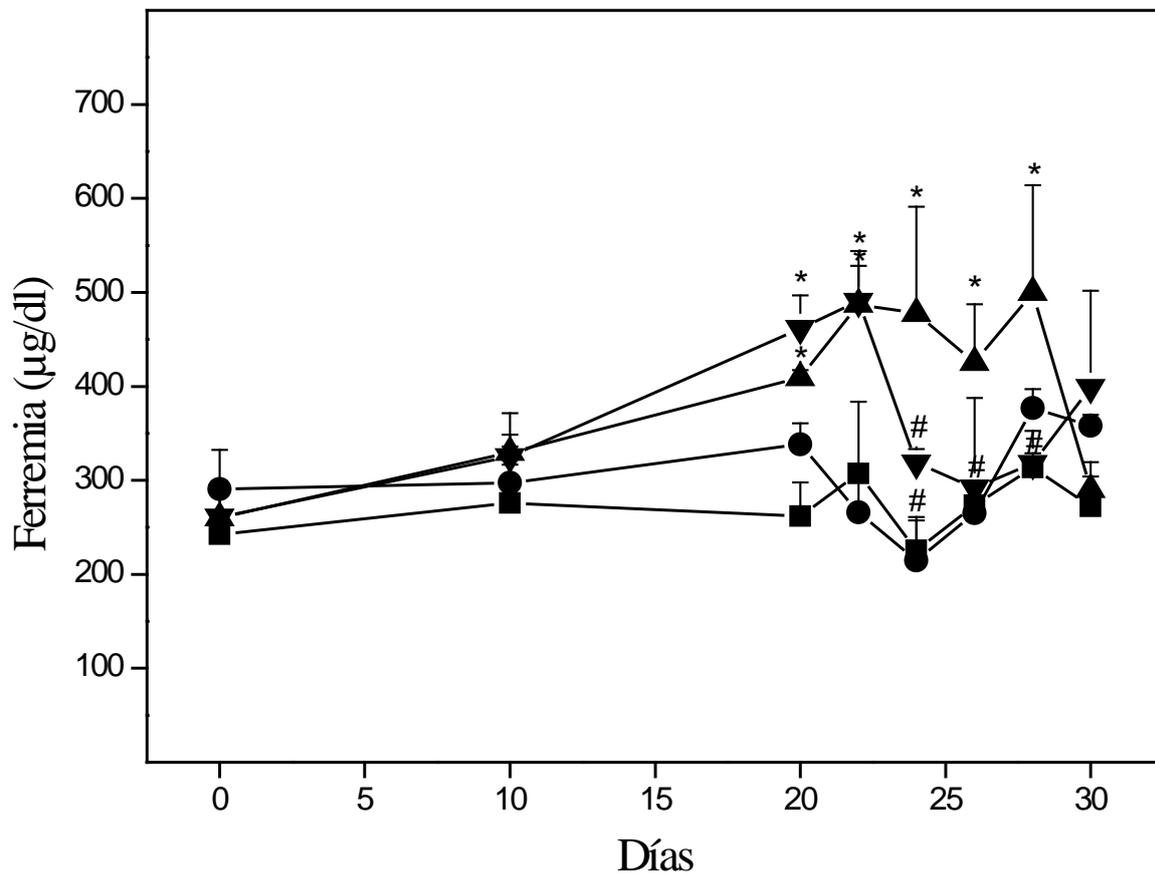


Figura 38. Hierro Plasmático de ratones Anémicos y ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Se muestra un incremento en la Ferremia de ambos grupos con Sobrecarga de Fe entre los días 0 y 20. Los Anémicos sin Sobrecarga disminuyeron su Ferremia entre el día 20 y 24, mientras que en los animales con Sobrecarga y Anemia el descenso se vio entre el día 22 y 26. Durante la restauración, los animales con Sobrecarga y Anemia mostraron un retardo con respecto a los Anémicos sin Sobrecarga (n=4). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). #: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al día 20 ($p < 0.05$).

4.4.2. HIERRO HEPÁTICO

4.4.2.a CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de Fe fue esencial para confirmar la Sobrecarga de Fe con el protocolo utilizado, dado que el modelo acoplado fue diseñado para producir exceso de Fe previo a la inducción de Anemia Hemolítica.

El Fe total hepático de ratones sin tratar y de los Anémicos no mostró variaciones durante los 30 días del protocolo. Sin embargo, los grupos de ratones con Sobrecarga de Fe previa (No Anémicos y Anémicos) mostraron aumentos de Fe hepático desde el inicio del protocolo hasta el día 30, sin detectarse diferencias significativas entre ellos (Figura 39).

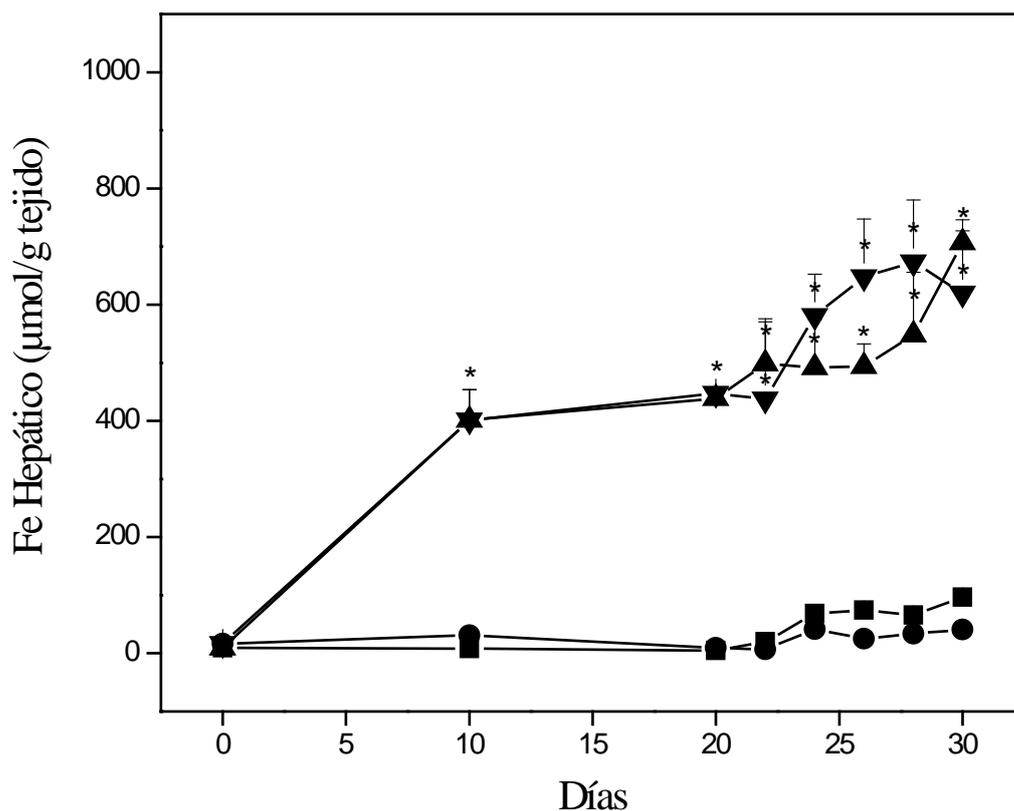


Figura 39. Cuantificación del Hierro Hepático en ratones Anémicos y con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras: Sin tratar: -■-; Sobrecarga de Fe: -▲-; Anémicos: -●-; y Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica: -▼-. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificados y el tejido hepático se procesó para la cuantificación de Fe según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un incremento de Fe en ambos grupos con Sobrecarga de Fe entre los días 0 y 30. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar. *: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

CAPÍTULO II:

ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO

1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA

Una vez que se optimizó el modelo de Anemia Hemolítica en la Cepa CF1 y que se pudo establecer el perfil hematológico e histológico durante la inducción y la recuperación eritropoyética, iniciamos estudios de caracterización de proteínas del metabolismo del Fe en órganos claves como duodeno, hígado y bazo.

En este sentido, centralizamos el estudio en evaluar la expresión tisular del importador DMT1, y de Prohepcidina, regulador negativo del Fe, evaluando la localización y distribución celular de ambas proteínas en tejidos asociados tradicionalmente al balance del Fe.

Se trabajó con ratones hembras, divididos en: a) No Anémicos (n=15): solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. (0,5 ml) los días 0 y 2; b) Anémicos (n=15): 60 mg/kg de Fenilhidrazina i.p. (0,5 ml) los días 0 y 2. Los días 0, 3, 4, 5 y 6 un lote de cada grupo de animales fue sacrificado (n=3), se realizó la disección del hígado, duodeno y bazo, y los tejidos se procesaron para estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

1.1. TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

1.1.a. TEJIDO DUODENAL

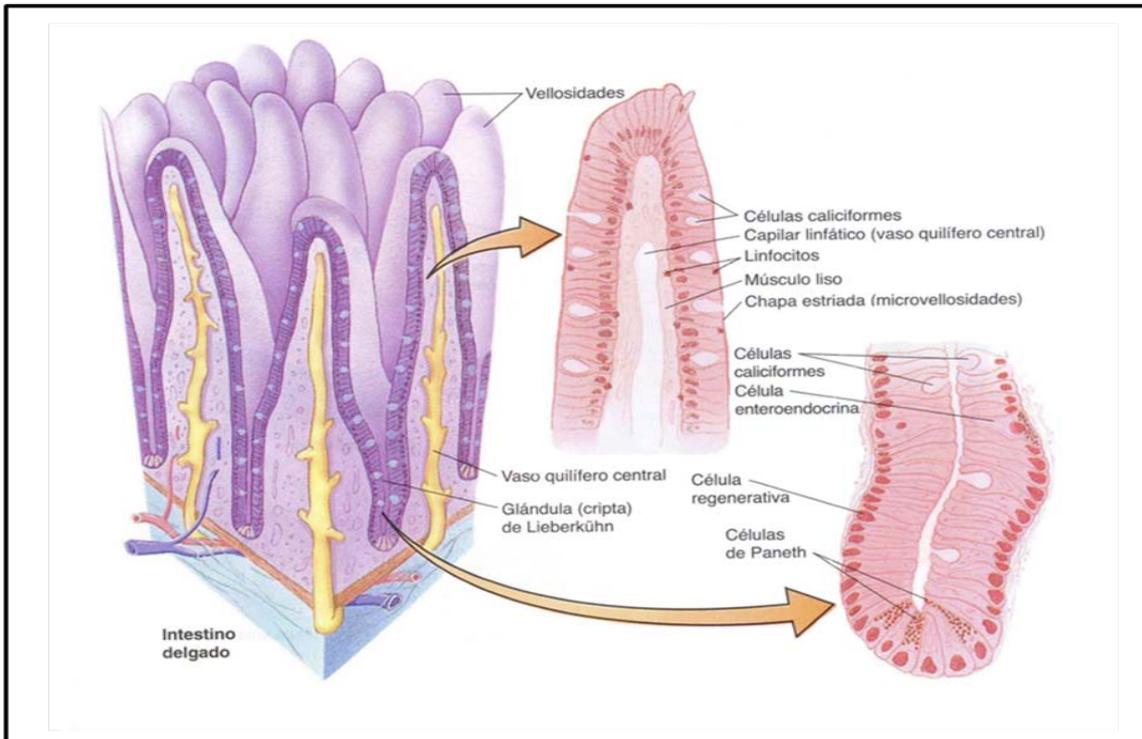


Figura 40. Diagrama esquemático de la estructura del duodeno (Gartner-Haitt. Atlas Color de Histología. 4^o edición)

Se muestra un diagrama esquemático de la estructura del duodeno (Figura 40). La superficie absorbente del duodeno se amplifica por especializaciones de las células y tejidos de la capa submucosa y mucosa. La capa submucosa contiene pliegues circulares o válvulas de Kerckring. La mucosa duodenal está formada por vellosidades que son evaginaciones digitiformes de la lámina propia cubiertas por epitelio. El epitelio duodenal es del tipo cilíndrico simple, formado por cinco tipos celulares: enterocitos o células absorbentes, células caliciformes, células de Paneth y células enteroendocrinas. Las microvellosidades de los enterocitos producen la principal amplificación de la superficie luminal. La lámina propia, compuesta por tejido conectivo laxo, está provista de un vaso quilífero central, vasos sanguíneos y glándulas llamadas criptas de Lieberkuhn, que se extienden hasta la capa muscular de la mucosa. La parte superior de

las criptas se halla poblada por células caliciformes y células enteroendócrinas, mientras que en la base de la cripta se encuentran principalmente las células de Paneth y células regenerativas (Smith LH et al., 1983; Ross MH et a., 1997).

En condiciones basales pudimos observar expresión del transportador DMT1 en los enterocitos de vellosidades duodenales, con localización intracelular (Figura 41 A, B). Por el contrario, las células caliciformes de las vellosidades y las criptas duodenales no mostraron expresión de DMT1 (Figura 41 C).

Durante la crisis hemolítica aguda (días 3 y 4), como se evidencia por los parámetros hematológicos (Hb: 7.4 ± 0.63 y HCT: 34.3 ± 0.28), no se vieron cambios en la expresión de DMT1 respecto a enterocitos de ratones No Anémicos (Figura 42).

Sin embargo, pudimos detectar diferencias en la expresión de DMT1 el día 5, cuando los valores hematológicos mostraron una tendencia a retornar a los niveles basales. En esta etapa, DMT1 mostró localización en la membrana apical celular y distribución intracelular, lo que podría sugerir la redistribución celular de DMT1 cuando las demandas de Fe son intensas (Figura 43).

No se observó DMT1 en células caliciformes y criptas duodenales de ratones Anémicos (Figura 44). En el control negativo no se observó inmunomarcación inespecífica en el tejido duodenal (Figura 45).

Dado que DMT1 es un importador de Fe, su redistribución hacia la membrana apical de los enterocitos en la etapa de recuperación de la anemia podría estar reflejando la captación duodenal de Fe. Para confirmar esta interpretación relacionada con su qfuncionalidad, encaramos la evaluación cualitativa de Fe.

A diferencia de la ausencia de pigmentos de Fe³⁺ en vellosidades y criptas duodenales de ratones No Anémicos (Figura 46 A y B), en la crisis hemolítica se identificó abundante Fe hemosiderina intracelular, en toda la extensión de las vellosidades (día 3) (Figura 46 C y D). Los pigmentos de Fe³⁺ fueron menos evidentes los días 4 y 5 de la anemia. Al igual que en condiciones basales, en la anemia no se detectó Fe³⁺ en otras estructuras celulares del duodeno.

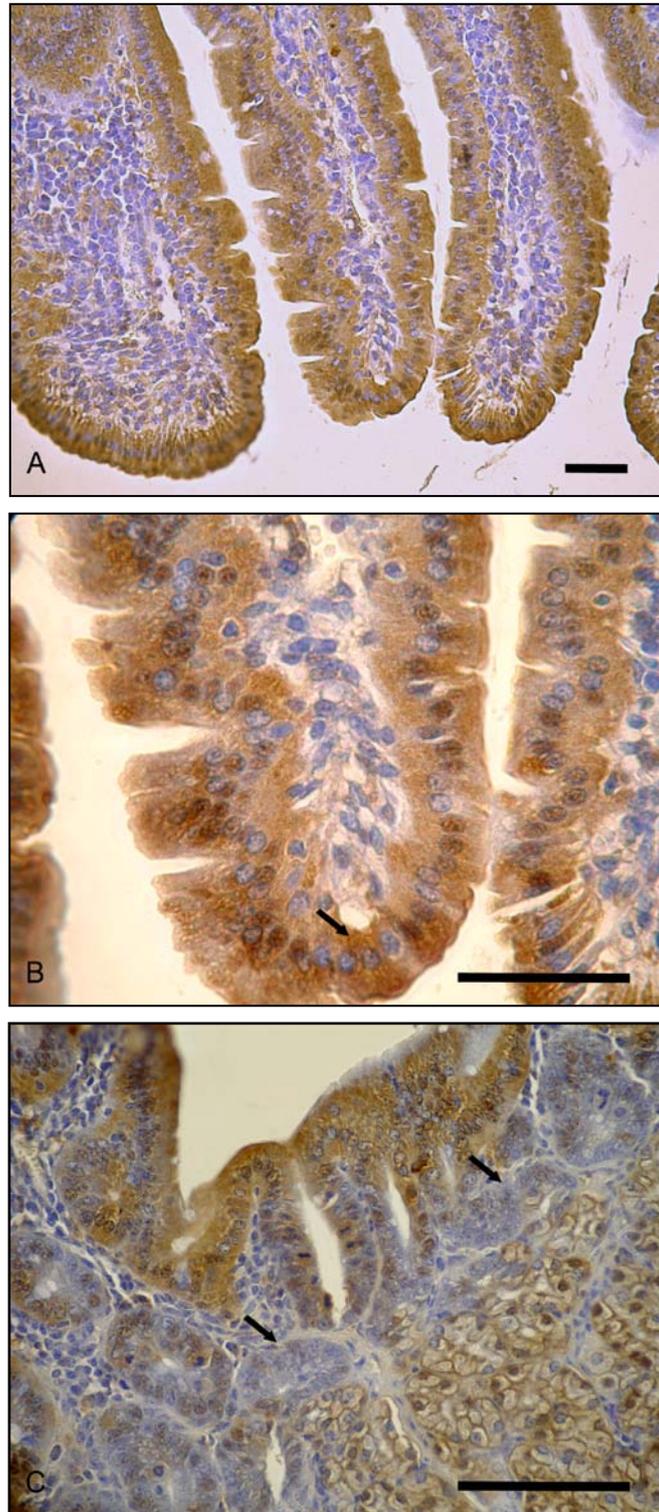


Figura 41. Expresión de DMT1 Duodenal. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular de DMT1 en enterocitos (A, B) y ausencia de DMT1 en criptas duodenales (flecha) (C). X 400 (A), X 1000 (B, C). Escala: 30 μ m

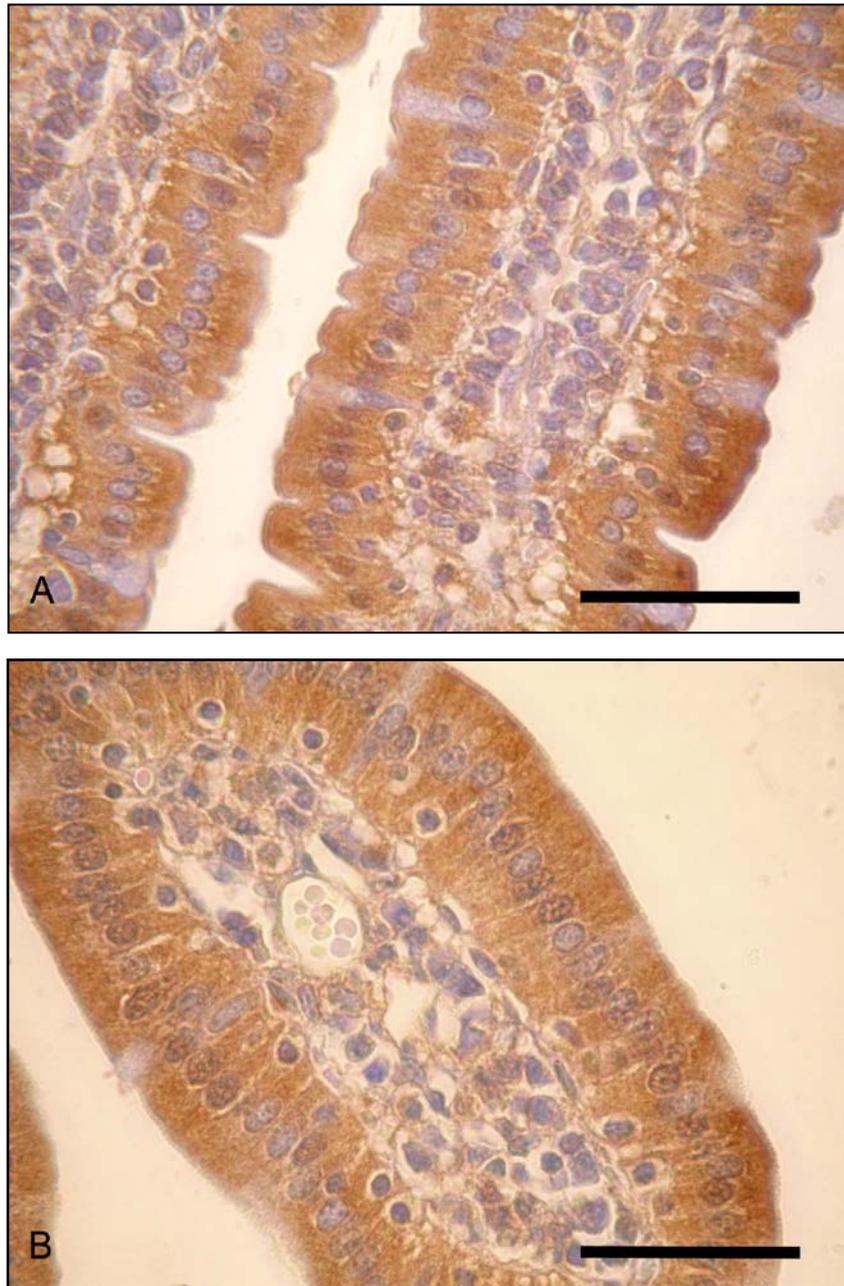


Figura 42. Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, utilizando. Se muestra expresión intracelular de DMT1 en enterocitos el día 3 de la Anemia (A) y el día 4 de la Anemia (B). X 1000 (A, B). Escala: 30 μ m

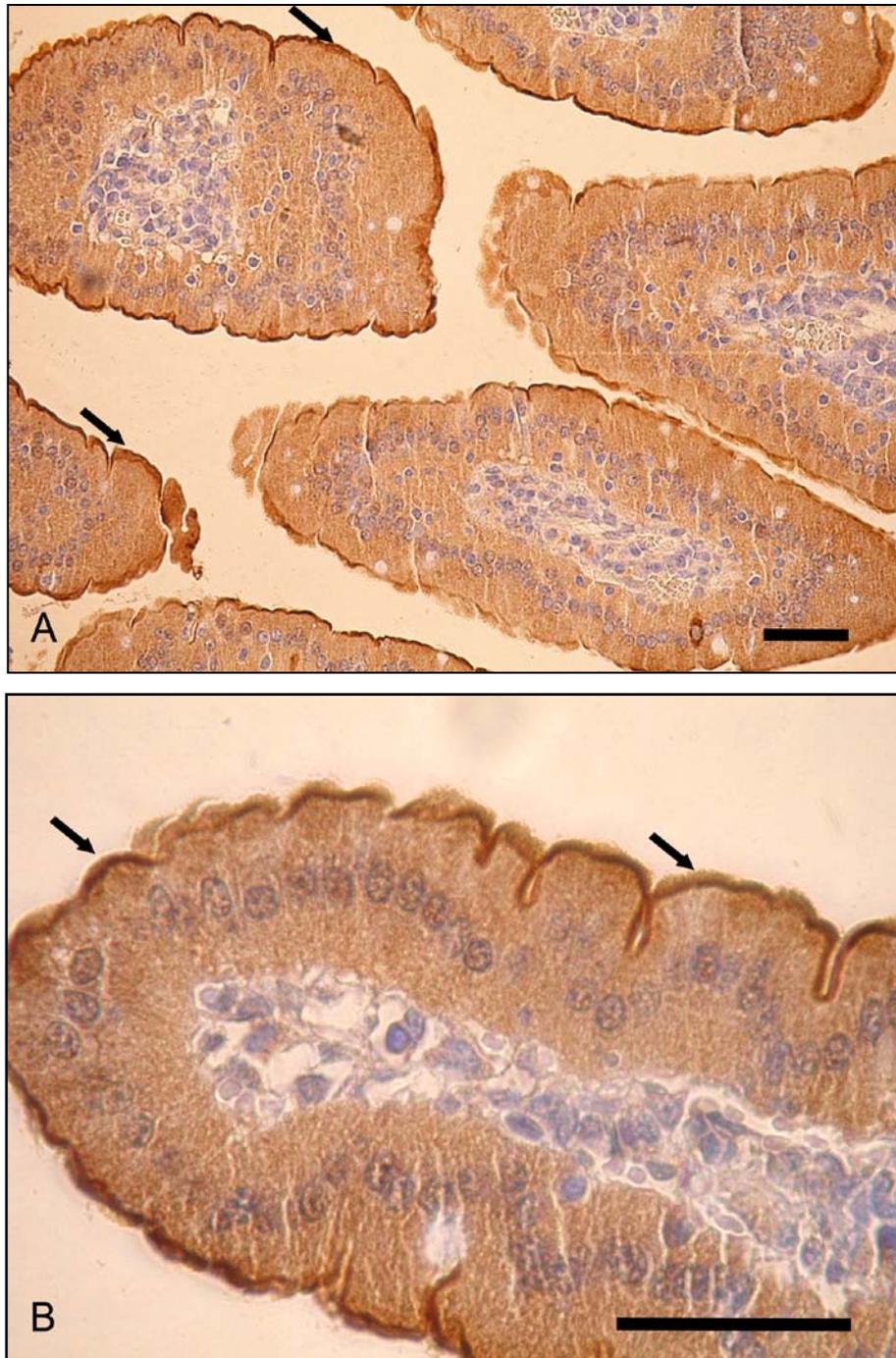


Figura 43. Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Localización de DMT1 en la membrana apical celular (flecha) y expresión intracelular del transportador (día 5) (A, B). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

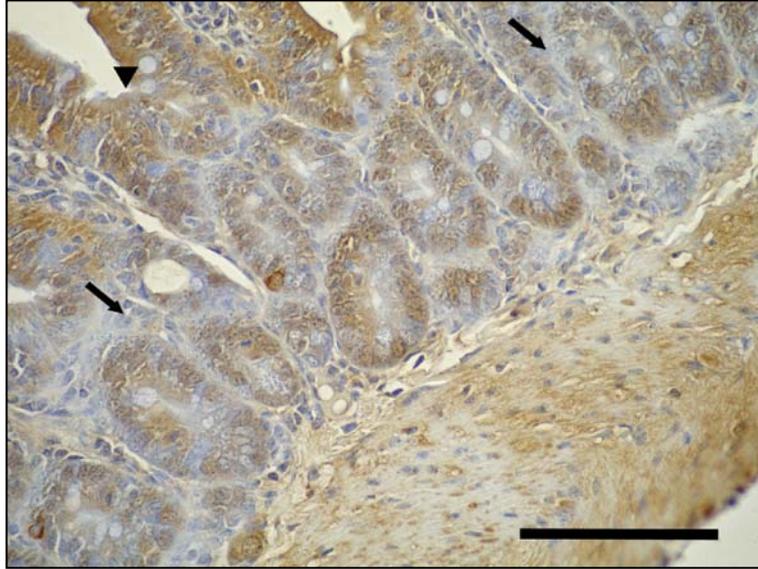


Figura 44. Expresión de DMT1 en criptas duodenales en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Ausencia de expresión de DMT1 en criptas duodenales (flecha) y en células caliciformes (cabeza de flecha) (día 5). X 1000. Escala: 30 μ m.

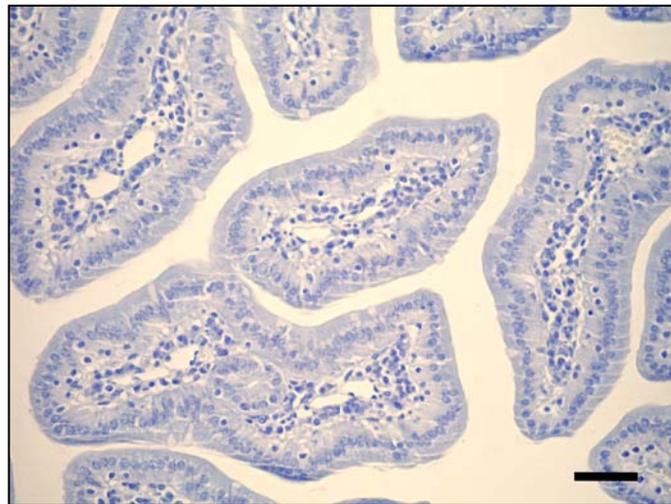


Figura 45. Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observan marcación inespecífica en las vellosidades duodenales (día 5). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m.

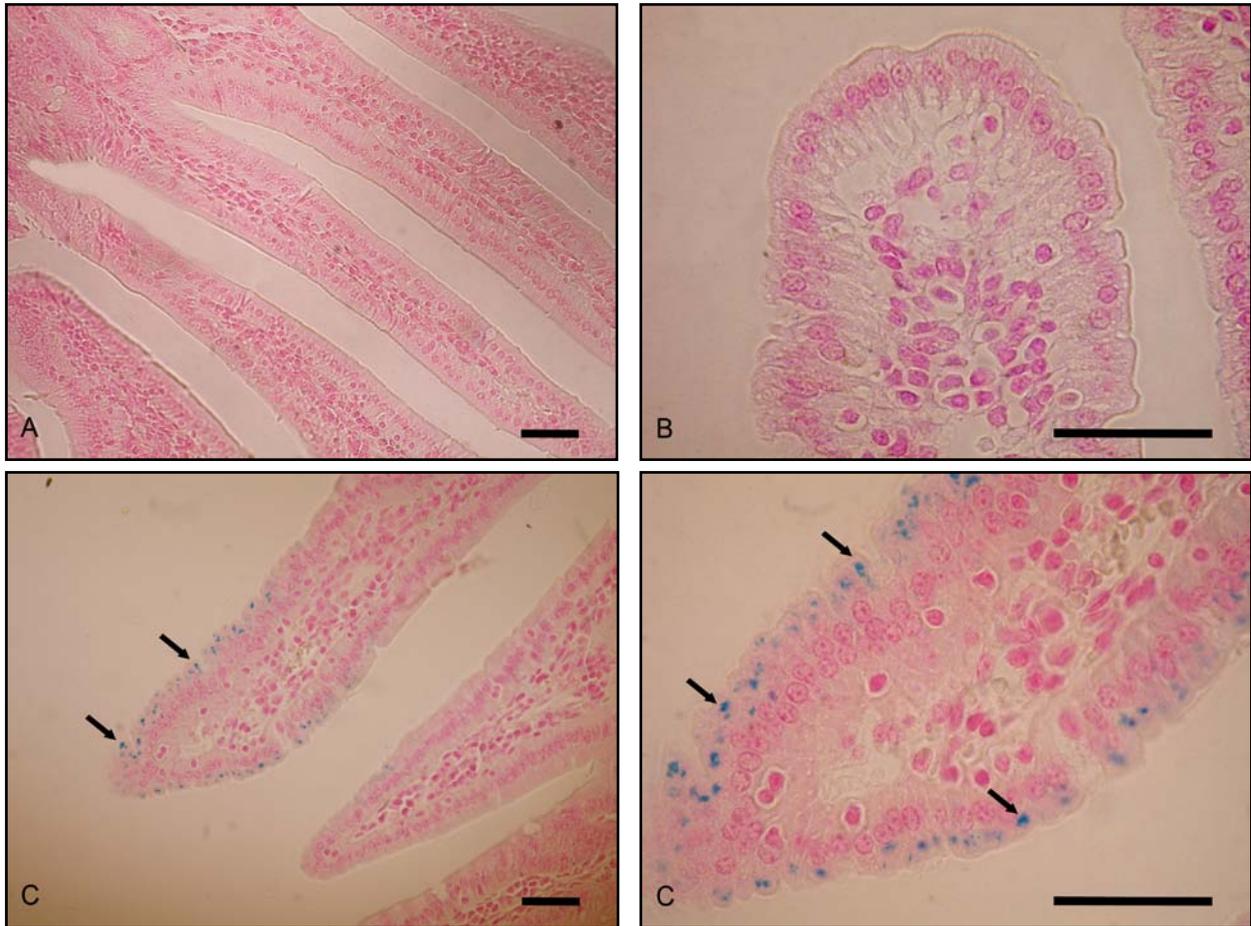


Figura 46. Tinción de Perl's del Tejido Duodenal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. No Anémicos (A y B): no se observan pigmentos de Fe en las vellosidades duodenales. Anémicos día 3 (C y D): Pigmentos de Fe en los enterocitos, con localización intracitoplasmática (flecha). X 400 (A, C), X 1000 (B, D). Escala: 30 μ m

1.1.b. TEJIDO HEPÁTICO

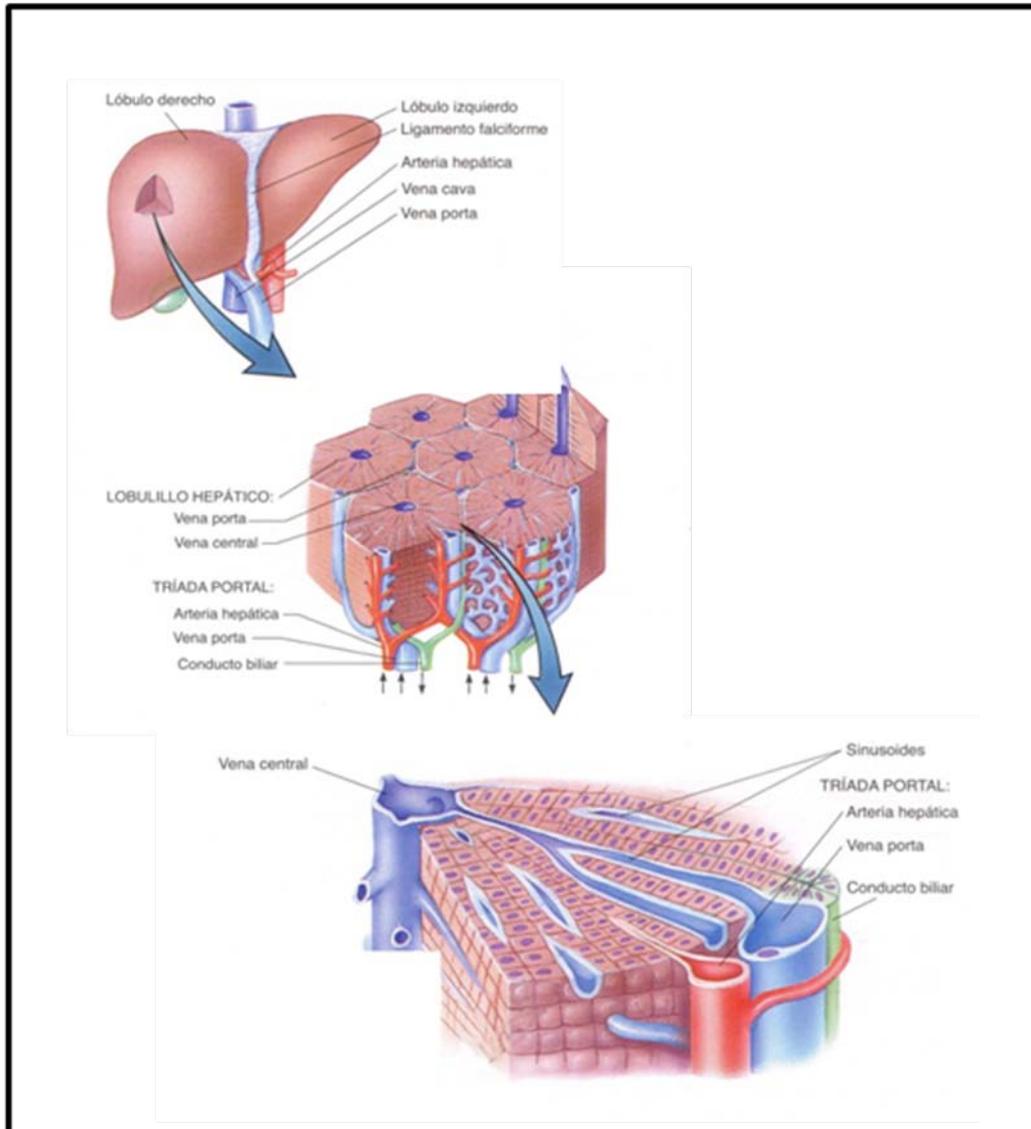


Figura 47. Diagrama esquemático de la estructura del hígado (Gartner-Haitt. Atlas Color de Histología. 4^o edición)

Se muestra un diagrama esquemático de la estructura del hígado (Figura 47). El parénquima hepático está formado por lobulillos hepáticos que contienen varios tipos celulares: hepatocitos, células de Kupffer, células de Ito y células endoteliales. La disposición de los hepatocitos en hileras delimita un espacio extravascular llamado sinusoide hepático. El Lobulillo Clásico es una unidad funcional de la estructura

hepática. Presenta una organización hexagonal, con una vena en el centro del hexágono (vena central) y las tríadas portales ubicadas en sus vértices. En esta estructura, los sinusoides hepáticos drenan en la vena central la sangre venosa y arterial procedente de la tríada portal. Por este motivo, a medida que la sangre fluye se genera una disminución del aporte de oxígeno y de nutrientes a las células próximas a la vena central (Smith LH et al., 1983; Ross MH et al., 1997).

El tejido de animales sin tratar mostró expresión del transportador DMT1 principalmente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también se observó inmunomarcación cercana a la membrana plasmática en algunos hepatocitos (Figura 48). Fue evidente la marcación diferencial de los hepatocitos, observándose grupos celulares fuertemente positivos para DMT1, otros levemente marcados y otros negativos (Figura 48).

Cuando se analizó el patrón de distribución de DMT1 en el hígado se vio asociación de los hepatocitos inmunomarcados con grandes vasos sanguíneos, principalmente en estructuras con morfología de venas centrales (Figura 48).

Es importante destacar que en la crisis hemolítica más marcada (día 3), se vio moderada expresión de DMT1 en hepatocitos, siendo mucho menor el día 4 de la anemia (Figura 49). Este perfil de inmunomarcación de DMT1 en hígado se podría explicar por la mayor demanda de Fe, un nutriente esencial para la actividad eritropoyética. Esta hipótesis podría confirmarse dado que cuando se compensó la anemia (día 5) y la demanda de Fe fue menor, nuevamente la expresión hepática de DMT1 fue evidente, manteniendo su localización intracelular y su asociación con vasos sanguíneos (Figura 49 C). En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido hepático (Figura 50).

El análisis cualitativo de los depósitos hepáticos de Fe mostró pigmentos de Fe³⁺ aislados en células con morfología de células de Kupffer el día 4 de la anemia, sin evidenciarse Fe en el tejido de animales sin tratar (Figura 51).

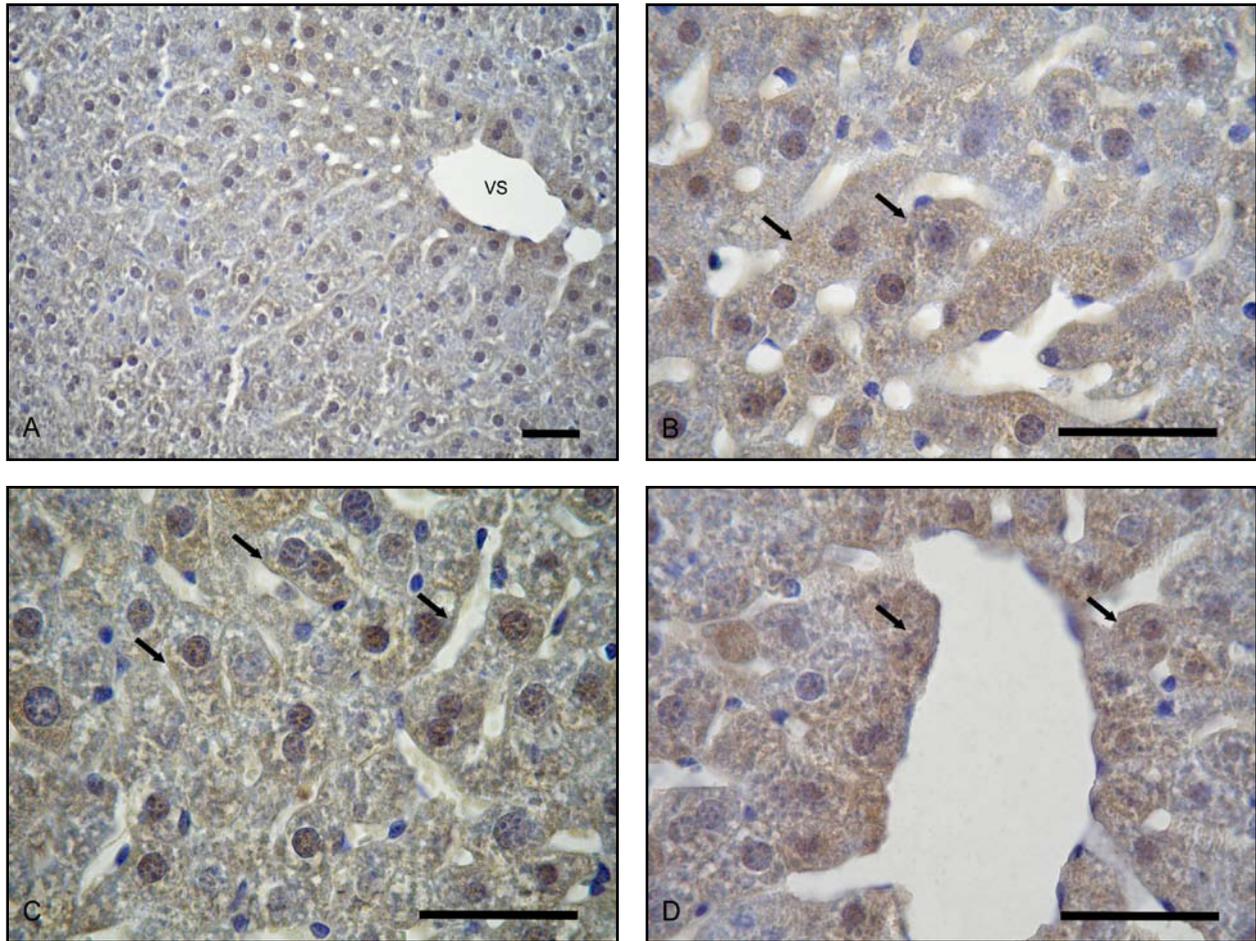


Figura 48. Expresión Hepática de DMT1. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. En A y B se muestra expresión de DMT1 con localización intracelular. En C se muestra expresión de DMT1 asociado a la membrana plasmática de algunos hepatocitos (flecha). En D se muestra inmunomarcación de DMT1 en cercanías de grandes vasos sanguíneos (flecha). X 400 (A), X 1000 (B, C, D). VS: Vaso sanguíneo. Escala: 30 μ m

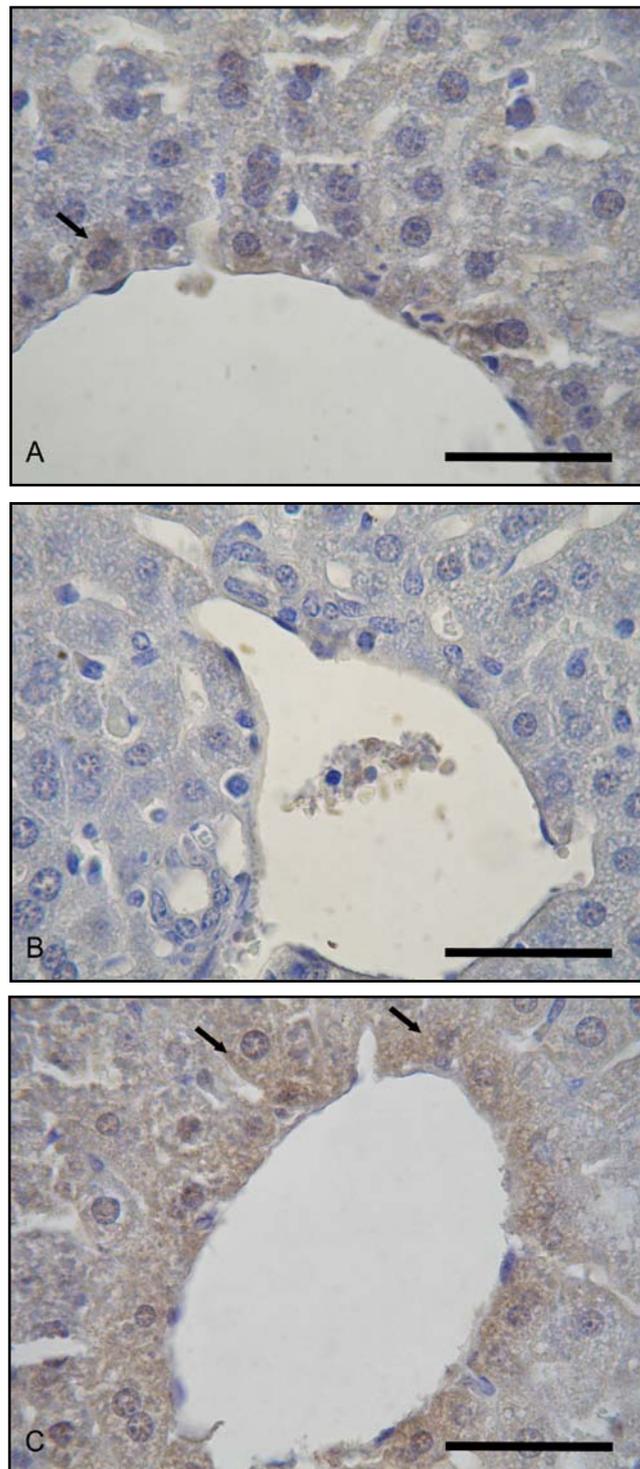


Figura 49. Expresión Hepática de DMT1 en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión intracelular de DMT1 en hepatocitos el día 3 (A) y el día 4 de la Anemia (B). En C se muestra nuevamente intensa expresión de DMT1 en tejido hepático el día 5 (flecha). X 1000 (A, B, C). Escala: 30 μ m

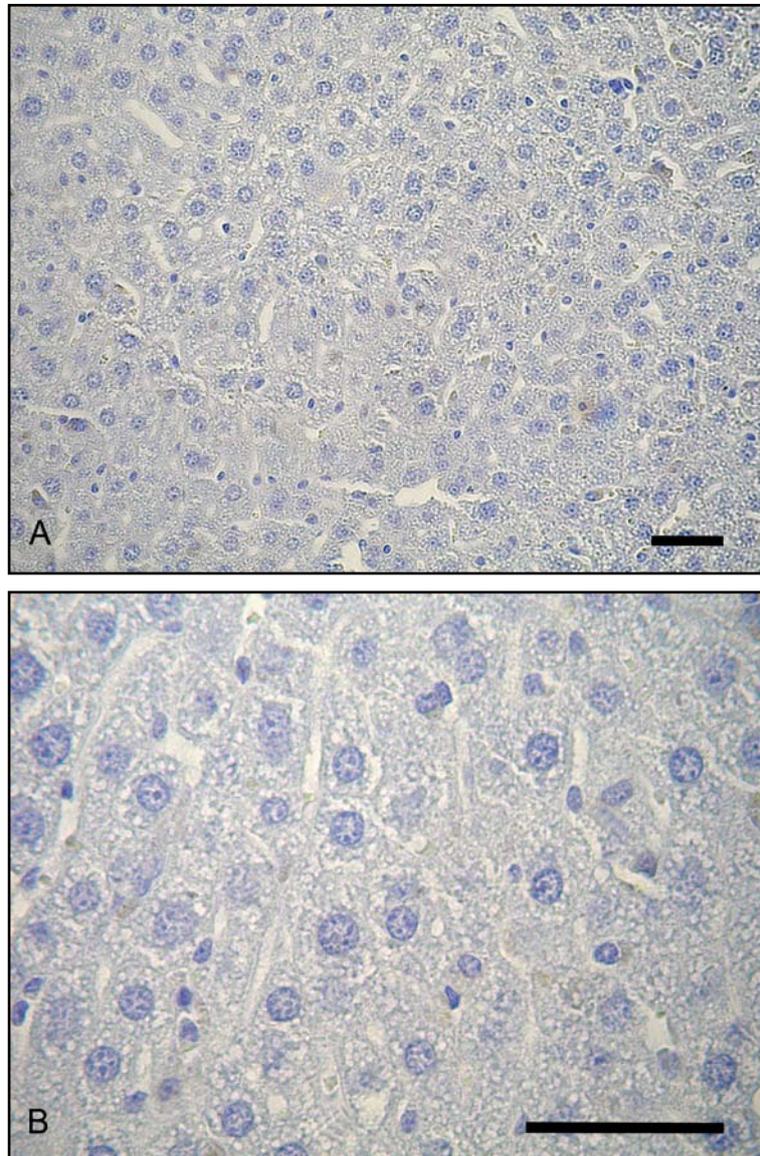


Figura 50. Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica (día 5). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

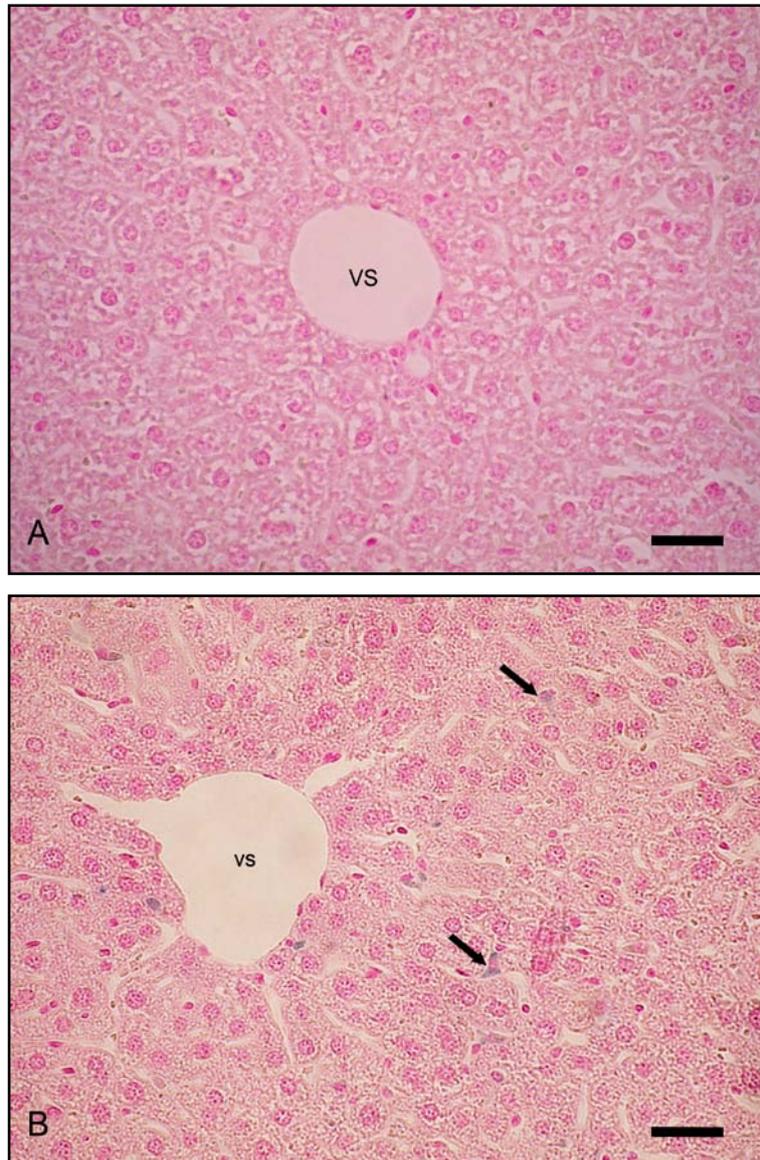


Figura 51. Tinción de Perl's en Tejido Hepático en Condiciones Basales y en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. No Anémico (A): no se observan pigmentos de Fe. Anémico día 4 (B): se observan escasos pigmentos de Fe localizados en células con morfología de células de Kupffer (flecha). X 400 (A, B). VS: Vaso sanguíneo. Escala: 30 μ m

1.1.c. TEJIDO ESPLÉNICO

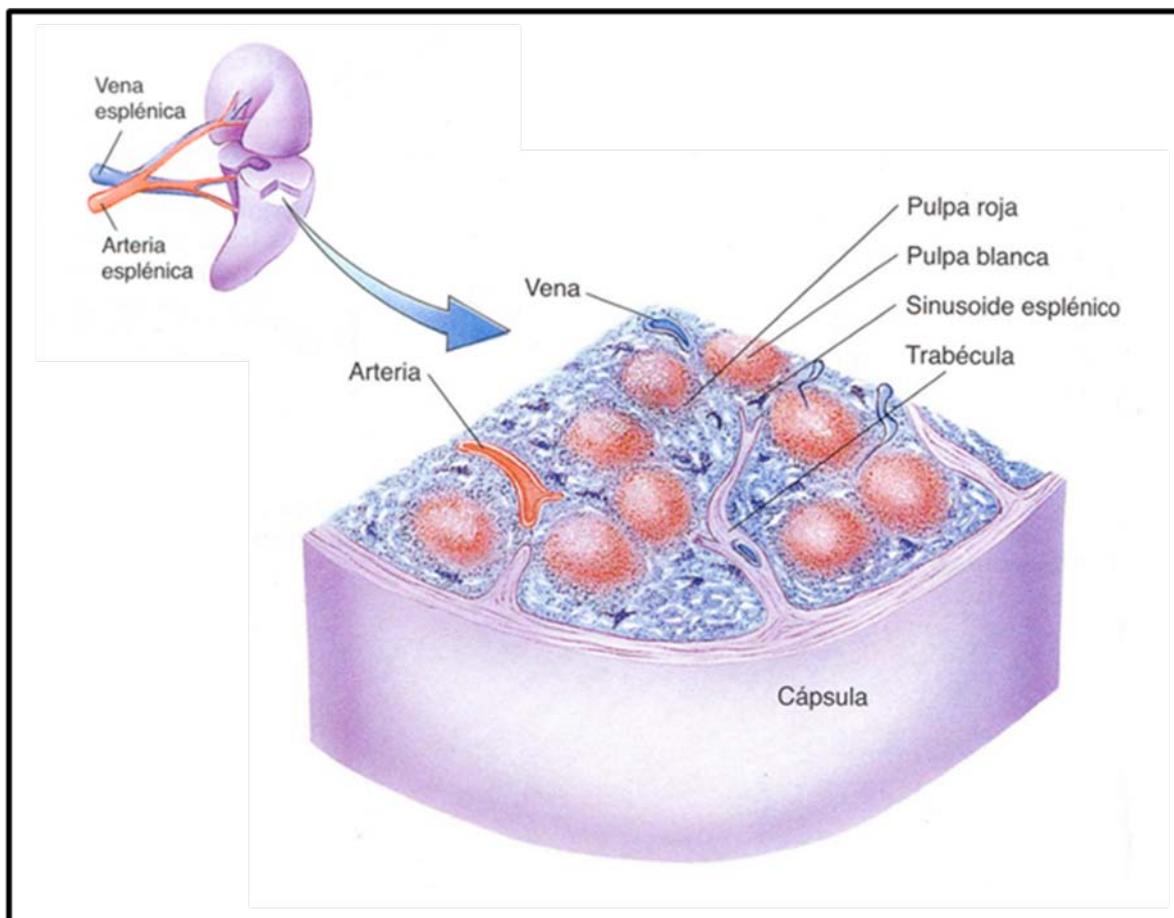


Figura 52. Diagrama esquemático de la estructura del bazo (Gartner-Haitt. Atlas Color de Histología. 4^o edición)

Se muestra un diagrama esquemático de la estructura del bazo (Figura 52). El bazo, órgano localizado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, está cubierto por una cápsula de tejido conectivo, desde donde parten trabéculas hacia el parénquima esplénico. Desde el punto de vista morfológico y funcional, el parénquima esplénico se divide en dos regiones: pulpa blanca y pulpa roja, separadas por una zona marginal. La pulpa roja está formada por cordones esplénicos y sinusoides. Los cordones esplénicos están formados por una malla de células reticulares y fibras reticulares que contienen eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, megacariocitos y granulocitos. La pulpa blanca está formada por vainas linfáticas periarteriales, que son

aglomeraciones de linfocitos T alrededor de una arteria central, y por nódulos linfáticos que son centros germinativos formados por linfocitos B. La zona marginal es una acumulación laxa de linfocitos y macrófagos que se localiza entre las pulpas roja y blanca (Smith LH et al., 1983; Ross MH et al., 1997).

Cuando se evaluó por inmunomarcación la presencia de DMT1 en bazo de ratones No Anémicos se detectó abundante expresión de la proteína asociada selectivamente a la pulpa roja, sin evidenciarse tinción en la pulpa blanca (Figura 53).

Posteriormente se realizó la identificación del transportador DMT1 los días de severa hemólisis. Pese a la evidente desorganización de las pulpas hallada los días 4 y 5 del protocolo experimental, se pudo observar una disminución en la intensidad de la marcación. Sin embargo, se mantuvo la localización selectiva de la tinción en la pulpa roja. Cabe mencionar que se observó marcada congestión eritrocítica asociada a la conocida función eritrofagocítica y eritropoyética del tejido esplénico murino (Figura 54).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido esplénico (Figura 55).

Sin embargo, dado que el Fe y la inmunomarcación de DMT1 adquieren una coloración similar, la tinción observada podría deberse no sólo a la presencia del transportador DMT1 sino también a los depósitos de Fe presentes en forma de hemosiderina.

Para confirmar la presencia de DMT1 identificada por la técnica inmunohistoquímica, fue necesario detectar DMT1 y hemosiderina en forma diferencial y simultánea en la misma sección histológica. Para ello desarrollamos una técnica en la que combinamos la técnica de inmunoperoxidasa con la Tinción de Perl's.

La Figura 56 muestra los depósitos de Fe^{3+} en el bazo. En ratones No Anémicos se evidenciaron abundantes pigmentos de Fe en macrófagos de la pulpa roja, sin detectarse el metal en la pulpa blanca (Figura 56A). Por el contrario, el bazo de ratones Anémicos mostró una marcada disminución en la hemosiderina (Figura 56B).

Con la estrategia metodológica de doble tinción identificamos expresión de DMT1 en bazo de ratones No Anémicos, asociado nuevamente en forma selectiva a la pulpa roja (Figura 57). La expresión de DMT1 en bazo de ratones Anémicos no mostró cambios con respecto a los No Anémicos (Figura 58).

Debido a que en ratones Anémicos y No Anémicos las células que presentaron inmunomarcación específica para el transportador DMT1 no coincidieron con aquellas que mostraron depósitos de Fe, podemos concluir que no existe colocalización de DMT1 con hemosiderina (Figura 57 y 58).

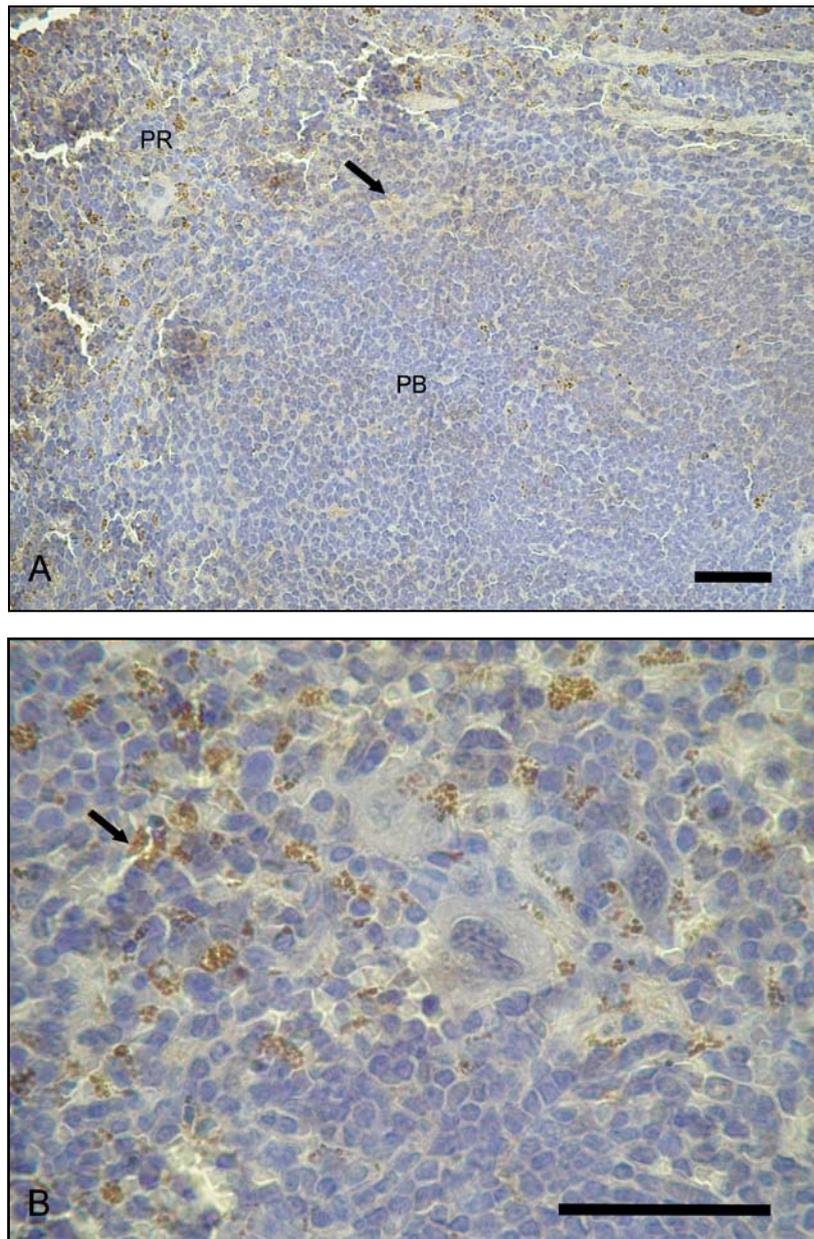


Figura 53. Expresión Esplénica de DMT1. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión de DMT1 en la pulpa roja (flecha). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 400 (A), X1000 (B). Escala: 30 μ m

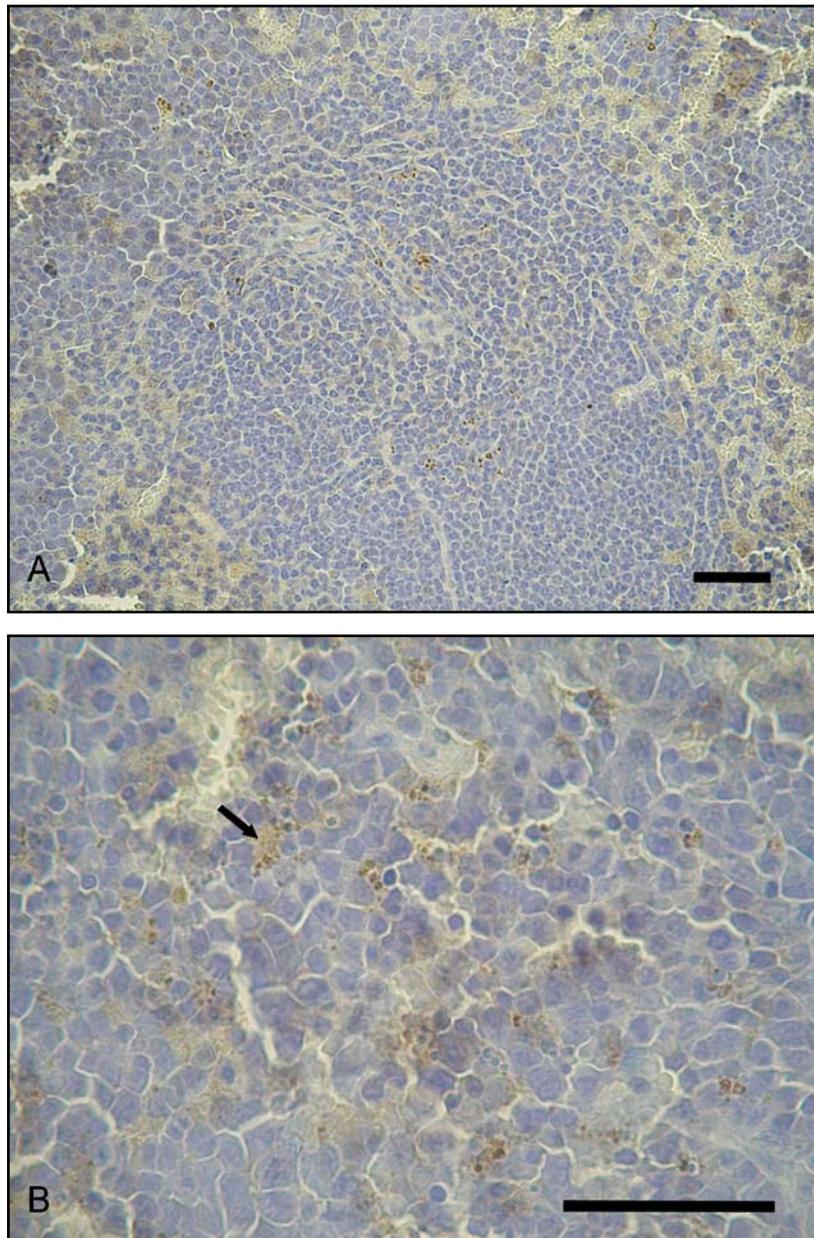


Figura 54. Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión de DMT1 (día 4). X 400 (A), X1000 (B). Escala: 30 μ m

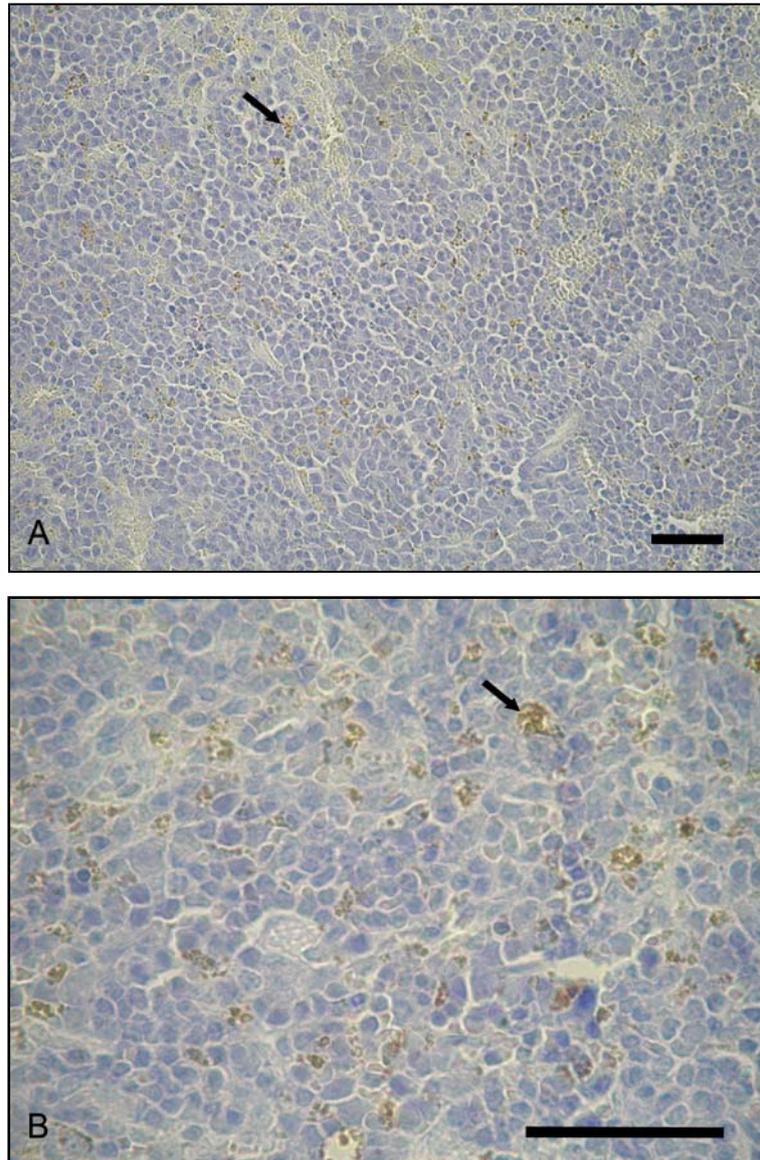


Figura 55. Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica de DMT1 y se observa hemosiderina (flecha) (día 4). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

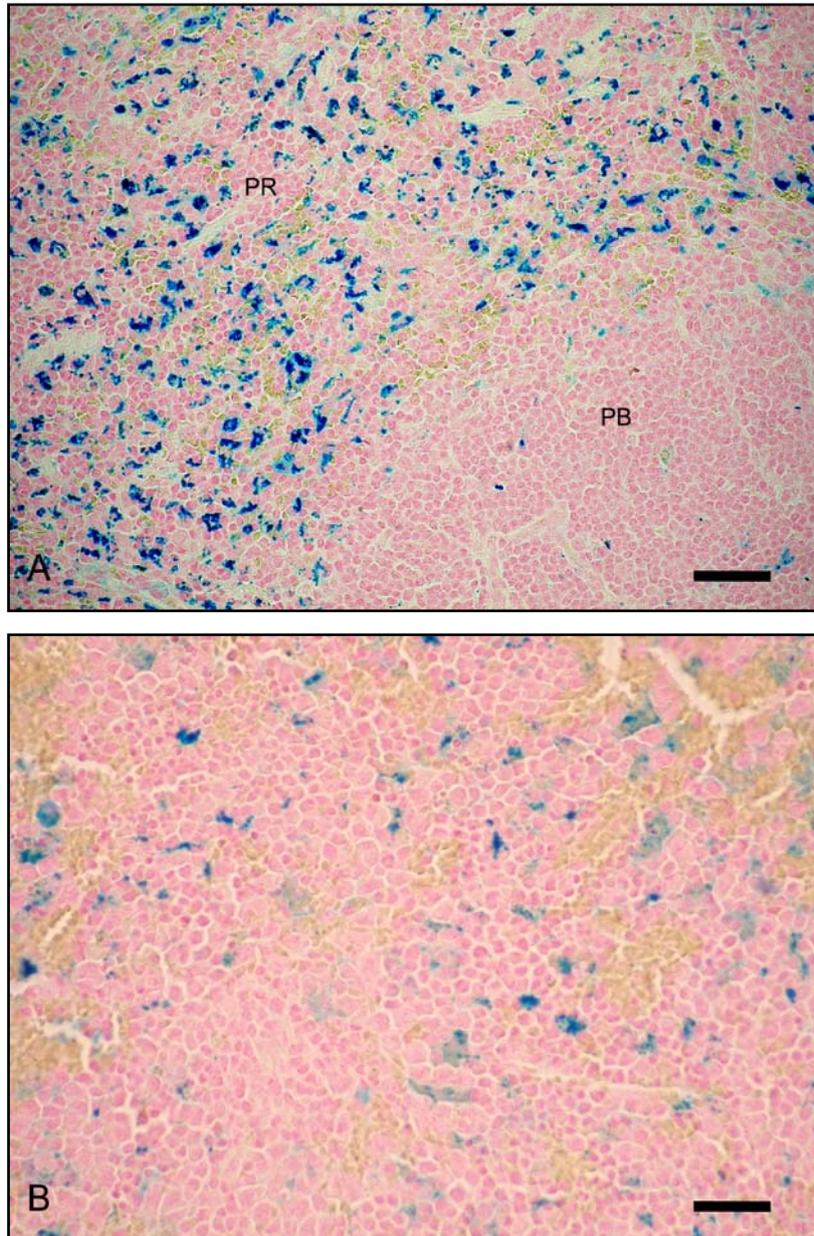


Figura 56. Tinción de Perl's de Tejido Esplénico en condiciones Basales y en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. No Anémico (A): Abundantes pigmentos de Fe en células con morfología de células de Kupffer de la pulpa roja. Anémico día 4 (B): Escasos pigmentos de Fe. PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

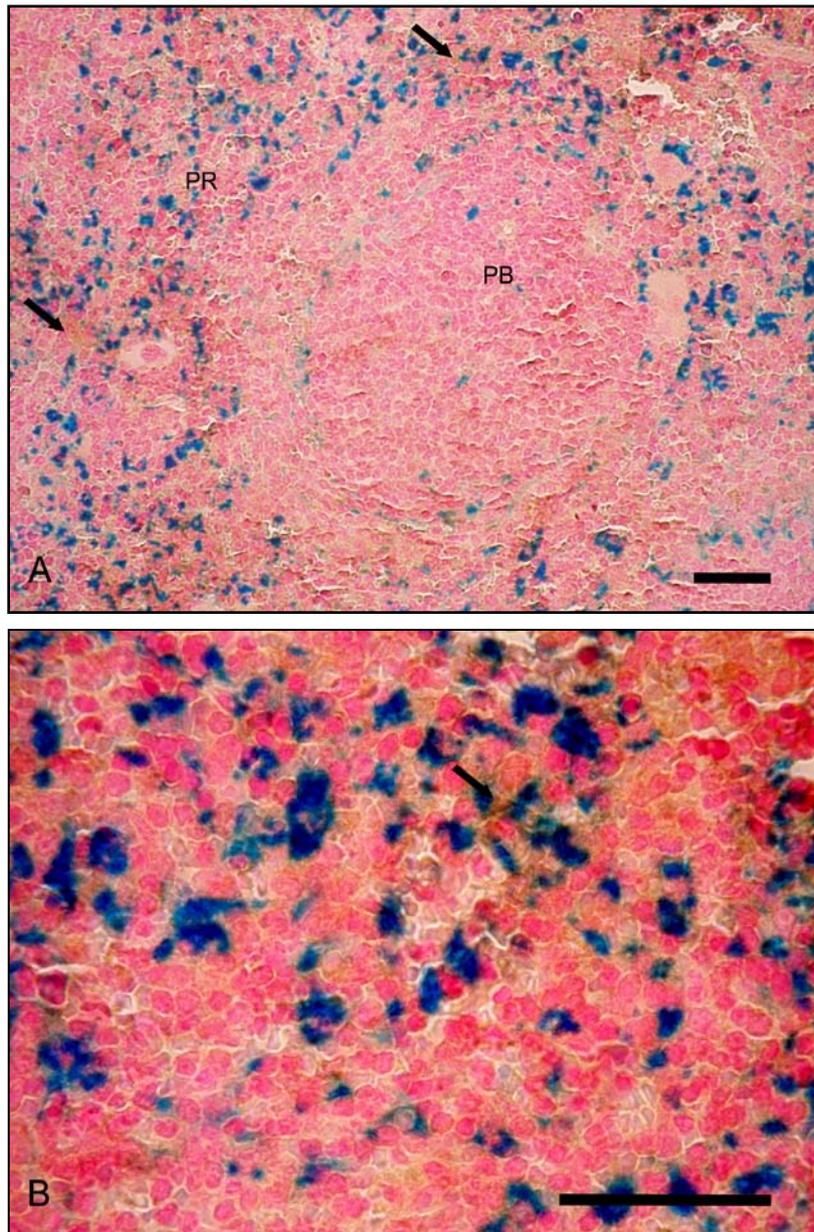


Figura 57. Expresión Esplénica de DMT1 por Técnica de Doble Tinción. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón, y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión de DMT1, asociada a la pulpa roja (flecha). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

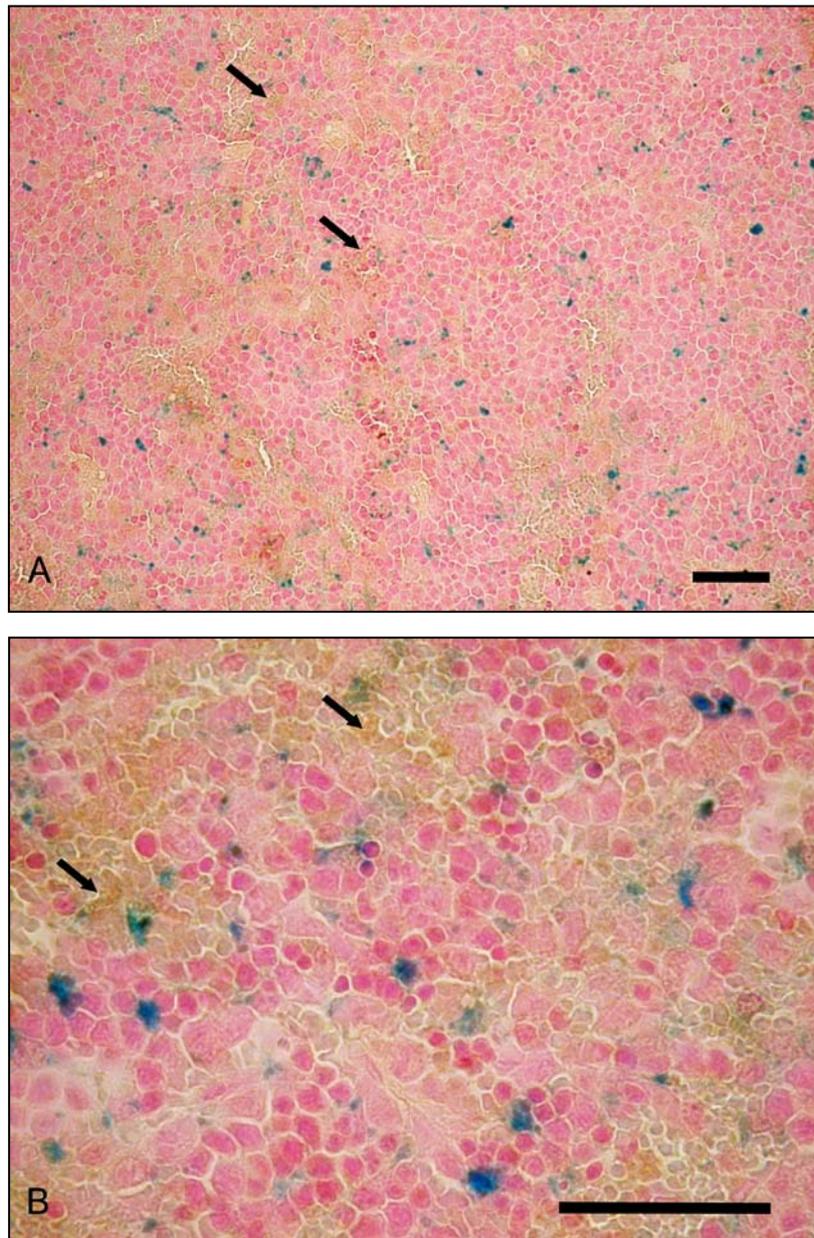


Figura 58. Expresión esplénica de DMT1 en Anemia por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón, y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Moderada expresión de DMT1 (flecha) (día 4). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

1.2. PROHEPCIDINA

TEJIDO HEPÁTICO

Otro de nuestros objetivos fue estudiar la expresión hepática de Prohepcidina en condiciones de elevada demanda de Fe como es la Anemia Hemolítica.

El hígado de ratones No Anémicos mostró moderada expresión de Prohepcidina, localizada en hepatocitos y no en células de Kupffer. La expresión de la proteína no estuvo asociada a ninguna estructura vascular específica (Figura 59).

También se evaluó la expresión de Prohepcidina durante los días de anemia severa (día 3 y 4), cuando la disminución de Hb y HCT sugirió masiva destrucción eritrocitaria y elevadas demandas de Fe para compensar el cuadro anémico (Capítulo I), y durante la etapa de recuperación de la anemia.

En la anemia aguda y en la recuperación de la anemia se observó moderada expresión de Prohepcidina, sin hallarse cambios importantes respecto al tejido de ratones No Anémicos (Figura 60).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido hepático (Figura 61).

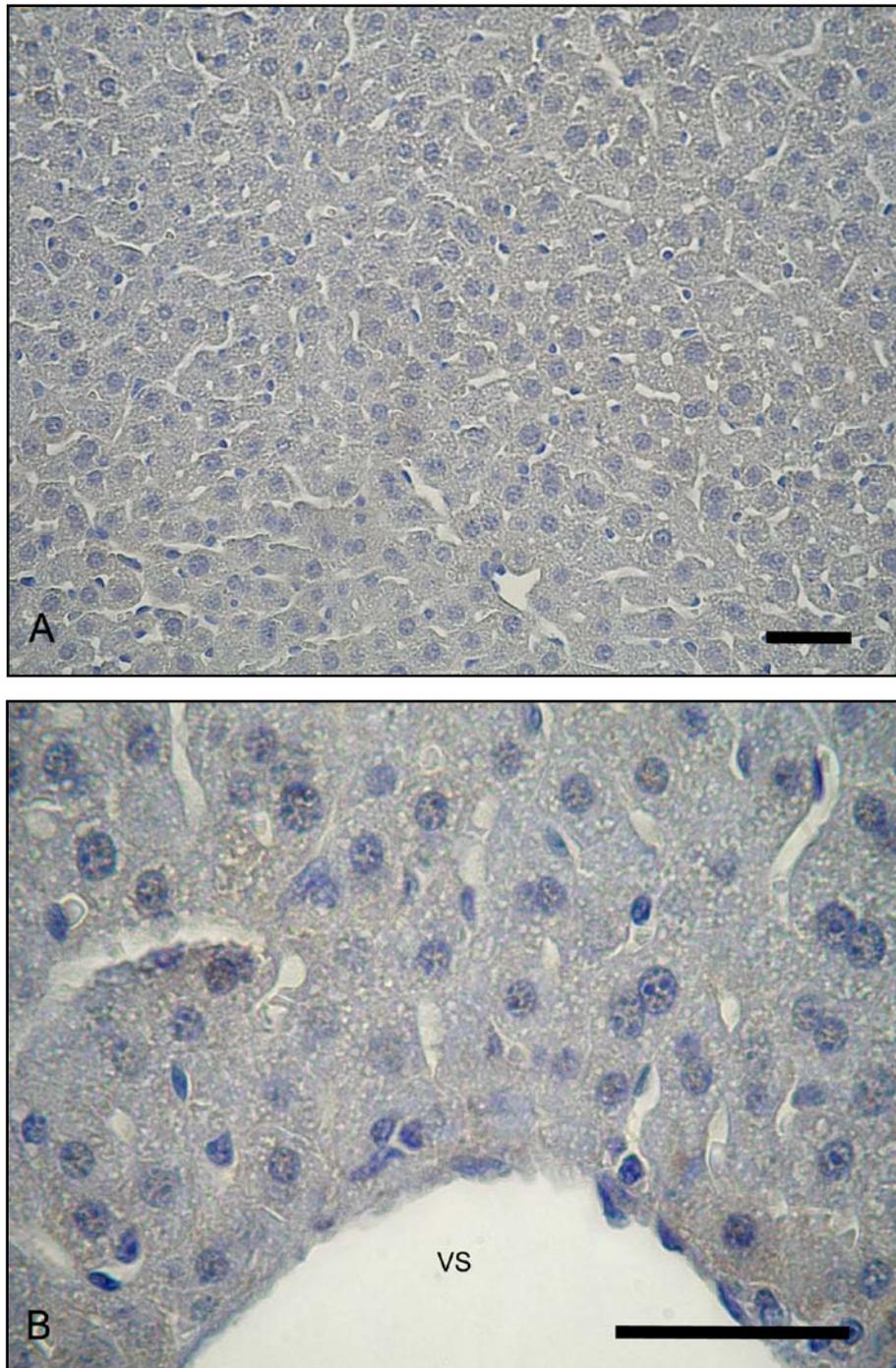


Figura 59. Expresión de Prohepcidina Hepática. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión intracelular de Prohepcidina en hepatocitos. X 400 (A), X 1000 (B). VS: Vaso sanguíneo. Escala: 30 μ m

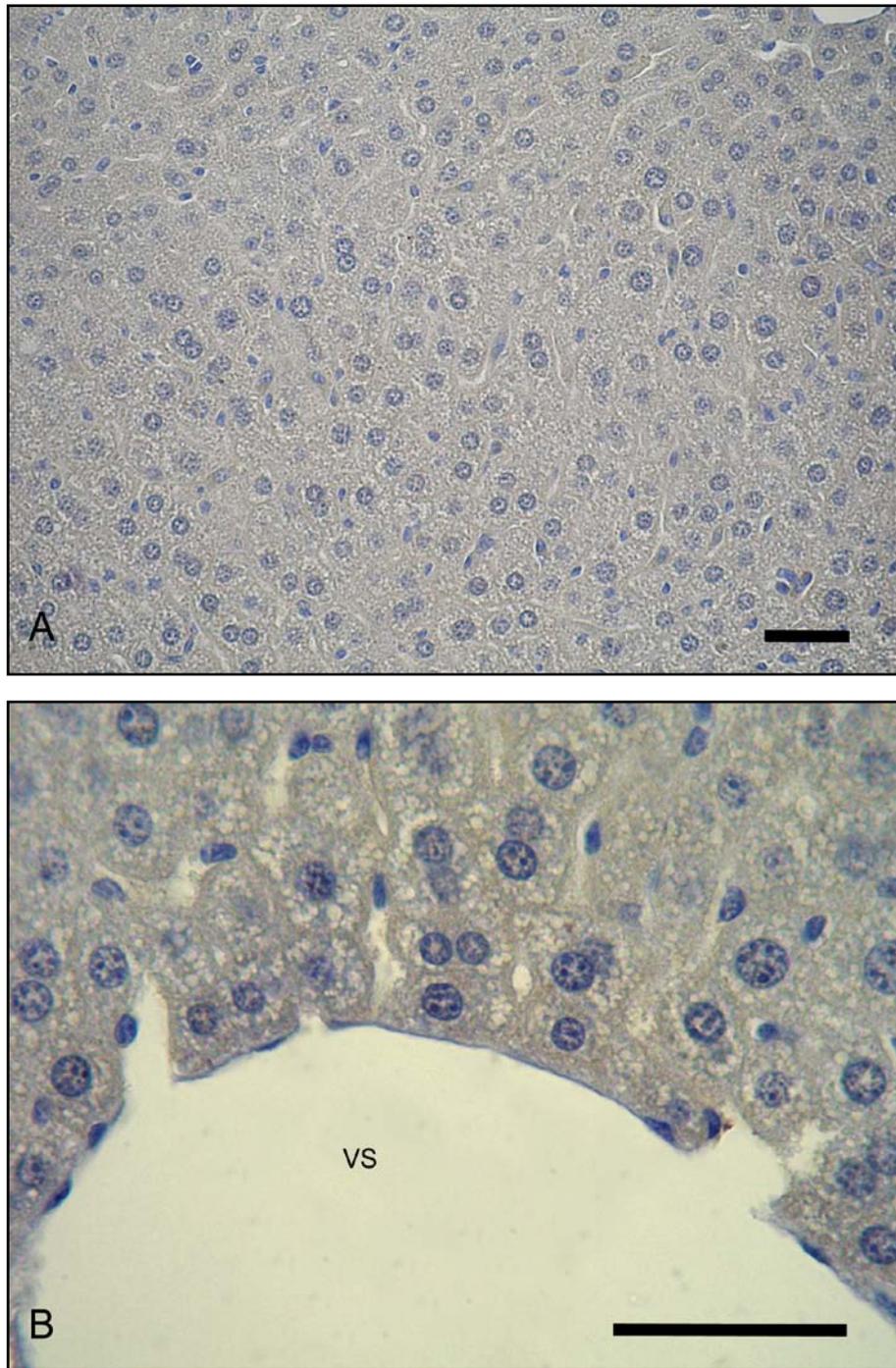


Figura 60. Expresión de Prohepcidina Hepática en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión de Prohepcidina (día 4). X 400 (A), X 1000 (B). VS: Vaso sanguíneo. Escala: 30 μ m

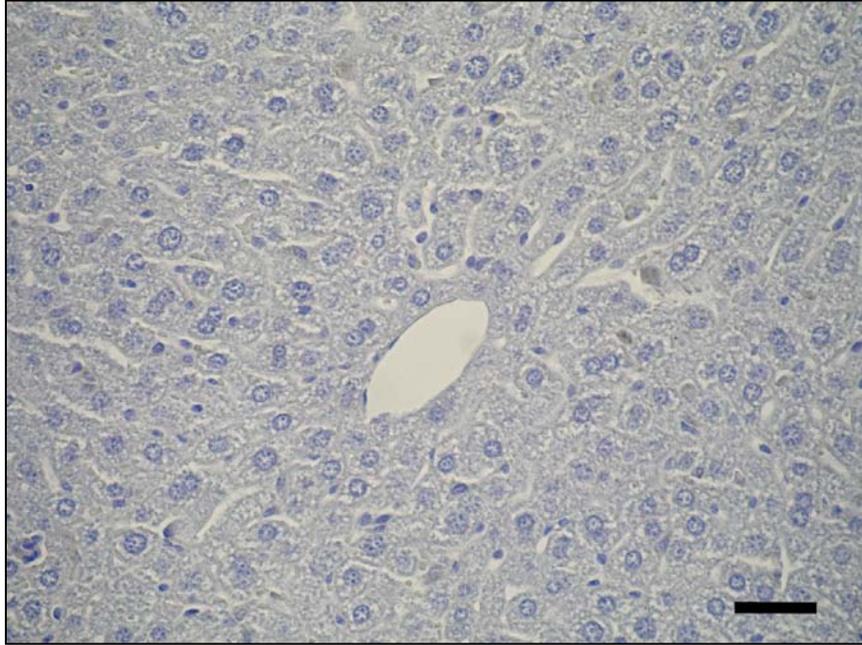


Figura 61. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Hepático en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica. X 400. Escala: 30 μ m

2. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

En una primera etapa evaluamos la expresión de DMT1 y Hepsidina en órganos claves del metabolismo del Fe, en condiciones de actividad eritropoyética normal y en condiciones fisiopatológicas como Anemia en estado de suficiencia de Fe. En una etapa posterior se propuso avanzar en el estudio de estas proteínas frente al exceso de Fe.

De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, ratones hembra se dividieron en:

- a) Sin Sobrecarga de Fe (n=10): solución salina estéril (NaCl 0,9 %) i.p. los días 0 y 10;
- b) Con Sobrecarga de Fe (n=10): 1,0 g Fe-Dextrán/Kg peso i.p. los días 0 y 10 del protocolo experimental. Los días 0, 10 y 20 un lote de animales de cada grupo fue sacrificado (n=3), se realizó la disección del hígado, duodeno y bazo, los que se procesaron para estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

2.1. TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

2.1.a. TEJIDO DUODENAL

En el duodeno de ratones con Sobrecarga de Fe se identificó expresión de DMT1 en los enterocitos, con localización intracelular. No se identificó DMT1 en las criptas duodenales y en células caliciformes (Figura 62). Estos resultados muestran un patrón de expresión similar al hallado en duodeno de animales con suficiencia de Fe, sin evidenciarse cambios en la intensidad de la expresión.

Es importante mencionar que el perfil de expresión de DMT1 coexistió con elevados niveles de Fe hepático en ratones con Sobrecarga de Fe (día 20: $4840,73 \pm 1565,91 \mu\text{mol Fe/g tejido}$ vs día 0: $293,07 \pm 22,1 \mu\text{mol Fe/g tejido}$), y con elevados niveles de Ferremia, lo que confirma la presencia del exceso de Fe en este grupo experimental.

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido duodenal (Figura 63).

El estado de Sobrecarga de Fe se confirmó con la valoración de los depósitos duodenales de Fe^{3+} . El tejido de ratones con Sobrecarga de Fe no mostró pigmentos de

Fe en enterocitos duodenales, un resultado similar al hallado en tejido de ratones sin Sobrecarga. Sin embargo, frente a la Sobrecarga se vieron abundantes depósitos de Fe localizados selectivamente en el tejido conectivo (Figura 64).

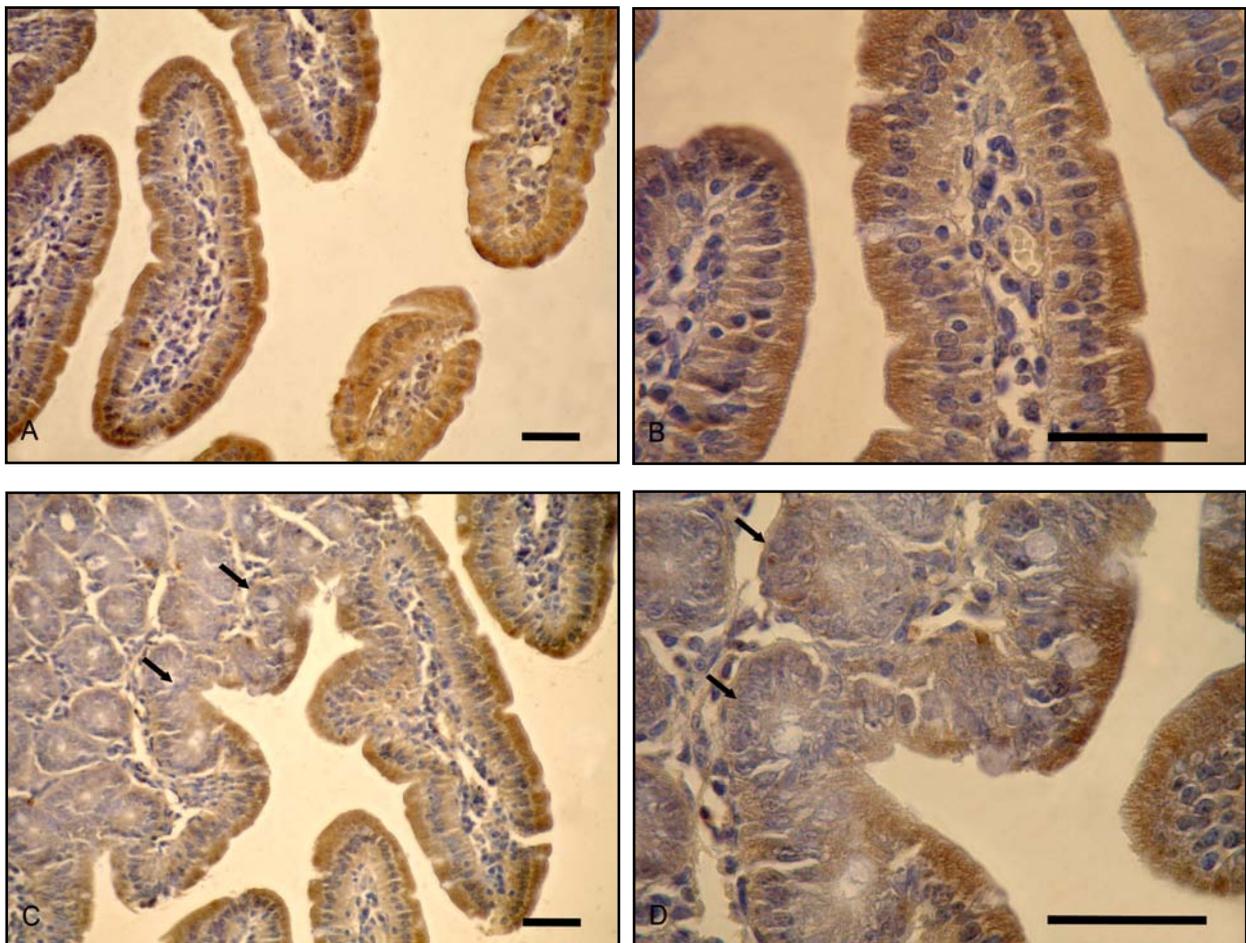


Figura 62. Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular de DMT1 en las vellosidades duodenales el día 20 (A, B). Se muestra ausencia de DMT1 en las criptas duodenales el día 20 (flecha) (C, D). X 400 (A, C), X 1000 (B, D). Escala: 30 μ m

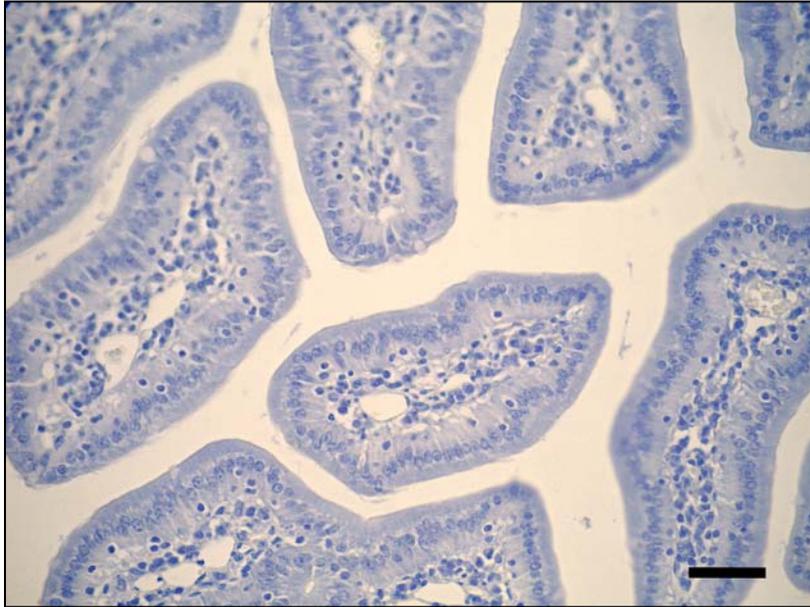


Figura 63. Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica (día 20). X 400. Escala: 30 μ m

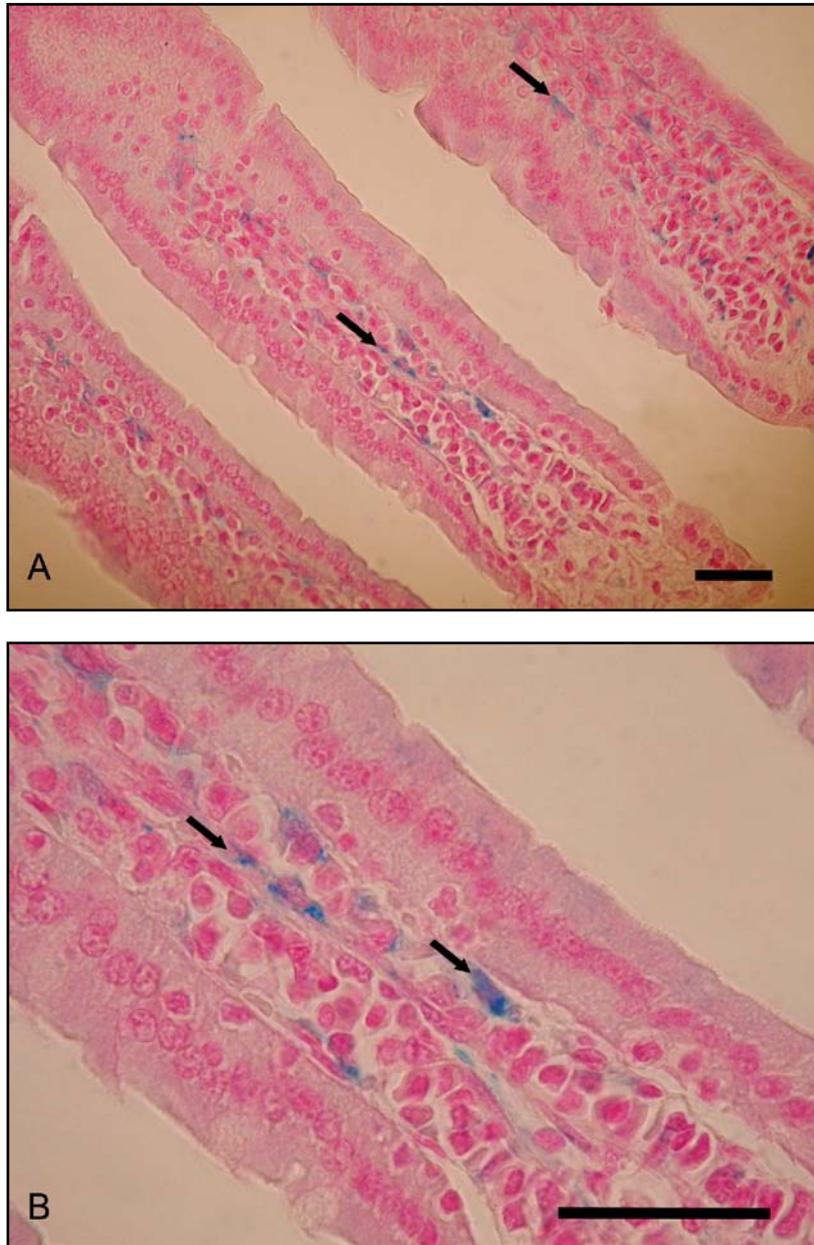


Figura 64. Tinción de Perl's en Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestran abundantes pigmentos de Fe férrico en el tejido conectivo de las vellosidades (flecha) (día 20). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

2.1.b. TEJIDO HEPÁTICO

En sobrecarga de Fe se identificó marcada expresión DMT1 en el hígado. El transportador, localizado intracelularmente, se distribuyó en forma homogénea en el hígado. Es interesante destacar que su expresión fue más evidente en las células hepáticas que rodean los grandes vasos sanguíneos (Figura 65). En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido hepático (Figura 66).

Es importante mencionar que la presencia de DMT1 coincide con elevados niveles hepáticos de Fe (Capítulo I), lo que revela el rol de DMT1 como importador de Fe cuando los niveles del metal son excesivos.

Dado que el hígado es el órgano de depósito del Fe por excelencia, es esperable contar con altos niveles de Fe en condiciones de sobrecarga. Efectivamente, como se describió en el Capítulo I, el hígado de animales con Sobrecarga de Fe mostró abundantes pigmentos de Fe en forma de hemosiderina, evaluado por Tinción de Perl's.

Es necesario aclarar nuevamente que para evaluar cualitativamente el Fe hepático por la Tinción de Perl's en el hígado y en forma simultánea identificar DMT1 en el mismo tejido, fue necesario utilizar un estrategia metodológica combinando la técnica inmunohistoquímica con la Tinción de Perl's. Esta estrategia permitió discriminar la expresión de DMT1 de la presencia de Fe³⁺.

Mediante esta estrategia experimental confirmamos la expresión de DMT1 en el interior de los hepatocitos cercanos a grandes vasos en tejido de ratones con Sobrecarga de Fe. Cabe destacar además, que nuestros resultados sugieren ausencia de colocalización de DMT1 con los depósitos de hemosiderina, debido a que la expresión de DMT1 no coincide con las concreciones de Fe halladas en células con morfología de células de Kupffer (Figura 67).

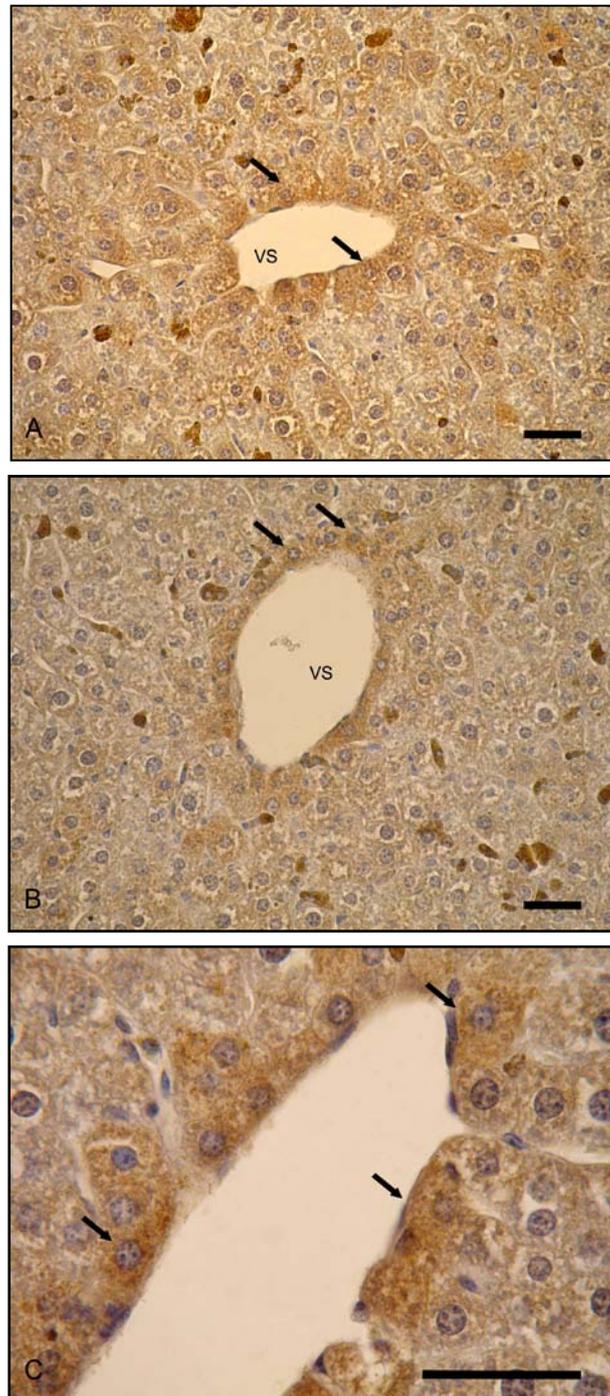


Figura 65. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 el día 20, asociado a grandes vasos sanguíneos (flecha) (A, B). Expresión intracelular de DMT1 el día 20, principalmente en la primera línea de células cercanas a un vaso sanguíneo (flecha) (C). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A, B); X 1000 (C). Escala: 30 μ m

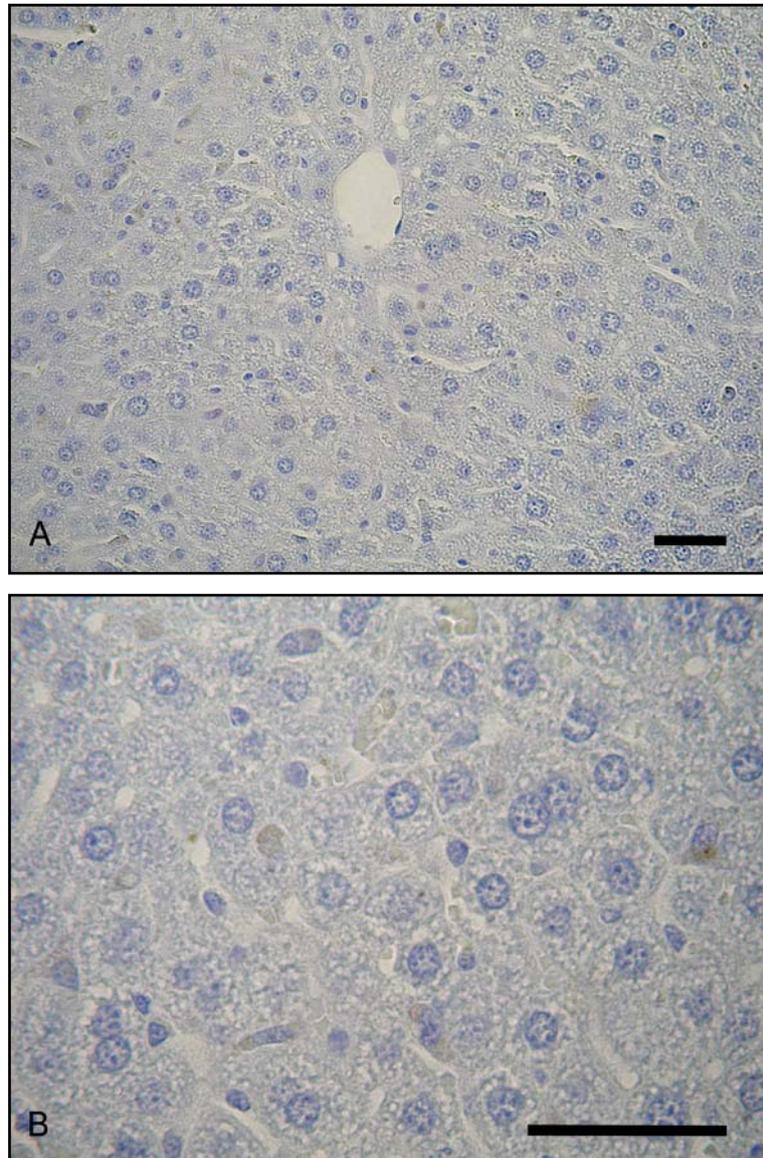


Figura 66. Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica (día 20). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

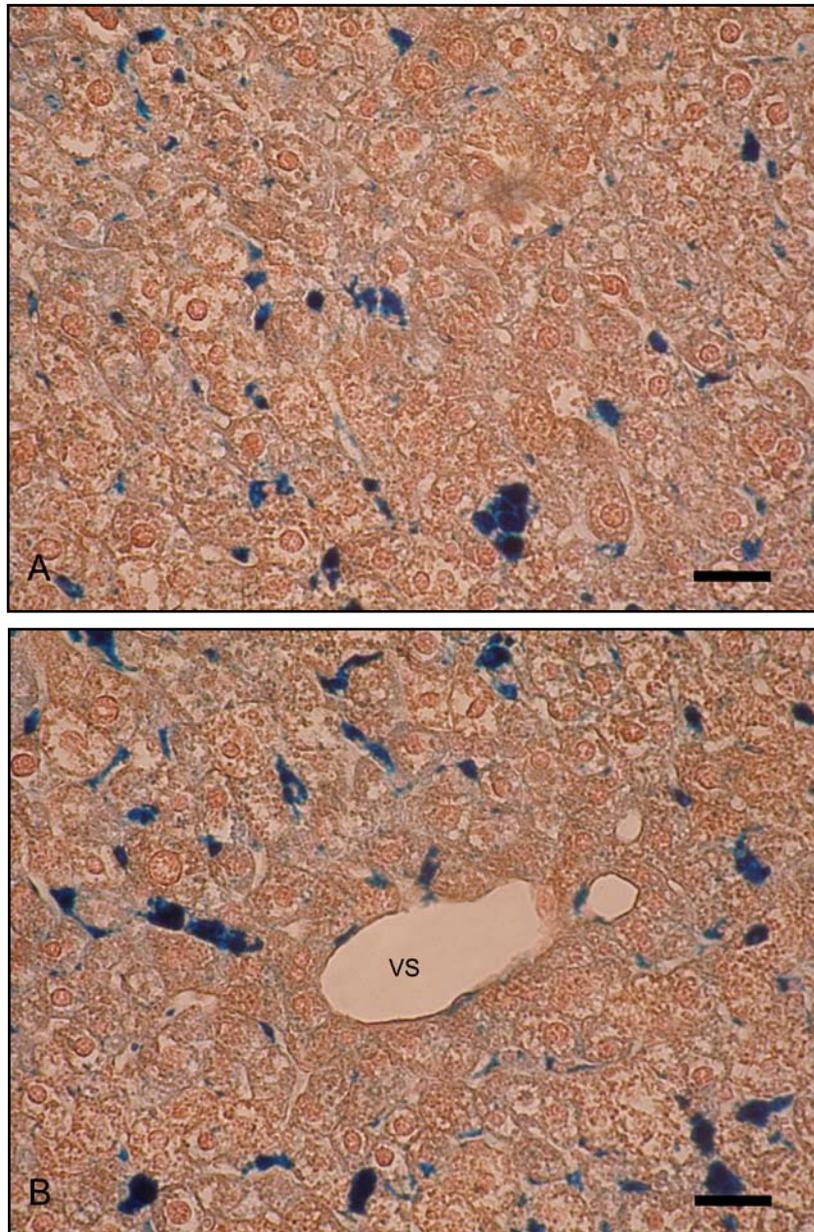


Figura 67. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón, y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en hepatocitos, y ausencia de colocalización de DMT1 con células de Kupffer (A). Immunolocalización de DMT1 asociado a grandes vasos sanguíneos. VS: Vaso Sanguíneo. X 400 (A, B). Escala: 30 μ m.

2.1.c. TEJIDO ESPLÉNICO

Por inmunohistoquímica, el bazo de animales con Sobrecarga de Fe mostró marcada expresión de DMT1, localizada selectivamente en la pulpa roja, sin evidenciarse marcación en la pulpa blanca (Figura 68). En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido esplénico (Figura 69).

Dado que el modelo experimental posee Sobrecarga de Fe, fue necesario identificar en forma selectiva los depósitos esplénicos de Fe, ya que los mismos adquieren una coloración similar a la marcación específica de DMT1.

La Figura 70 muestra los depósitos de Fe³⁺ en bazo de ratones con Sobrecarga de Fe, evidenciando abundantes pigmentos del metal con respecto al tejido de animales sin Sobrecarga, localizado principalmente en la pulpa roja, sin detectarse Fe en la pulpa blanca.

Nuevamente, la combinación de la técnica de inmunoperoxidasa con la Tinción de Perl's fue de gran utilidad para marcar en forma diferencial el Fe³⁺ y el transportador DMT1. Se detectó moderada expresión de DMT1 en Sobrecarga de Fe, sin evidenciarse cambios respecto al tejido sin Sobrecarga. Es importante destacar que nuestros resultados sugieren ausencia de colocalización del transportador DMT1 con hemosiderina, ya que las células que expresan DMT1 no poseen pigmentos de Fe (Figura 71).

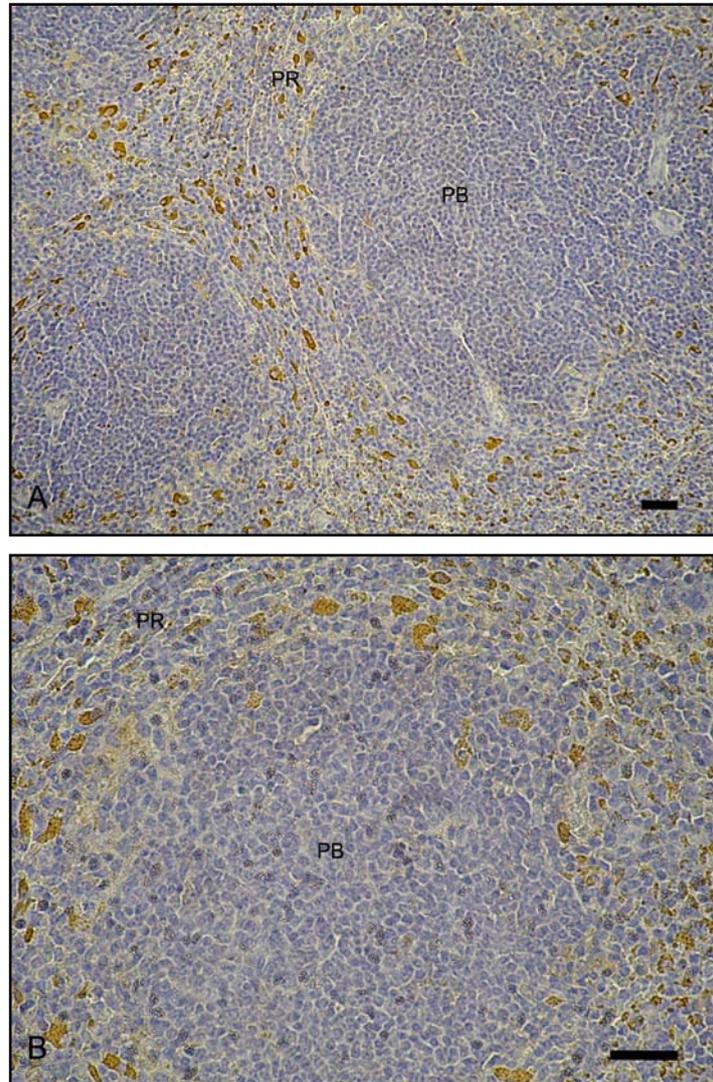


Figura 68. Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión de DMT1 en la pulpa roja (día 20). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 200 (A), X400 (B). Escala: 30 μ m

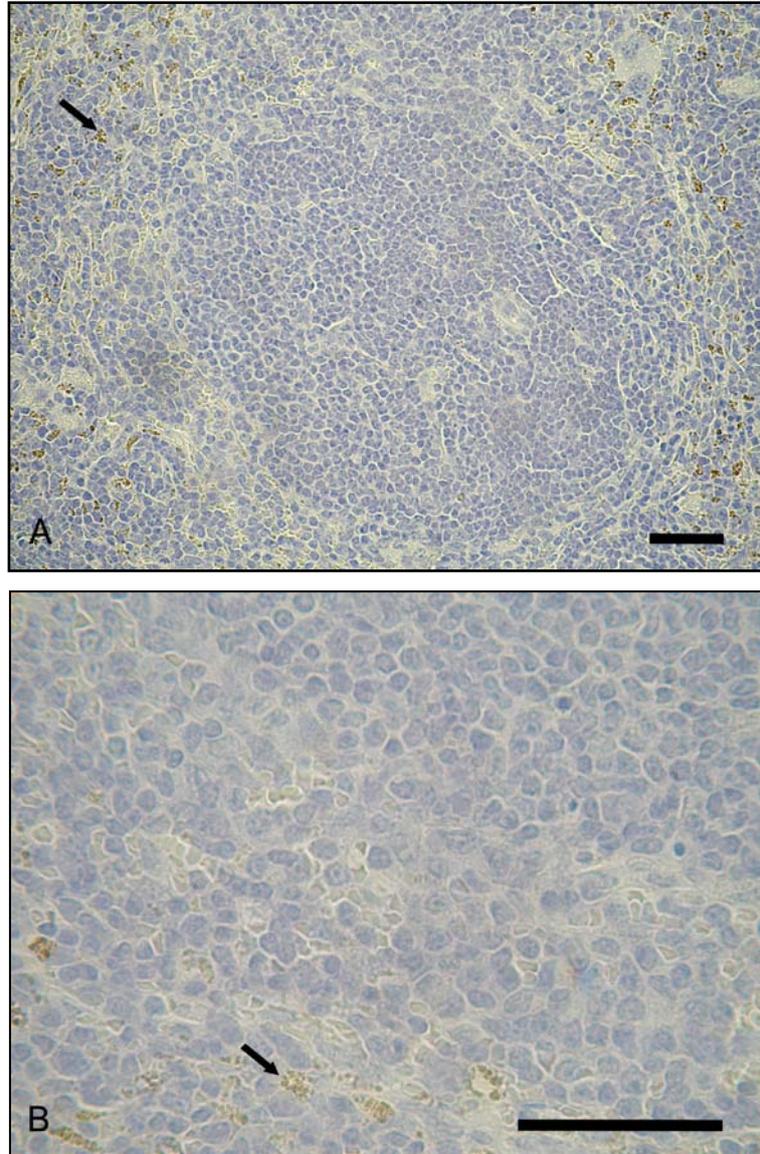


Figura 69. Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y los tejidos se procesaron para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica. Se muestra hemosiderina (flecha) (día 20). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

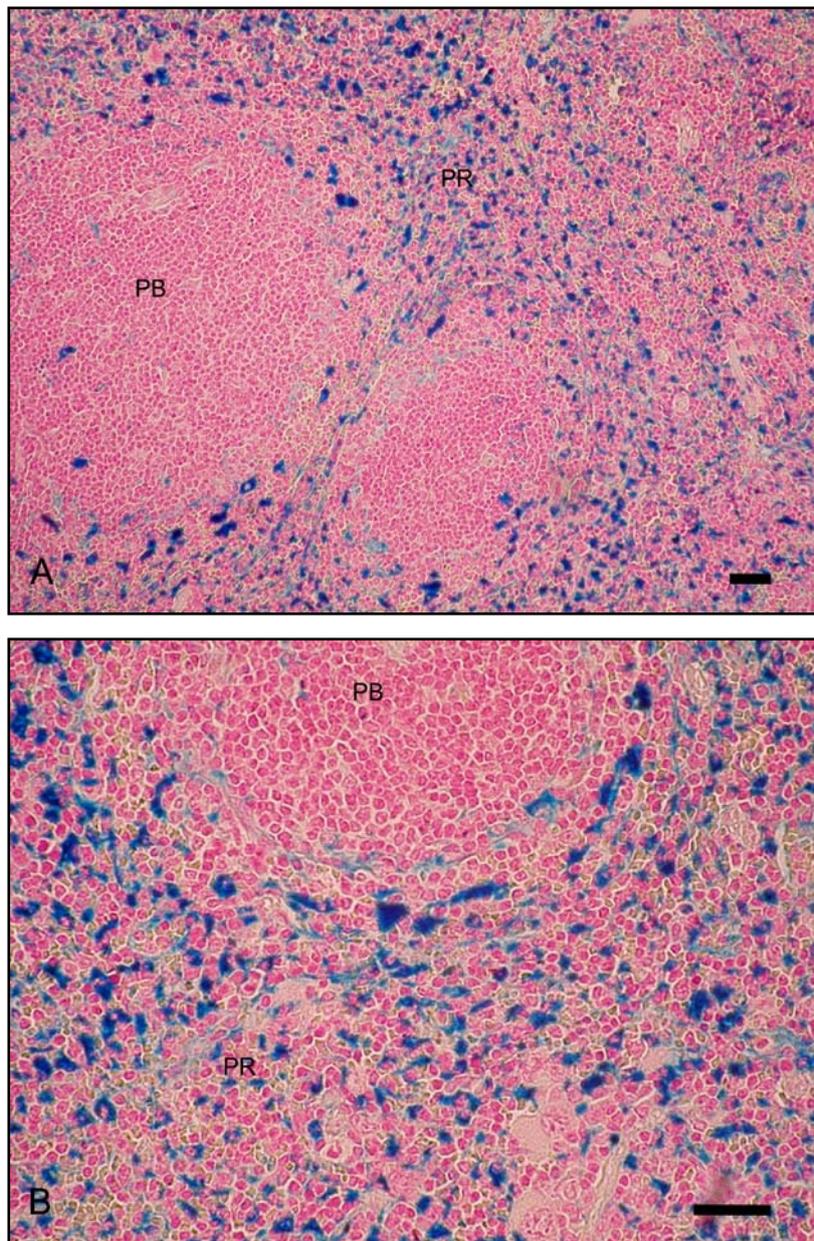


Figura 70. Tinción de Perl's en Tejido Esplénico en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestran abundantes depósitos de Fe^{3+} en la pulpa roja (día 20). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 200 (A), X 400 (B). Escala: 30 μm

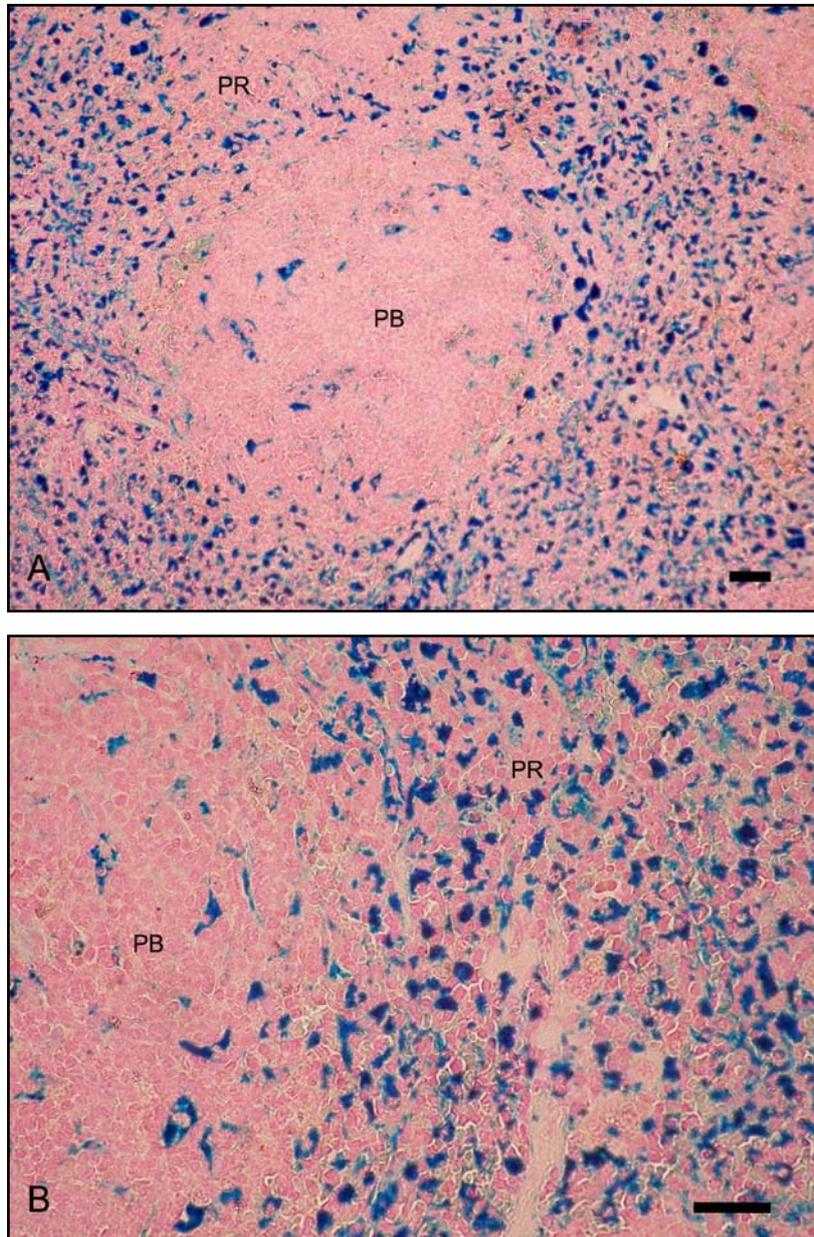


Figura 71. Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión de DMT1, localizada en la pulpa roja (día 20). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 200 (A), X 400 (B). Escala: 30 μ m

2.2. PROHEPCIDINA

TEJIDO HEPÁTICO

Mediante la técnica inmunohistoquímica el tejido hepático con Sobrecarga de Fe mostró marcada expresión de Prohepcidina, a diferencia de la moderada expresión observada en condiciones basales. Sin embargo, en ambos casos la tinción se localizó en el interior de los hepatocitos como así también en células de Kupffer (Figura 72).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido hepático (Figura 73).

Para realizar la identificación selectiva de Prohepcidina y Fe^{3+} se realizó la técnica de inmunoperoxidasa combinada con la Tinción de Perl's. De esta forma detectamos abundantes pigmentos de Fe y confirmamos la marcada expresión hepática de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe con respecto al tejido de ratones sin Sobrecarga de Fe (Figura 74).

En el hígado con Sobrecarga de Fe la expresión de Prohepcidina se observó en el interior de los hepatocitos cercanos a grandes vasos sanguíneos, mientras que su expresión fue leve en hepatocitos cercanos a tríadas portales (Figura 74). Es importante mencionar también, que nuestros resultados podrían indicar ausencia de colocalización de Prohepcidina con hemosiderina, ya que la expresión de la proteína no colocalizó con los depósitos de Fe^{3+} en células de Kupffer.

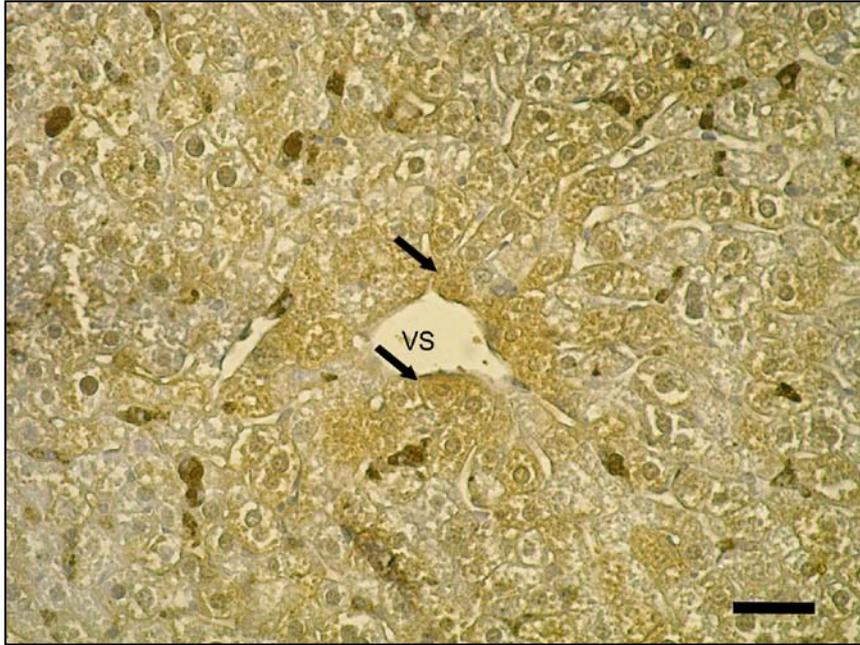


Figura 72. Expresión de Prohepcidina Hepática en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de Prohepcidina intracelular, asociada a vasos sanguíneos (flecha) (día 20). X 400. VS: Vaso sanguíneo. Escala: 30 μ m

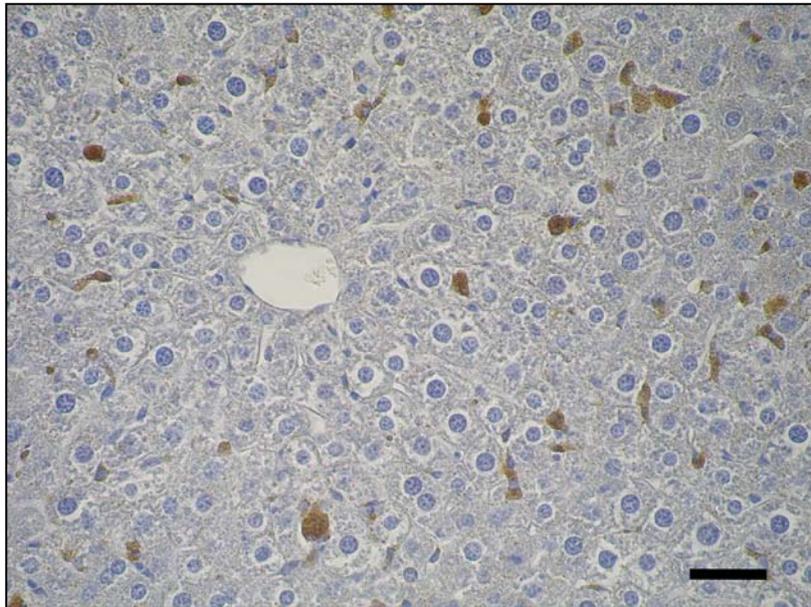


Figura 73. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Hepático en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica (día 20). X 400. Escala: 30 μ m

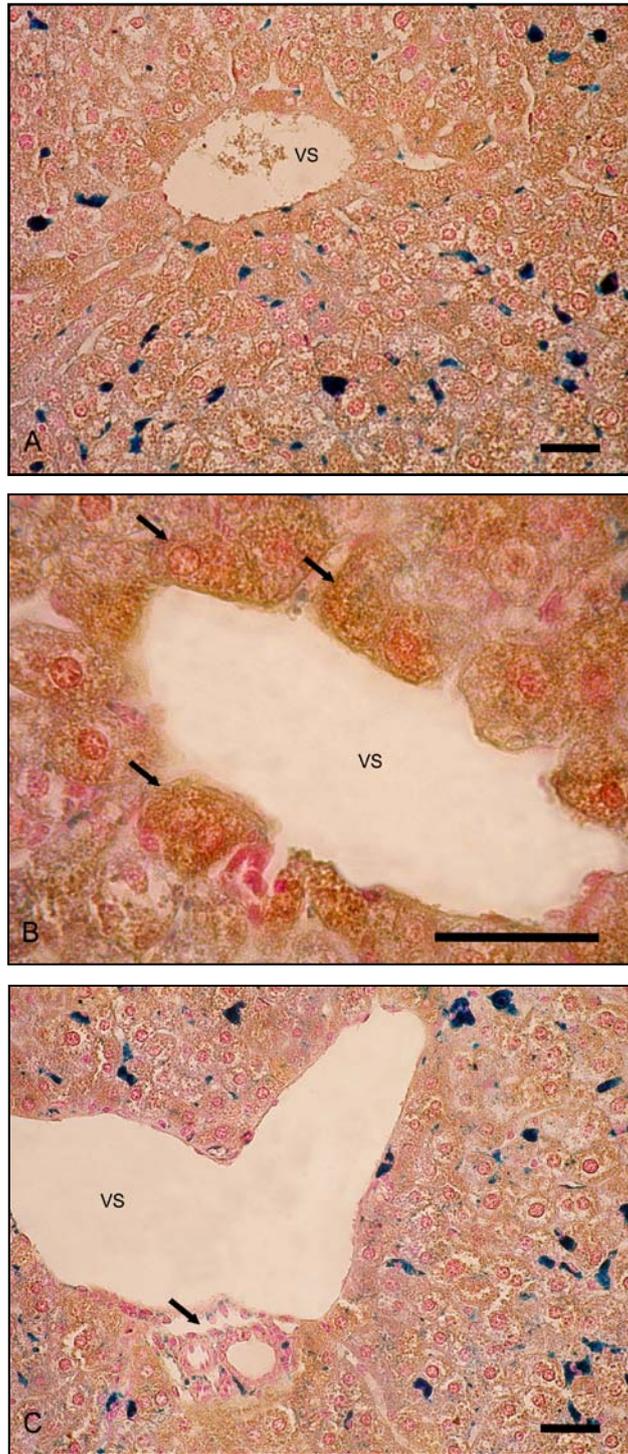


Figura 74. Expresión de Prohepcidina Hepática en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de Prohepcidina en hepatocitos asociados a vasos sanguíneos (flecha) (A, B). Moderada expresión de Prohepcidina en tríada portal (flecha) (C) (día 20). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A, C), X 1000 (B) Escala: 30 μ m.

3. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA

3.1. TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

3.1.a. TEJIDO DUODENAL

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia, será de utilidad describir brevemente los principales resultados obtenidos en el duodeno en ambas condiciones de disfunción cuando se las estudió en forma independiente.

Como mencionamos anteriormente, en Anemia se vio un marcado descenso en Hb y HCT entre los días 23 y 24, indicativo de una fuerte hemólisis. Estos parámetros mostraron una tendencia a la normalización desde el día 25, indicando la recuperación de la Anemia. Como se describió en el Capítulo II, estos resultados se asociaron con expresión intracelular de DMT1 durante la crisis hemolítica y una traslocación de la proteína a la membrana apical durante la etapa de recuperación de la anemia.

En el modelo experimental de Sobrecarga de Fe vimos localización intracelular de DMT1 el día 20 del protocolo, sin cambios en la expresión de la proteína respecto al tejido sin tratar (Capítulo II).

En el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia, los días de severa hemólisis se caracterizaron también por valores disminuidos de Hb y HCT (días 23 al 25). Un dato relevante fue que la recuperación del estado anémico ocurrió tardíamente en los animales con Sobrecarga de Fe y Anemia (días 28 y 30) respecto a los animales con Anemia sin Sobrecarga de Fe (día 26) (Capítulo I).

Cuando se analizó la expresión duodenal de DMT1 los días de intensa hemólisis (días 23 y 25) en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, se vio expresión intracelular de la proteína en enterocitos, evidenciando un patrón de expresión similar al hallado en Anemia sin Sobrecarga sin detectarse DMT1 en células caliciformes ni criptas duodenales (Figura 75). Este patrón de expresión es similar al hallado en tejido con Anemia sin Sobrecarga durante la anemia aguda.

Posteriormente, se propuso determinar la expresión de DMT1 en enterocitos en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia durante la etapa de recuperación de la anemia (días 28 y 30), para comparar y contrastar los resultados con la expresión de la proteína hallada en tejido con Anemia sin Sobrecarga de Fe.

Durante la recuperación del estado de anemia, los enterocitos de ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia mantuvieron expresión intracelular de DMT1 (día 28), sin mostrar cambios respecto a días anteriores del protocolo experimental (Figura 76). Estos resultados difieren de los observados en tejido de ratones con Anemia sin Sobrecarga de Fe, donde se determinó redistribución de DMT1 a la cara apical en la etapa de recuperación (día 26) (Figura 77).

La valoración de los depósitos de Fe^{3+} en duodeno de animales con Sobrecarga de Fe y Anemia mostró pigmentos de hemosiderina en la Anemia aguda y en la etapa de recuperación de la anemia, localizados en el tejido conectivo duodenal, sin evidenciarse Fe^{3+} en el interior de los enterocitos (Figura 78). Estos resultados fueron similares a los observados en Sobrecarga de Fe (sin Anemia).

Por otro lado, la expresión de DMT1 en enterocitos duodenales de tejido con Sobrecarga de Fe (sin Anemia) no se modificó durante todo el protocolo experimental, manteniéndose localización intracelular de la proteína, y ausencia de la misma en criptas duodenales y células caliciformes (Figura 79).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido duodenal (Figura 80).

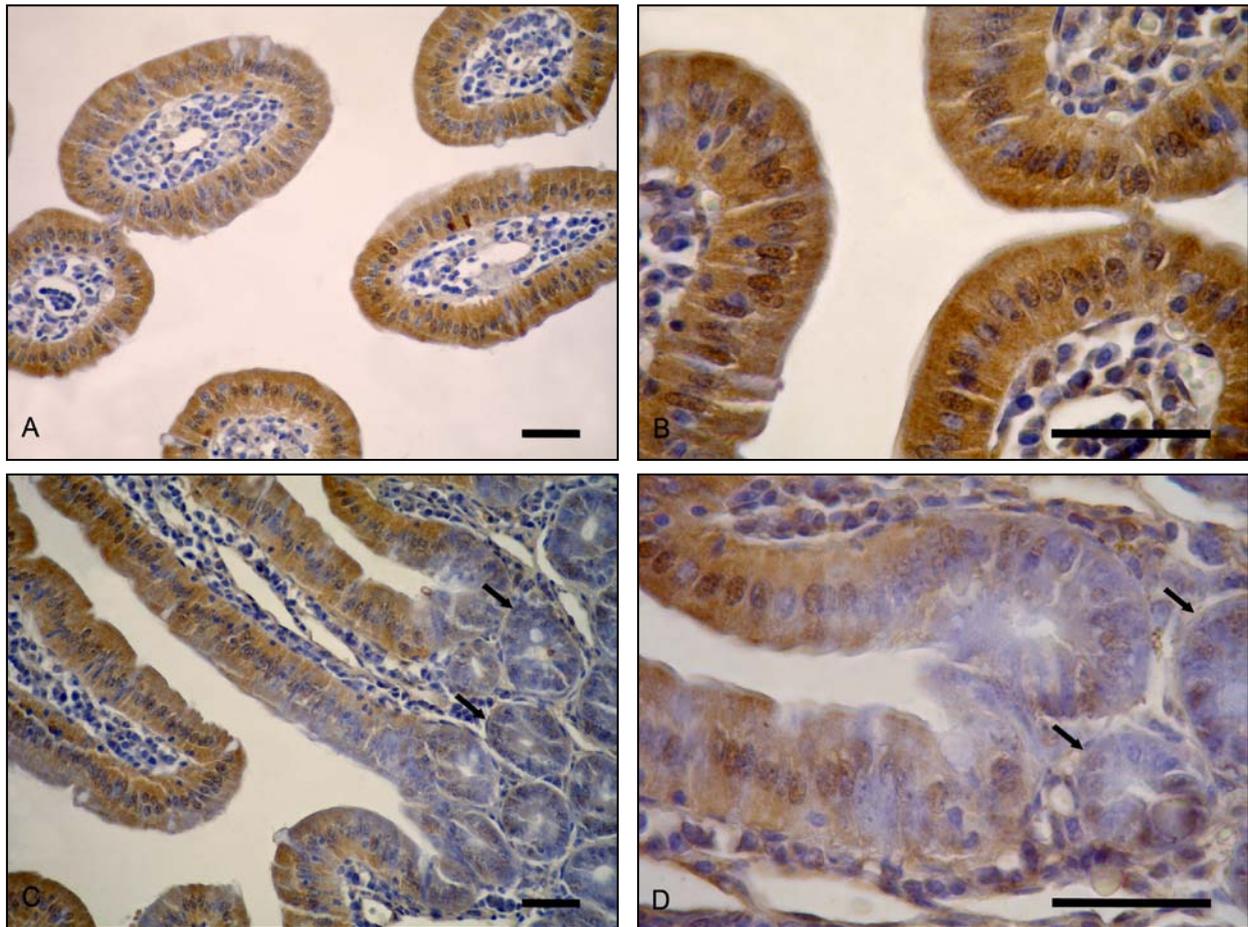


Figura 75. Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia. Ratones hembras se trataron según se describe en Materiales y Métodos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en las vellosidades duodenales el día 25 (A, B). Ausencia del transportador en las criptas duodenales (flecha) el día 25 (C, D). X 400 (A, C), X 1000 (B, D). Escala: 30 μ m.

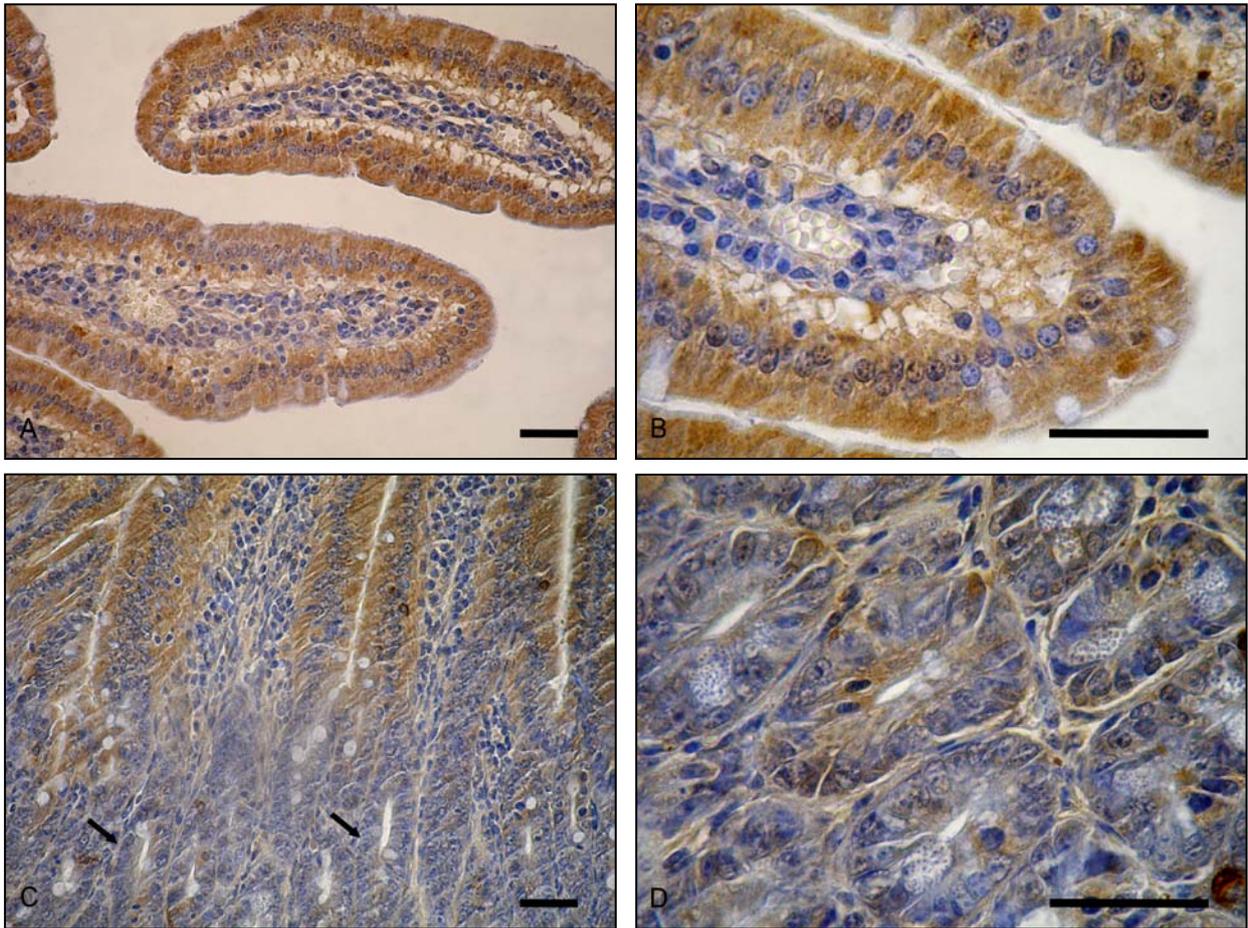


Figura 76. Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en las vellosidades duodenales el día 28 (A, B). Ausencia del transportador en las criptas duodenales (flecha) y células caliciformes (cabeza de flecha) el día 28 (C, D). X 400 (A, C), X 1000 (B, D). Escala: 30 μ m.

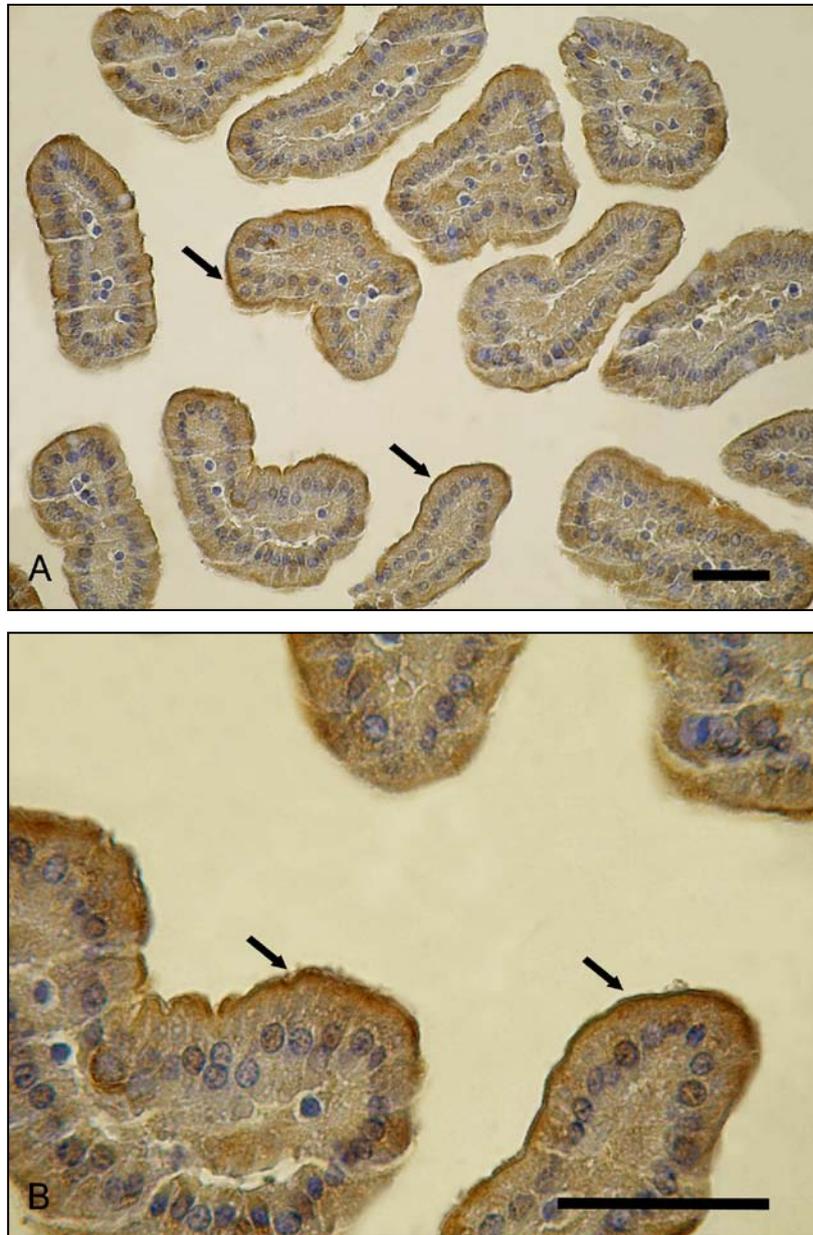


Figura 77. Expresión de DMT1 Duodenal en Anemia. Ratones hembras se trataron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 intracelular y en membrana apical de vellosidades duodenales el día 26 (flecha). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.



Figura 78. Tinción de Perl's del Tejido Duodenal en Sobrecarga de Fe con Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Pigmentos de Fe en el tejido conectivo de las vellosidades (flecha). X 400. Escala: 30 μ m

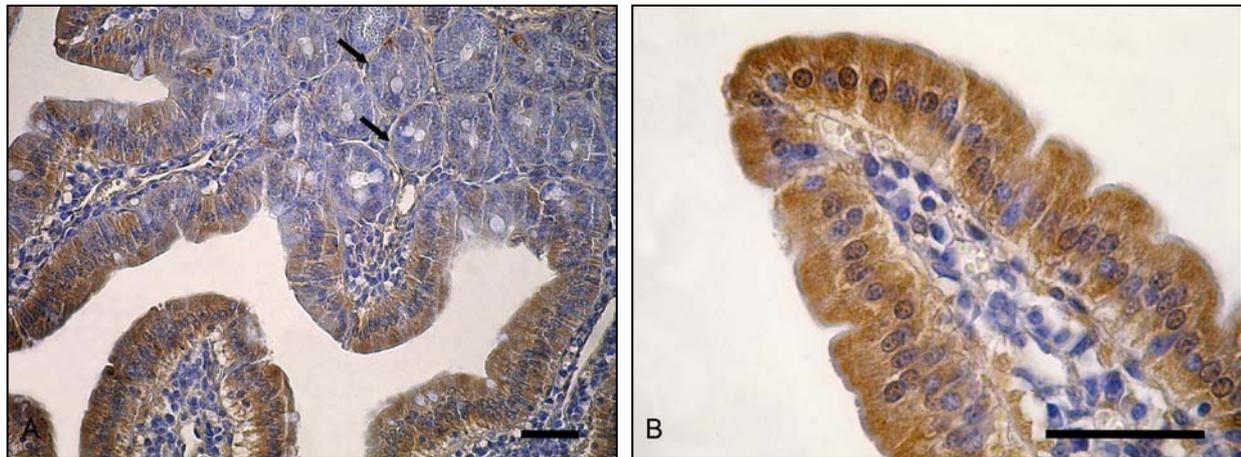


Figura 79. Expresión de DMT1 Duodenal en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en las vellosidades duodenales y ausencia de la proteína en las criptas el día 28 (flecha) (A). Expresión intracelular de DMT1 en enterocitos duodenales el día 28 (B). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

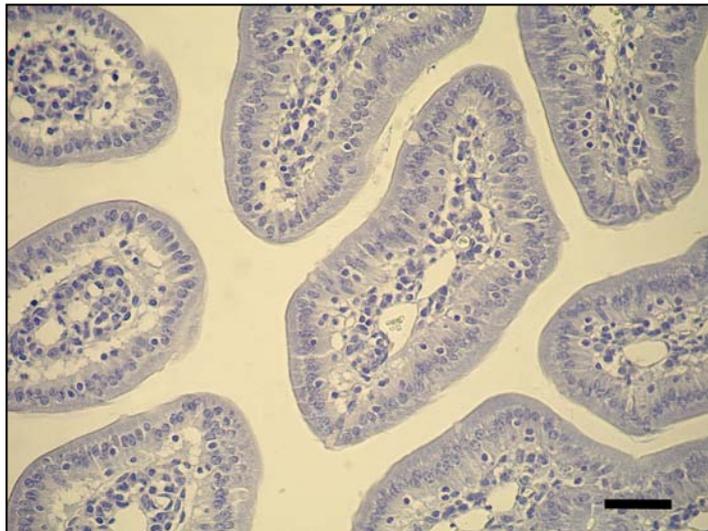


Figura 80. Control Negativo para DMT1 en Tejido Duodenal. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica en las vellosidades duodenales. X 400. Escala: 30 μ m.

3.1.b. TEJIDO HEPÁTICO

Nuevamente mencionaremos brevemente los resultados más relevantes obtenidos en hígado en estado de Sobrecarga de Fe y en Anemia cuando se estudiaron los modelos en forma independiente, para la mejor comprensión de los resultados del modelo Acoplado.

Como se describió anteriormente, la instauración de la anemia evidenciada por bajos niveles de Hb y HCT (días 23-24) (Capítulo I) coincidió temporalmente con una moderada expresión hepática de DMT1, mientras que durante la etapa de recuperación de la anemia (día 26) se evidenció nuevamente expresión hepática intracelular de la proteína, principalmente en cercanías de grandes vasos sanguíneos (Capítulo II).

En Sobrecarga de Fe se vio marcada expresión de DMT1 en tejido hepático, con localización intracelular, y principalmente en hepatocitos cercanos a vasos sanguíneos (Capítulo II).

Cuando evaluamos los cambios en la expresión hepática de DMT1 los días de intensa hemólisis (días 23-25) en el modelo de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia Hemolítica utilizando la técnica inmunohistoquímica vimos marcada expresión de la proteína, con un claro patrón de asociación con hepatocitos cercanos a vasos sanguíneos (Figura 81).

Se identificaron el Fe^{3+} y DMT1 por Azul de Prusia y por la técnica de inmunoperoxidasa combinada, respectivamente, evidenciándose abundantes depósitos de Fe^{3+} y marcada expresión de DMT1 distribuido en el tejido hepático, mostrando una fuerte asociación con hepatocitos cercanos a grandes vasos sanguíneos y ausencia de colocalización de DMT1 con los depósitos de hemosiderina (Figura 82).

Es importante destacar la relevancia de estos resultados, ya que a diferencia de lo hallado en tejido hepático de ratones con Anemia sin Sobrecarga de Fe, el tejido de ratones con Anemia y Sobrecarga de Fe mantuvo una fuerte expresión hepática de DMT1 aún en estado de anemia severa.

Cuando se estudió la expresión hepática de DMT1 en el modelo de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia durante la etapa de recuperación de la anemia (días 28 y 30) pudimos ver marcada expresión de DMT1 en el interior de los hepatocitos, siendo más evidente en los hepatocitos perivasculares (Figuras 83). Además, mediante la técnica de

doble tinción pudimos determinar abundante hemosiderina y ausencia de colocalización de DMT1 con hemosiderina (Figura 84).

El patrón de expresión de DMT1 hepático en Anemia con Sobrecarga de Fe durante la recuperación de la anemia (días 28 y 30), coincide con el observado en Anemia sin Sobrecarga de Fe en la etapa de recuperación (día 26), donde también se vio expresión intracelular de DMT1 en hepatocitos asociados a vasos sanguíneos (Figura 85).

Dado que anteriormente habíamos determinado la expresión de DMT1 en hígado de ratones con Sobrecarga de Fe el día 20 del protocolo experimental, continuamos estos estudios para conocer los cambios en la expresión de la proteína entre los días 20 y 30. Pudimos establecer que entre los días 20 y 30, el hígado con Sobrecarga de Fe mostró abundantes hemosiderina y mantuvo un patrón de expresión de DMT1 similar al observado el día 20, observándose inmunomarcación en el interior de los hepatocitos y no en células de Kupffer, evidenciándose además, mayor expresión de DMT1 en hepatocitos cercanos a los grandes vasos sanguíneos (Figuras 86 y 87).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido hepático (Figura 88).

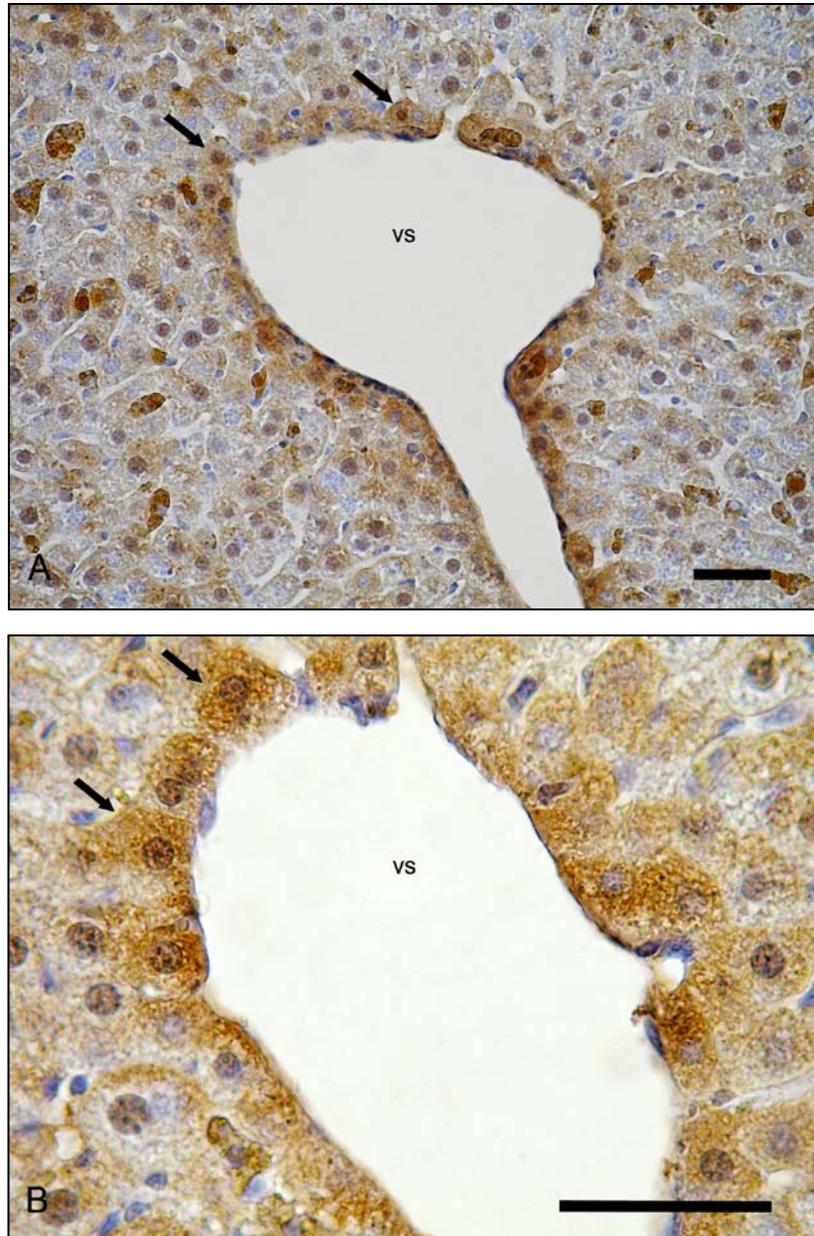


Figura 81. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 durante la anemia aguda, principalmente en cercanías de grandes vasos sanguíneos (flecha) (día 23). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

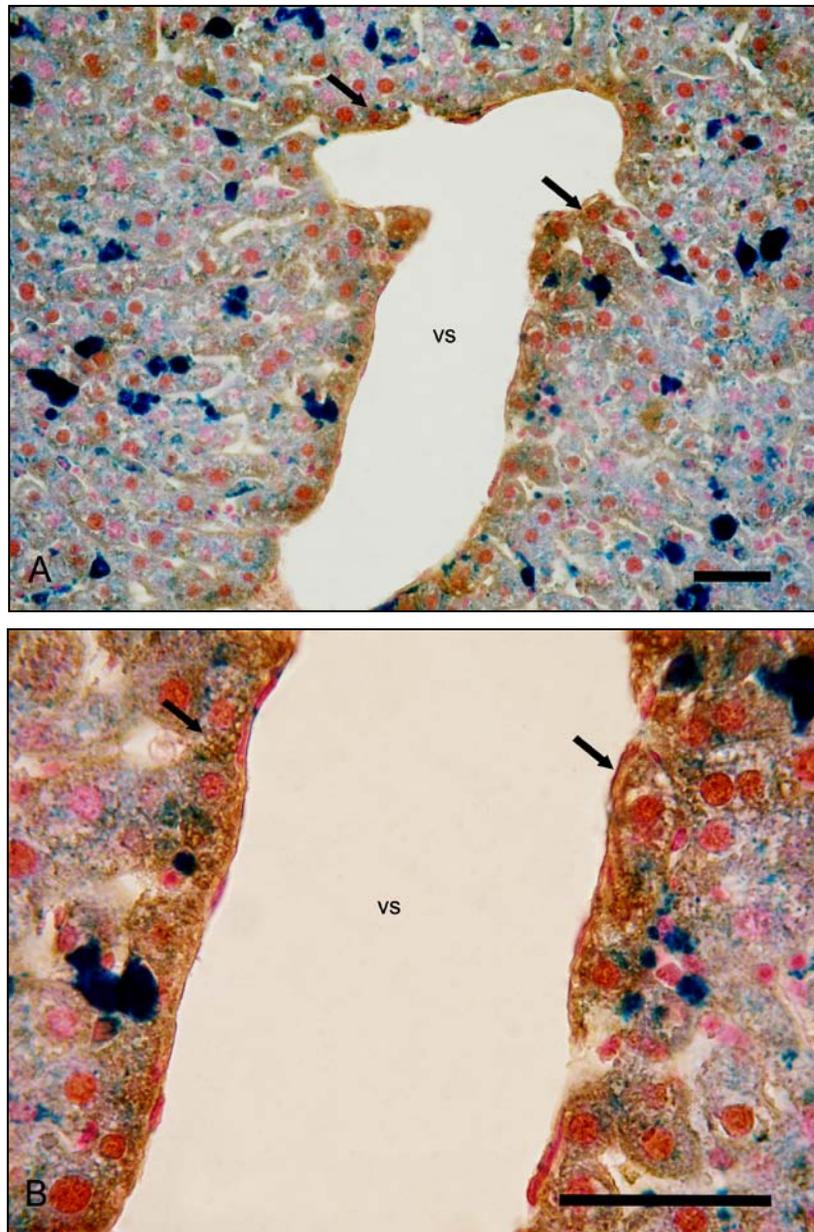


Figura 82. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón, y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 durante la anemia aguda, principalmente en cercanías de grandes vasos sanguíneos (flecha) (día 23). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

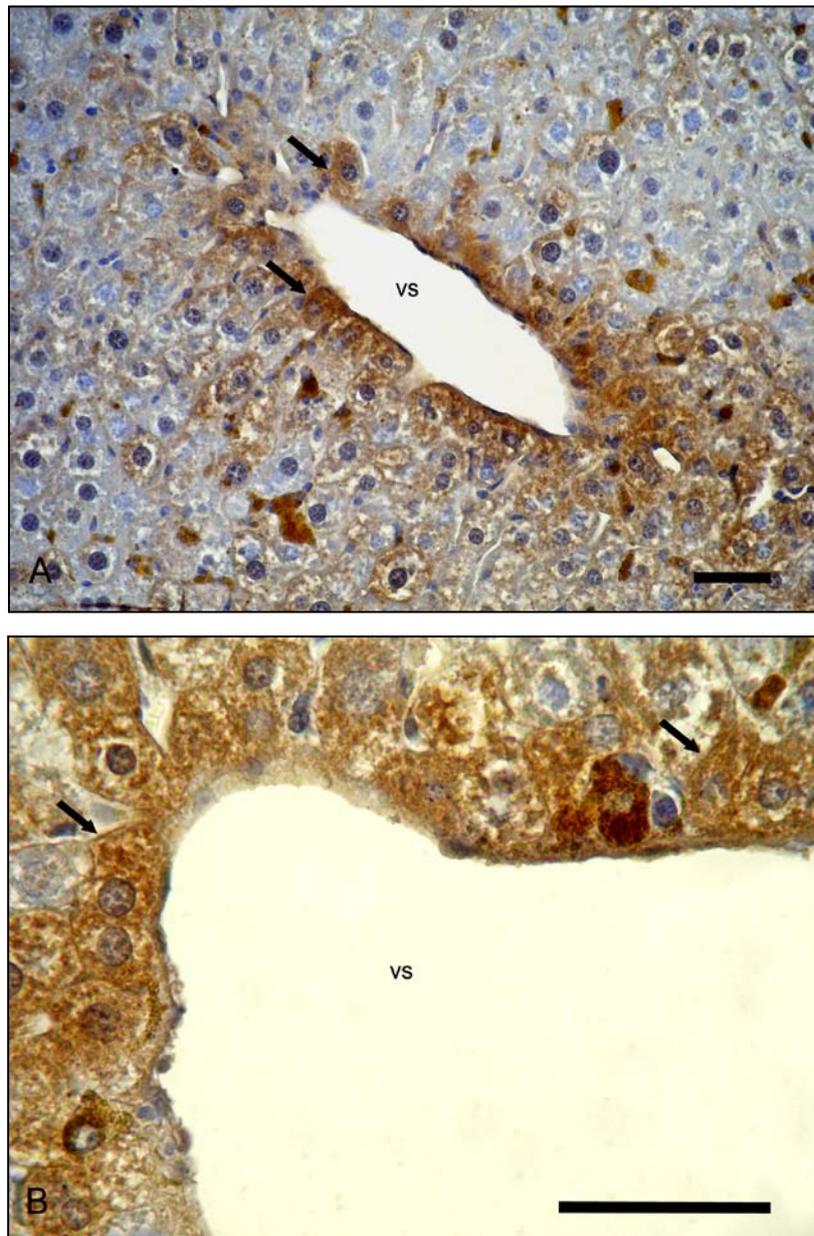


Figura 83. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular de DMT1 durante la recuperación de la anemia, principalmente en hepatocitos cercanos a grandes vasos sanguíneos (flecha) (día 28). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

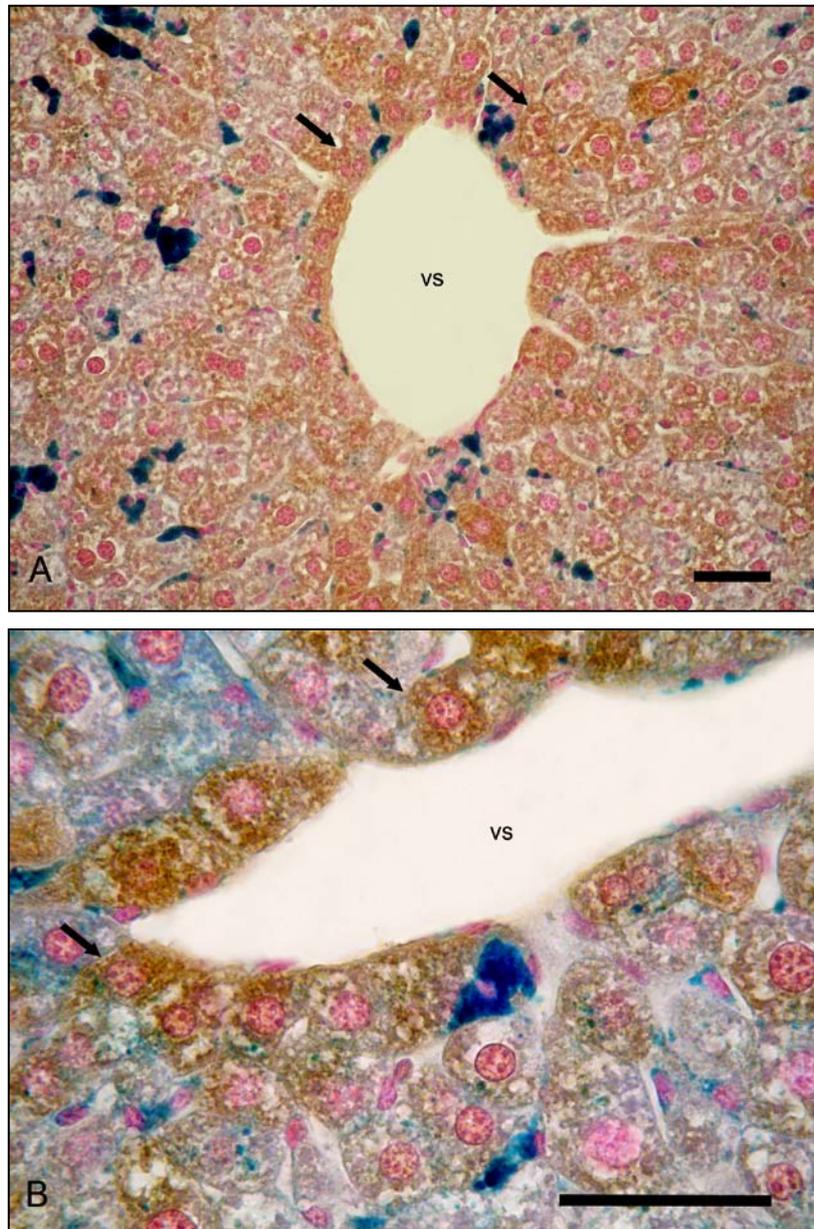


Figura 84. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica, y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 durante la recuperación de la anemia, principalmente en hepatocitos cercanos a vasos sanguíneos (flecha) (día 28). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

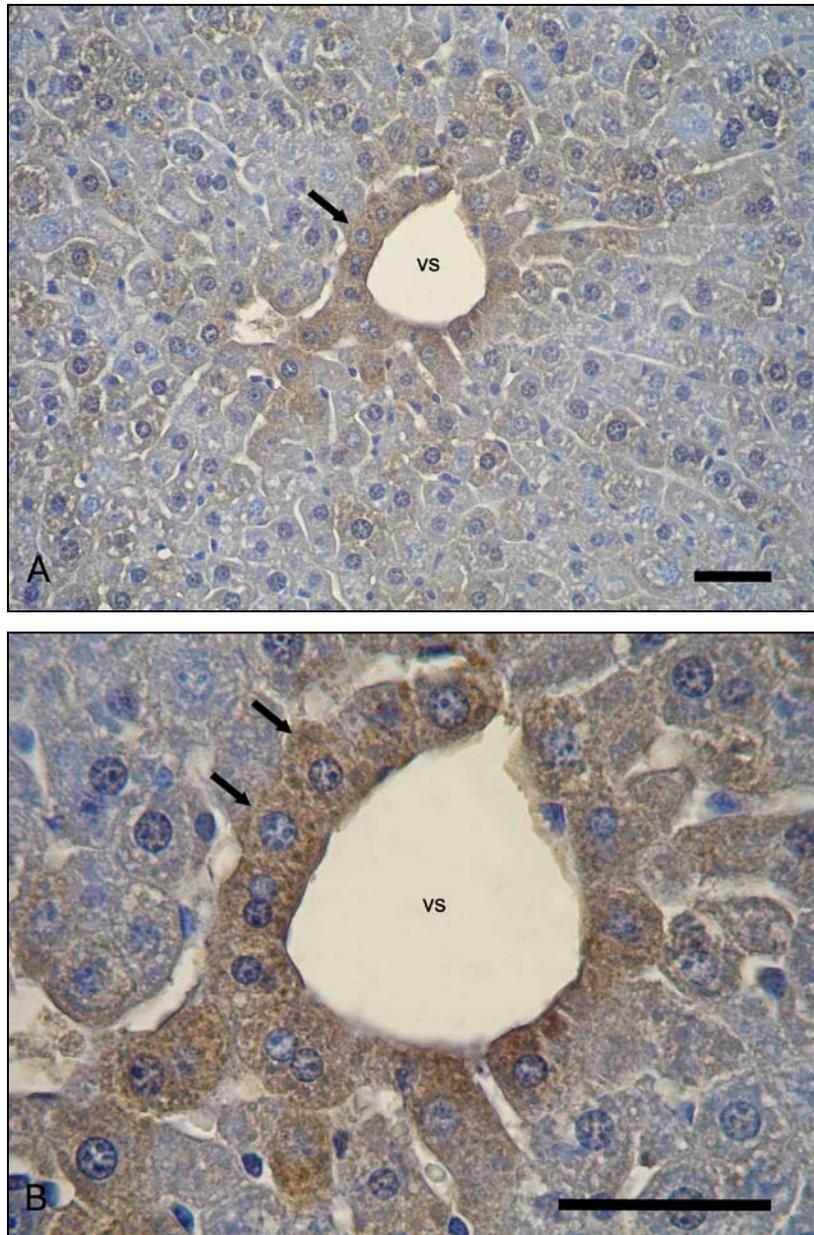


Figura 85. Expresión Hepática de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 durante la recuperación de la anemia, principalmente en hepatocitos cercanos a grandes vasos sanguíneos (flecha) (día 28). VS: Vaso sanguíneo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

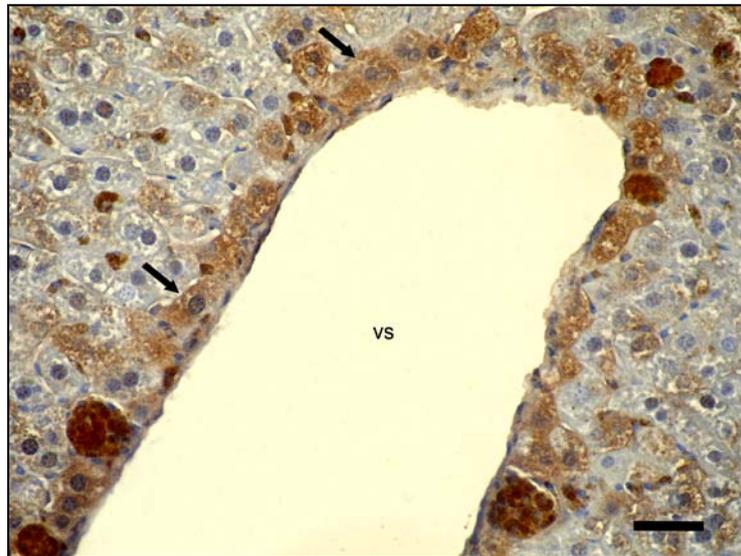


Figura 86. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en hepatocitos asociados a vasos sanguíneos, con localización intracelular (flecha) (día 25). VS: Vaso sanguíneo. X 400. Escala: 30 μ m.

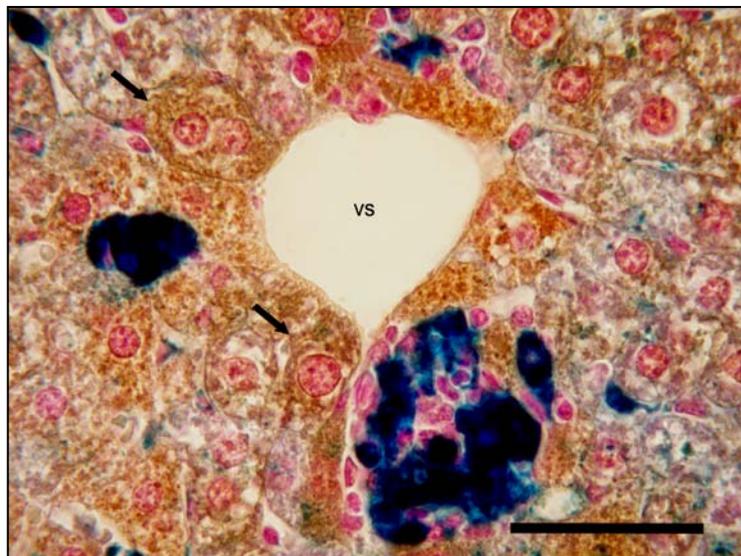


Figura 87. Expresión Hepática de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión de DMT1, principalmente en hepatocitos cercanos a vasos sanguíneos, con localización intracelular (flecha) (día 25). VS: Vaso sanguíneo. X 1000. Escala: 30 μ m.

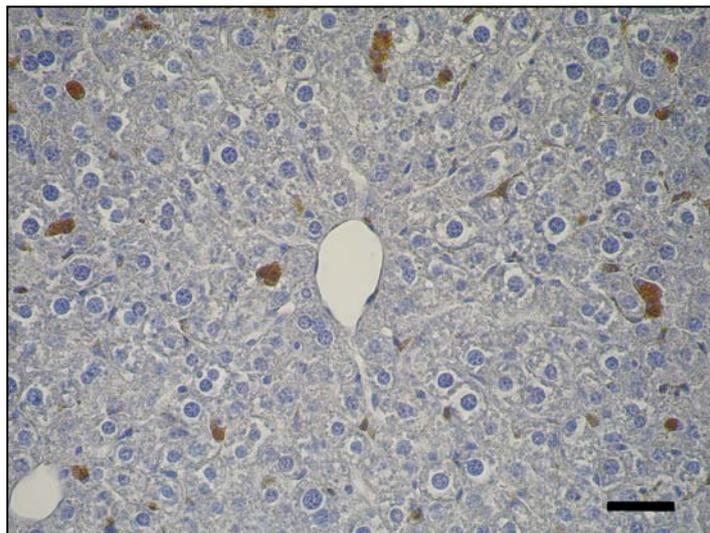


Figura 88. Control Negativo para DMT1 en Tejido Hepático. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica. X 400. Escala: 30 μ m

3.1.c. TEJIDO ESPLÉNICO

Con el objetivo de facilitar la comprensión de los resultados del modelo acoplado, en el análisis del tejido esplénico también realizaremos una breve descripción de los resultados obtenidos en los modelos de Sobrecarga de Fe y de Anemia Hemolítica cuando se los estudió en forma independiente.

Como se describió en el Capítulo I, los animales con Anemia sin Sobrecarga de Fe presentaron una marcada hemólisis entre los días 23 y 24 del protocolo experimental, evidenciada por un descenso en la Hb y HCT. Estos resultados fueron acompañados por moderada expresión esplénica de DMT1, principalmente en la pulpa roja, sin evidenciarse cambios respecto al tejido de ratones No Anémicos (Capítulo II).

Por otro lado, en el estudio del tejido esplénico de ratones con Sobrecarga de Fe vimos expresión de DMT1 localizada selectivamente en la pulpa roja y abundantes pigmentos de hemosiderina. Una vez más, no detectamos diferencias en la intensidad de expresión de DMT1 con respecto al tejido de ratones sin Sobrecarga de Fe (Capítulo II).

Luego desarrollamos el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, en el que se vio una marcada hemólisis entre los días 23 y 25 (Capítulo I).

Estudiamos el tejido esplénico de ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia durante la crisis hemolítica (días 23-25) para evaluar el compromiso de este tejido frente a la anemia. La observación microscópica del bazo mostró una marcada desorganización de las pulpas y abundante congestión eritrocítica. Pudimos evidenciar además expresión de DMT1 en todo el tejido esplénico (Figura 89).

Dado que el bazo, por su función hemocaterética almacena Fe, utilizamos la técnica de doble tinción desarrollada en nuestro laboratorio para marcar en forma selectiva el Fe^{3+} y el transportador DMT1.

De esta forma detectamos abundante hemosiderina en macrófagos esplénicos, y evidenciamos moderada expresión esplénica de DMT1 en bazo de ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia (Figura 90). Nuestros estudios también muestran la ausencia de colocalización de DMT1 con hemosiderina, ya que las células que presentan inmunomarcación específica para DMT1 no coinciden con aquellas que poseen depósitos de Fe (Figura 90).

Es importante señalar que de los resultados descritos anteriormente se desprende la ausencia de cambios en la expresión esplénica de DMT1 en la etapa de severa hemólisis, entre tejido de ratones con Anemia sin Sobrecarga de Fe y tejido de ratones con Anemia y Sobrecarga de Fe.

Por otro lado, ya que anteriormente habíamos determinado la expresión esplénica de DMT1 en los animales con Sobrecarga de Fe sin Anemia el día 20, continuamos con la identificación de la proteína entre los días 20 y 30 del protocolo experimental, utilizando la técnica de doble tinción debido a los abundantes pigmentos de Fe existentes en la Sobrecarga. De esta forma pudimos observar una clara reorganización de las pulpas esplénicas, abundantes pigmentos de hemosiderina y moderada expresión de DMT1, localizada principalmente en la pulpa roja (Figura 91). Estos resultados son similares a los hallados los días previos de Sobrecarga de Fe.

Si bien durante la crisis hemolítica no habíamos observado cambios en la expresión esplénica de DMT1 en Anemia (sin Sobrecarga de Fe) con respecto a la condición No Anémico, identificamos DMT1 los últimos días del protocolo experimental en bazo de ratones con Anemia sin Sobrecarga de Fe. Pudimos observar moderada expresión de DMT1 en todo el tejido, evidenciándose además una tendencia a la reorganización de las pulpas esplénicas (Figura 92).

En la Anemia sin Sobrecarga de Fe habíamos observado escasos pigmentos esplénicos de Fe respecto al tejido No Anémico. Con la técnica de doble tinción identificamos moderada expresión de DMT1 en bazo ratones Anémicos sin sobrecarga de Fe los últimos días del protocolo experimental, sin evidenciarse cambios respecto a días anteriores (Figura 93).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido esplénico (Figura 94).

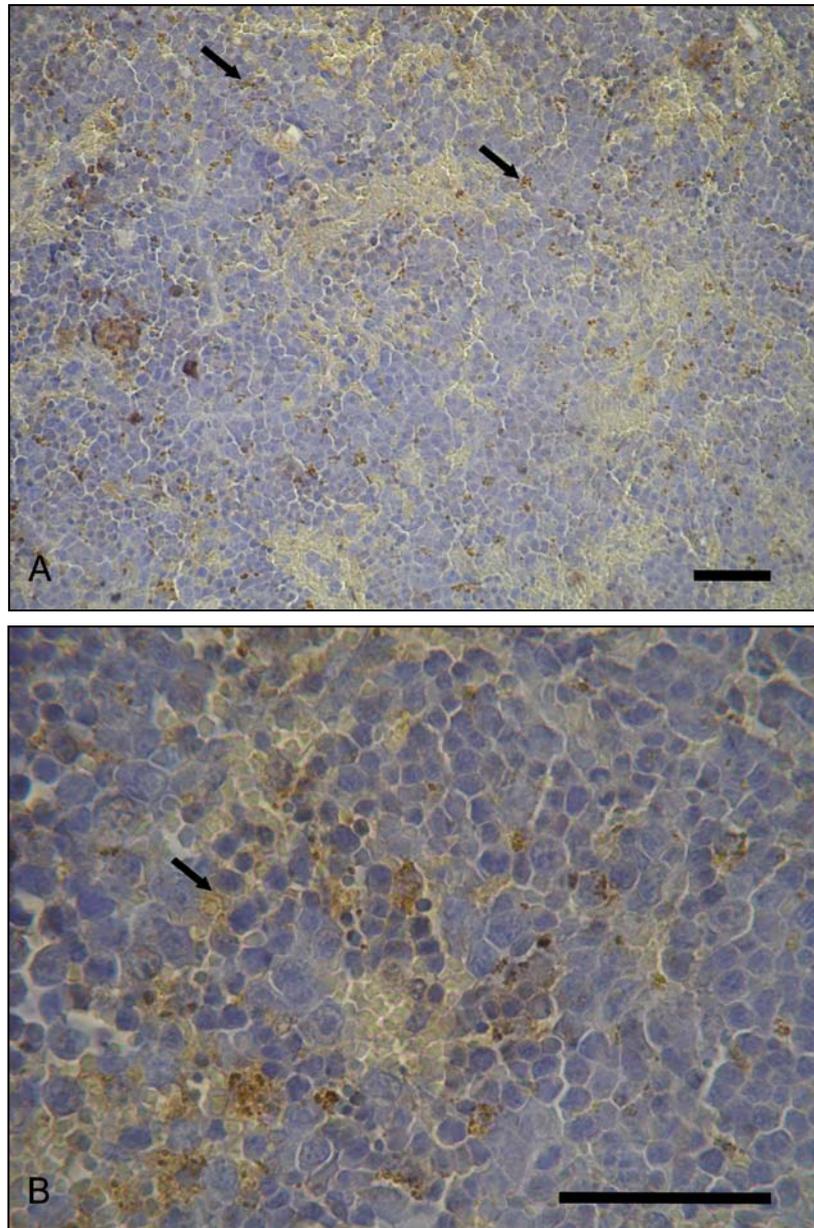


Figura 89. Expresión Esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 (flecha) y desorganización de las pulpas esplénicas (día 25). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

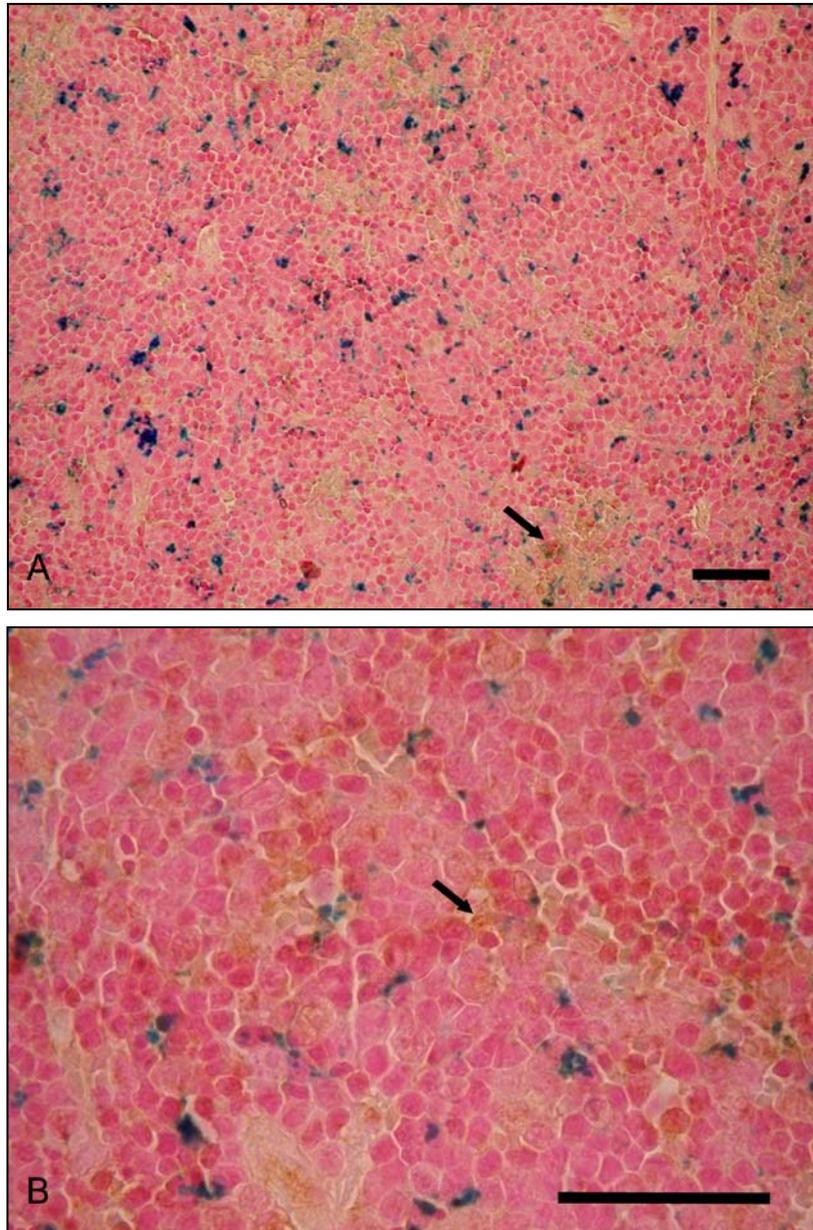


Figura 90. Expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra moderada expresión de DMT1 (flecha) y abundante pigmentos de Fe (día 25). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

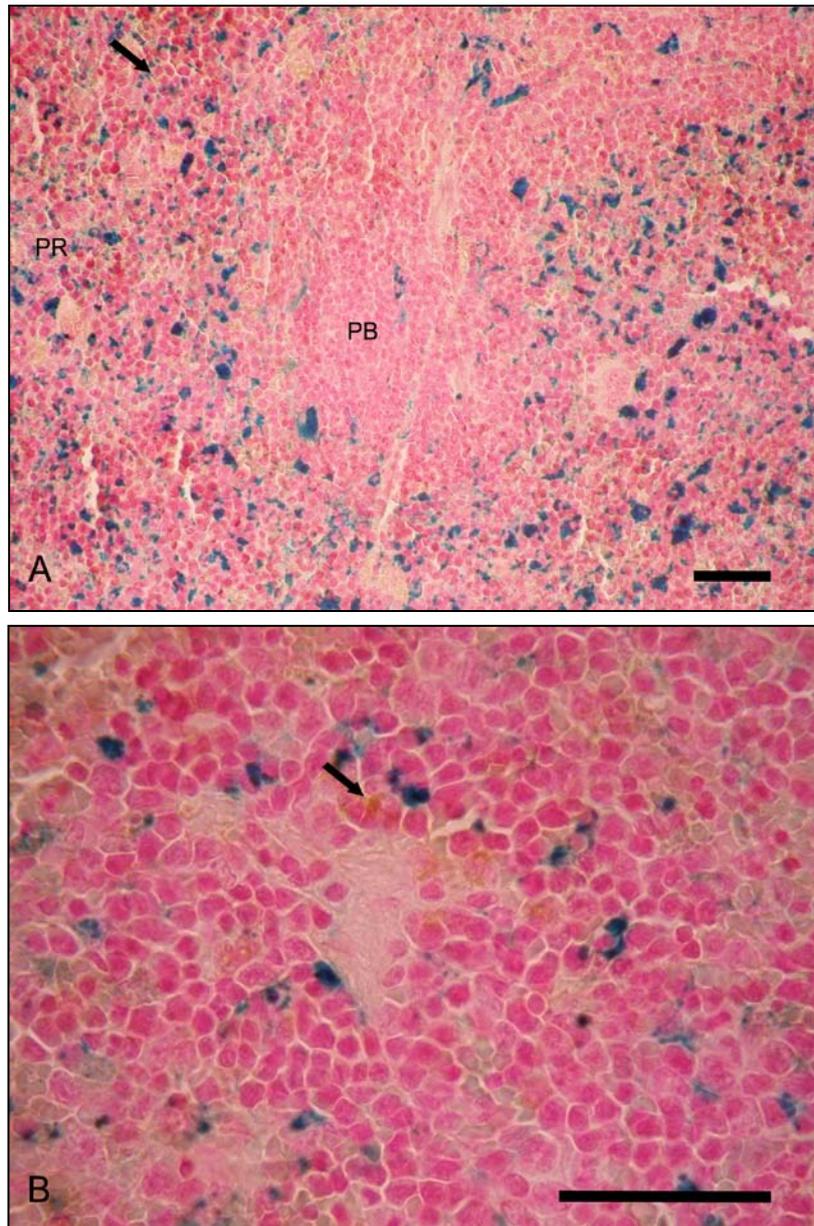


Figura 91. Expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión de DMT1 en la pulpa roja (flecha) (día 28). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa blanca. X 400. Escala: 30 μ m.

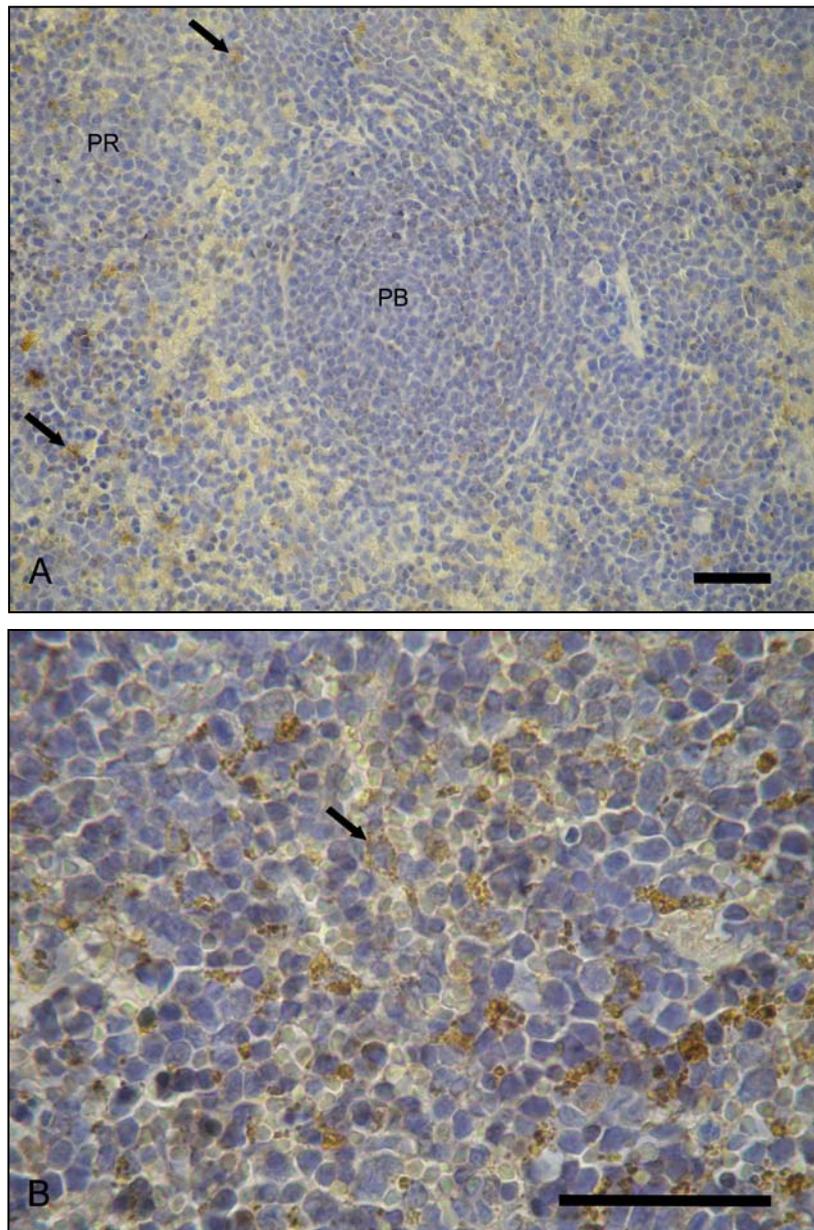


Figura 92. Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra reorganización de pulpas esplénicas y moderada expresión de DMT1 (flecha) (día 28). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

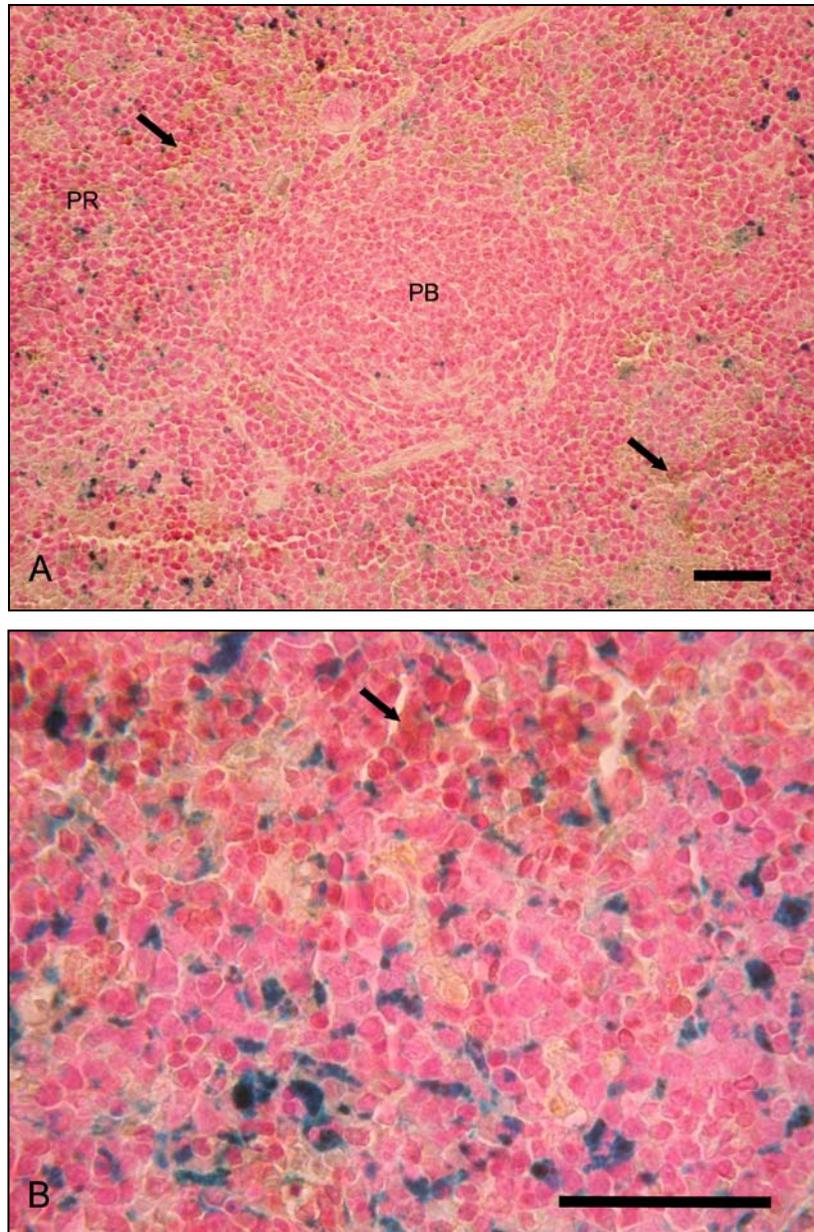


Figura 93. Expresión Esplénica de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra reorganización de pulpas esplénicas y moderada expresión de DMT1, principalmente en la pulpa roja (flecha) (día 28). PR: Pulpa roja; PB: Pulpa. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 µm.

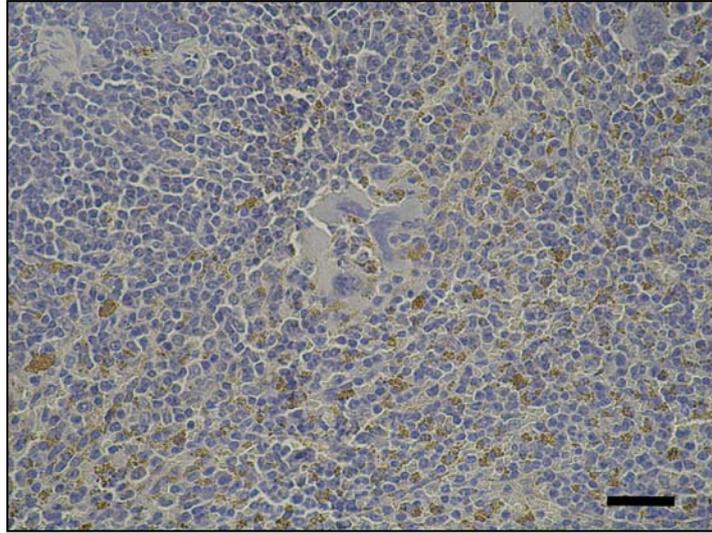


Figura 94. Control Negativo para DMT1 en Tejido Esplénico. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). No se observa marcación inespecífica de DMT1 y se observa hemosiderina. X 400. Escala: 30 μ m

3.2. PROHEPCIDINA

TEJIDO HEPÁTICO

Como se describió en el Capítulo I, en el modelo de Anemia Hemolítica los parámetros hematológicos mostraron una clara hemólisis entre los días 23 y 25 del protocolo experimental, resultados asociados a una moderada expresión hepática de Prohepcidina.

Por el contrario, durante el desarrollo de la Sobrecarga de Fe, Prohepcidina mostró marcada expresión en el hígado, localizándose selectivamente en el interior de los hepatocitos, principalmente en aquellos cercanos a grandes vasos sanguíneos.

Cuando se desarrolló el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia Hemolítica se determinó la expresión hepática de Prohepcidina los días de intensa hemólisis (días 23 al 25). Debido a los abundantes depósitos de Fe^{3+} en forma de hemosiderina presentes en hígado de animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, utilizamos la técnica de inmunoperoxidasa combinada con la Tinción de Perl's para identificar en forma diferencial los depósitos de Fe^{3+} y a la proteína Prohepcidina.

Se vio intensa expresión de Prohepcidina, localizada en el interior de los hepatocitos. Nuestros resultados sugieren además, ausencia de colocalización de la proteína con los depósitos de hemosiderina, debido a que la expresión de Prohepcidina no coincide con las concreciones de Fe presentes en células con morfología de células de Kupffer. Es importante destacar que aunque Prohepcidina se expresó en la mayoría de los hepatocitos, la intensidad de expresión fue mayor en los hepatocitos que rodean a grandes vasos sanguíneos, similar a lo observado en Sobrecarga de Fe sin Anemia (Figura 95).

Estos resultados revisten gran importancia para nuestros estudios sobre la eritropoyesis y el metabolismo del Fe ya que muestran marcada expresión hepática de Prohepcidina frente a excesos del Fe, aun cuando la demanda funcional de Fe es intensa, como ocurre en la Anemia Hemolítica.

Es ampliamente conocido que el exceso de Fe induce incrementos en la síntesis de hepcidina, y que la anemia y la deficiencia de Fe se asocian con baja expresión de Hepcidina, un regulador negativo de la absorción de Fe. Sin embargo, hasta el presente

no se conoce con detalle la regulación de la expresión hepática de hepcidina cuando coexiste alta demanda de Fe y excesos del metal.

En este sentido, en nuestro modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia hemolítica sería esperable hallar baja expresión hepática de Hepcidina debido a la demanda de Fe para la producción eritroide y a los elevados niveles de Epo existente en la Anemia Hemolítica.

Por este motivo, el hallazgo de marcada expresión hepática de Prohepcidina en el modelo acoplado es de gran relevancia para profundizar el estudio de las relaciones regulatorias entre el metabolismo del Fe y la eritropoyesis.

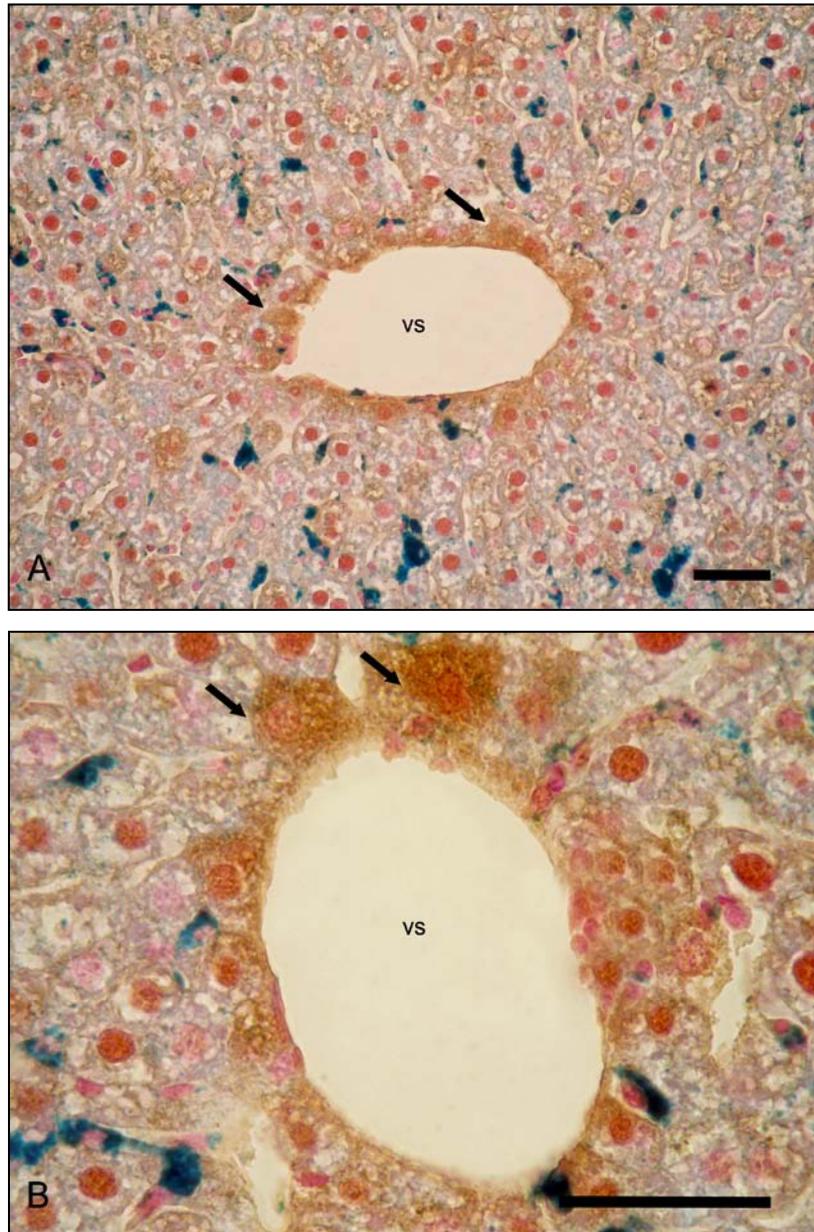


Figura 95. Expresión Hepática de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia por Técnica de Doble Tinción. Ratones hembras se trataron según con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina y el kit EnVision+System-HRP (DAB), y se contrastó con Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra intensa expresión intracelular de Prohepcidina en hepatocitos durante la anemia aguda, y asociación de la marcación con vasos sanguíneos (flecha) (día 25). X 400 (A), X 1000 (B) Escala: 30 μ m



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Estudio del Metabolismo de Hierro en Disfunciones
Asociadas a la Eritropoyesis**

PARTE II

Tania V. Veuthey

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2010

CONTENIDO

PARTE I

Índice de Tablas	1
Índice de Figuras y Diagramas	2
Abreviaturas	9

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN 11

SECCIÓN II. MATERIALES Y MÉTODOS 39

1. Animales de Experimentación	40
1.1. Especies	40
1.2. Dietas	40
1.3. Condiciones Ambientales	40
1.4. Reglamentación para el trabajo con animales de laboratorio	41
1.5. Criterios de Inclusión de ratones en la Condición Basal	41
2. Muestras Biológicas	42
2.1. Sangre Periférica	42
2.2. Tejidos	44
3. Administración de Fármacos	47
4. Parámetros Bioquímicos. Hematológicos	48
4.1. Hemoglobina	48
4.2. Eritropoyetina Plasmática y Sérica	50
4.3. Hematocrito	53
4.4. Índices Hematimétricos	54
5. Estudios Morfológicos	54
5.1. Sangre Periférica	54
5.1.1. Eritrocitos	54
5.1.2. Serie Leucocitaria	55
5.1.3. Serie Eritrocitaria	56

5.1.4. Reticulocitos	57
5.1.5. Células con Cuerpos de Heinz	58
5.2. Tejidos	59
5.2.1. Epitelio de Túbulo Proximal	59
5.2.2. Islotes Eritroblásticos	60
6. Estado del Hierro	61
6.1. Hierro Plasmático	61
6.2. Hierro Tisular	61
6.2.1. Evaluación Semicuantitativa	62
6.2.2. Evaluación Cuantitativa	63
7. Procesamiento de muestras para Microscopía Óptica	66
7.1. Método de Fijación	66
7.2. Método de Inclusión	67
8. Procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica	68
9. Tinciones Histológicas	69
9.1. Hematoxilina & Eosina	69
9.2. Tinción de Perl's	71
10. Estudios Inmunohistoquímicos	72
10.1. Técnica Enzimática. Inmunoperoxidasa	72
10.2. Protocolos	74
10.2.1. Método con polímero conjugado	74
10.2.2. Método indirecto en dos pasos	77
10.2.3. Anticuerpos primarios	79
10.2.4. Anticuerpos secundarios	79
11. Estudios Estadísticos	80
11.1. Diseño experimental	80
11.2. Análisis Estadístico	82
11.2.1. Tamaño de muestra	82
11.2.2. Normalidad	83
11.2.3. Homoscedasticidad	85
11.2.4. Análisis de Varianza. ANOVA	88
11.2.5. Comparaciones múltiples	92

SECCIÓN III. RESULTADOS	94
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS ANIMALES	95
1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA	96
1.1 Desarrollo de Anemia Hemolítica en ratón	96
1.2 Evaluación de la Actividad Eritropoyética	102
1.2.1. Evaluación de la Eritropoyesis en la Anemia Hemolítica	103
1.2.2. Evaluación de la Eritropoyesis Extramedular	107
1.2.2.a. Estudios Histológicos	107
1.2.2.b. Estudios Ultraestructurales	111
2. MODELO DE ANEMIA HEMOLÉTICA CON INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ERITROPOYESIS	116
2.1 Desarrollo del Modelo	116
2.2. Evaluación de la Eritropoyesis	117
2.3. Evaluación de la Eritropoyesis Extramedular	120
3. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO	129
3.1. Desarrollo del Modelo	129
3.2. Evaluación de la Eritropoyesis y el estado del Hierro	130
3.2.1. Estudios Hematológicos	130
3.2.2. Evaluación del estado del Hierro	133
3.2.2.a. Hierro Plasmático	133
3.2.2.b. Hierro Tisular	134
4. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	140
4.1 Desarrollo del Modelo	140
4.2. Evaluación de la Eritropoyesis	141

4.3. Evaluación del Estimulo Eritropoyético	147
4.4. Evaluación del estado del Hierro	149
4.4.1. Hierro Plasmático	149
4.4.2. Hierro Hepático	151
CAPÍTULO II. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	152
1. MODELO DE ANEMIA HEMOLÍTICA	153
1.1. Transportador de Metales Divalentes 1	154
1.1.a. Tejido Duodenal	154
1.1.b. Tejido Hepático	161
1.1.c. Tejido Esplénico	167
1.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	175
2. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO	179
2.1. Transportador de Metales Divalentes 1	179
2.1.a. Tejido Duodenal	179
2.1.b. Tejido Hepático	183
2.1.c. Tejido Esplénico	187
2.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	192
3. MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	195
3.1. Transportador de Metales Divalentes 1	195
3.1.a. Tejido Duodenal	195
3.1.b. Tejido Hepático	202
3.1.c. Tejido Esplénico	211
3.2. Prohepcidina. Tejido Hepático	219

PARTE II

CAPÍTULO III. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN	222
ANEMIA HEMOLÍTICA	224
Transportador de Metales Divalentes 1	225
Prohepcidina	234
Hierro Tisular	242
SOBRECARGA DE HIERRO	246
Transportador de Metales Divalentes 1	246
Prohepcidina	251
Hierro Tisular	256
MODELO DE ACOPLA: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	257
Transportador de Metales Divalentes 1	257
Prohepcidina	267
Hierro Tisular	272
RATAS BELGRADE	274
Transportador de Metales Divalentes 1	274
Prohepcidina	280
Eritropoyetina Tisular	287
Eritropoyetina Sérica	290
Hierro Tisular	291

SECCIÓN IV. DISCUSIÓN	294
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS ANIMALES	295
1. Eritropoyesis en el Modelo Murino de Anemia Hemolítica	296
2. Sobrecarga de Hierro	301
3. Modelo de Acople con Inducción de Sobrecarga de Hierro Seguida de Anemia Hemolítica.	303
CAPÍTULO II. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	307
Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	308
Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	310
Tejido Duodenal	311
Tejido Hepático	313
Tejido Esplénico	316
Conclusión	318
Prohepcidina en Sobrecarga de Fe	321
Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Sobrecarga de Fe	323
Tejido Duodenal	324
Tejido Hepático	325
Tejido Esplénico	326
Conclusión	327
Modelo de Acople: Inducción de Sobrecarga de Fe Seguida de Anemia Hemolítica	330
Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe	330

Transportador de Metales Divalentes 1 –DMT1- en Anemia con Sobrecarga de Fe	332
Tejido Duodenal	332
Tejido Hepático	333
Tejido Esplénico	334
Conclusión	335
CAPÍTULO III. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN	338
Anemia Hemolítica	339
Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	339
Transportador de Metales Divalentes 1 en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica	342
Conclusión	345
Sobrecarga de Fe	348
Prohepcidina en Sobrecarga de Hierro	348
Transportador de Metales Divalentes 1 en Sobrecarga de Fe	350
Conclusión	352
Modelo de Acople: Inducción de Sobrecarga de Hierro Seguida de Anemia Hemolítica	354
Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe	354
Transportador de Metales Divalentes 1 en Anemia con Sobrecarga de Fe	356
Conclusión	357
Ratas Belgrade	360
Transportador de Metales Divalentes 1 en Ratas Belgrade	360
Prohepcidina en Ratas Belgrade	361
Eritropoyetina Tisular en Ratas Belgrade	362

Eritropoyetina Sérica en Ratas Belgrade	362
Conclusión	362
CONCLUSIONES	364
APÉNDICE	366
SECCIÓN V. REFERENCIAS	370
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ORIGINADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	384

CAPÍTULO III:

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN

Debido a la conocida asociación funcional y regulatoria existente entre el riñón (productor de eritropoyetina) y la eritropoyesis, y la conocida asociación entre la actividad eritropoyética y las demandas de Fe (nutriente esencial), uno de los desafíos planeados fue estudiar la expresión de las proteínas del metabolismo del Fe en el riñón.

Para abordar este interrogante se propuso evaluar los cambios en la expresión renal de DMT1 y Prohepcidina, utilizando técnicas inmunohistoquímicas para identificar la localización de estas proteínas en modelos animales que presentan alteraciones en la eritropoyesis y en el ciclo del Fe.

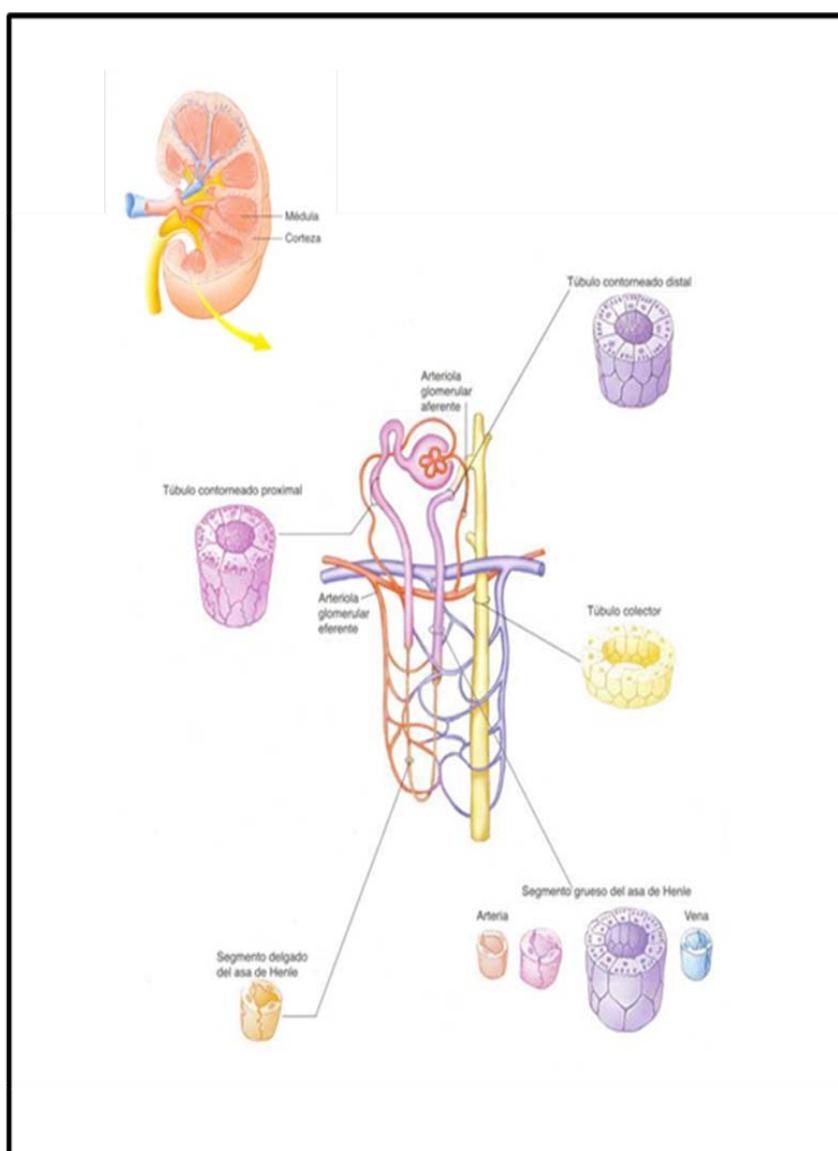


Figura 96. Diagrama esquemático de la estructura del riñón (Gartner-Haïtt. Atlas Color de Histología, 4^o edición).

Se muestra un diagrama esquemático de la estructura del riñón (Figura 96). Los riñones son órganos pares retroperitoneales, cuya superficie está cubierta por tejido conectivo. El parénquima renal se divide en dos zonas bien definidas: la externa, corteza, y la interna, médula, que puede subdividirse en médula externa (contigua a la corteza) y médula interna, más profunda. La zona cortical se compone de corpúsculos renales junto con túbulos contorneados proximales y distales y conductos colectores. En el túbulo contorneado proximal se distinguen 3 segmentos: S1, S2 y S3. La zona medular se compone de las ramas descendente fina, ascendente fina y ascendente gruesa del Asa de Henle, conducto colector y vasos rectos, una red capilar. A causa de la distribución de los túbulos medulares, se forman estructuras cónicas o pirámides renales, separadas por las columnas de Bertin. Desde el punto de vista estructural, el parénquima está formado por nefronas, la unidad funcional del riñón. Cada nefrona consta de dos grandes porciones: un corpúsculo renal, glomérulo, y un sistema tubular que lo drena. El corpúsculo renal está formado por un ovillo de capilares rodeado por la Cápsula de Bowman, una doble capa epitelial. El espacio entre ambas capas de epitelio es el espacio de Bowman. La sangre ingresa al glomérulo a través de la arteriola aferente y sale por la arteriola eferente, de modo que una porción es filtrada en los capilares y queda en el espacio de Bowman. Desde allí, el líquido filtrado pasa al sistema tubular. El epitelio de cada segmento tubular es característico de la función que desempeña (Smith LH et al., 1983; Ross MH et al., 1997).

ANEMIA HEMOLÍTICA

El modelo murino de Anemia Hemolítica caracterizado en nuestro laboratorio fue de gran utilidad para el estudio de la expresión de proteínas del metabolismo del Fe y su regulación, dado que se asocia con elevada actividad eritropoyética y marcada demanda de Fe, reproduciendo un estado de desbalance del Fe análogo al observado en humanos.

TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

El estudio de la corteza renal de ratones No Anémicos reveló abundante presencia del transportador en estructuras similares a túbulo proximales, donde la localización de DMT1 fue intracelular, cercana a la membrana apical (Figura 97).

Una vez identificado DMT1 en la corteza renal se intentó determinar el patrón de expresión de la proteína en los diferentes segmentos del túbulo proximal renal, a partir de las características del epitelio tubular de la zona. En este sentido, detectamos intensa inmunoreactividad en el segmento S2 y S3, mientras que la inmunomarcación fue moderada en el segmento S1. Los glomérulos y vasos sanguíneos no expresaron DMT1 (Figura 97).

El día 3 de la anemia se vio el mismo patrón de distribución de DMT1 en corteza renal de ratones Anémicos y No Anémicos, con expresión de DMT1 en los túbulo proximales (Figura 98). En este sentido, uno de los resultados más relevantes surgió a partir de la observación detallada de los distintos segmentos de túbulo proximal, lo que nos permitió evidenciar un incremento en la expresión de DMT1 en el segmento S2 de túbulo proximal en tejido de ratones Anémicos con respecto al estado basal (Figura 98). Sin embargo, cuando se observó el segmento S3 y S1 se vio que la expresión de DMT1 fue similar a la observada en tejido de animales sin tratar. Es interesante notar además, que la expresión de DMT1 en el citoplasma celular no fue uniforme, sino que el transportador se localizó desplazado hacia la membrana apical (Figura 98).

Por otro lado, durante la recuperación de la anemia (días 4 y 5), la inmunomarcación hallada en la corteza fue similar a la observada en condiciones basales.

Cuando se estudió la médula renal interna se vio expresión de DMT1 con distribución homogénea en la médula renal interna de ratones No Anémicos, localizándose en el interior de las células tubulares (Figura 99).

Luego se estudió el patrón de expresión de la proteína en médula renal interna durante la instauración y recuperación de la anemia.

El día 3 de la anemia, etapa del protocolo asociada a intensa hemólisis (Tabla 1, Capítulo I), DMT1 mantuvo su expresión intracelular en médula interna. Sin embargo, a diferencia de lo hallado en tejido de ratones No Anémicos, en la Anemia DMT1 se vio principalmente asociado a los túbulo de mayor diámetro de la médula interna (Figura 100). El día 4 del protocolo experimental, cuando los animales permanecían aún bajo

severa hemólisis, DMT1 mostró un patrón de expresión similar al hallado el día 3 (Figura 101). Luego, durante la etapa de recuperación de la anemia, DMT1 mostró expresión similar a la observada en días anteriores, aunque las diferencias con el tejido de ratones No Anémico fueron menos evidentes.

La expresión de DMT1 en médula renal externa de ratones Anémicos y No Anémicos no mostró diferencias. En ambas condiciones se observó expresión de DMT1 con localización intracelular y distribución homogénea en los túbulos de la zona medular (Figura 102).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 103).

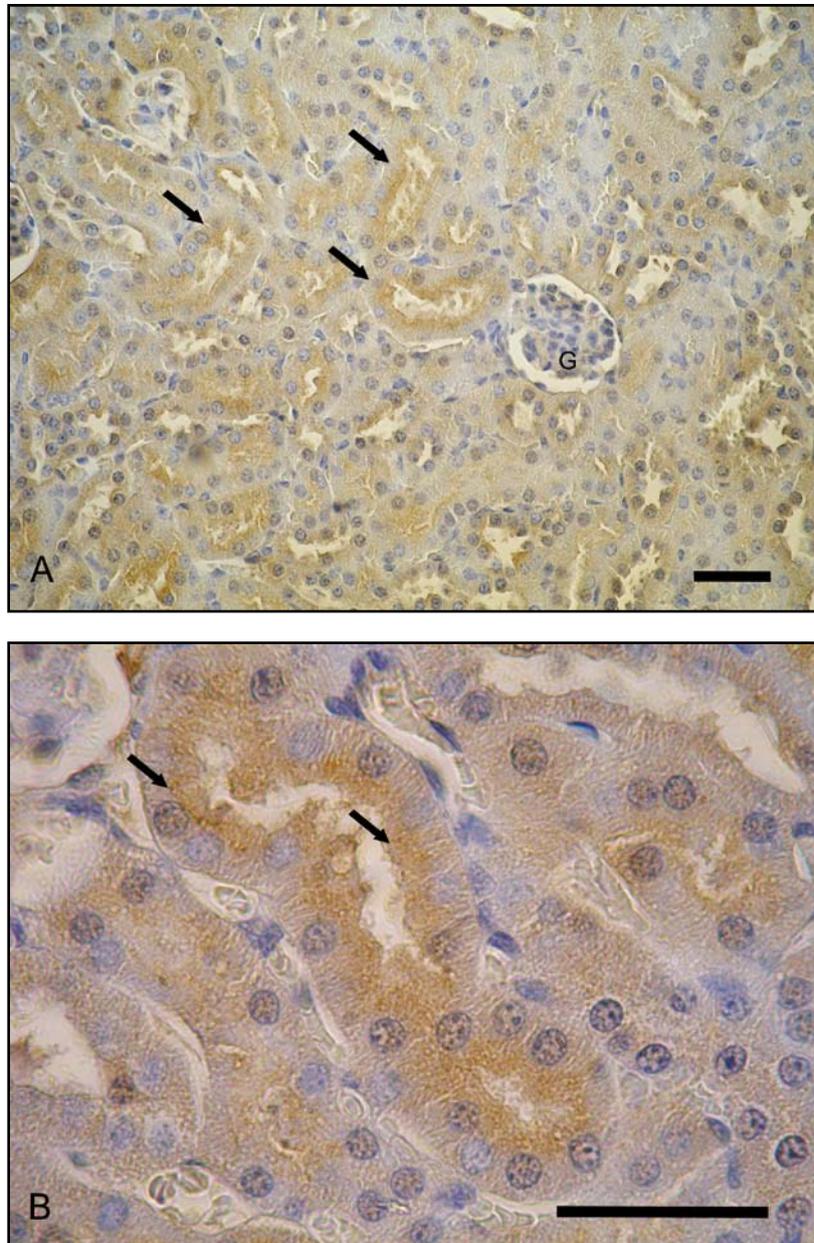


Figura 97. Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en estructuras con morfología de Túbulo Proximal, principalmente en los segmentos S3 y S2 (flecha) (A). Expresión intracelular de DMT1, asociado a la membrana celular apical (flecha) (B). G: glomerulo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

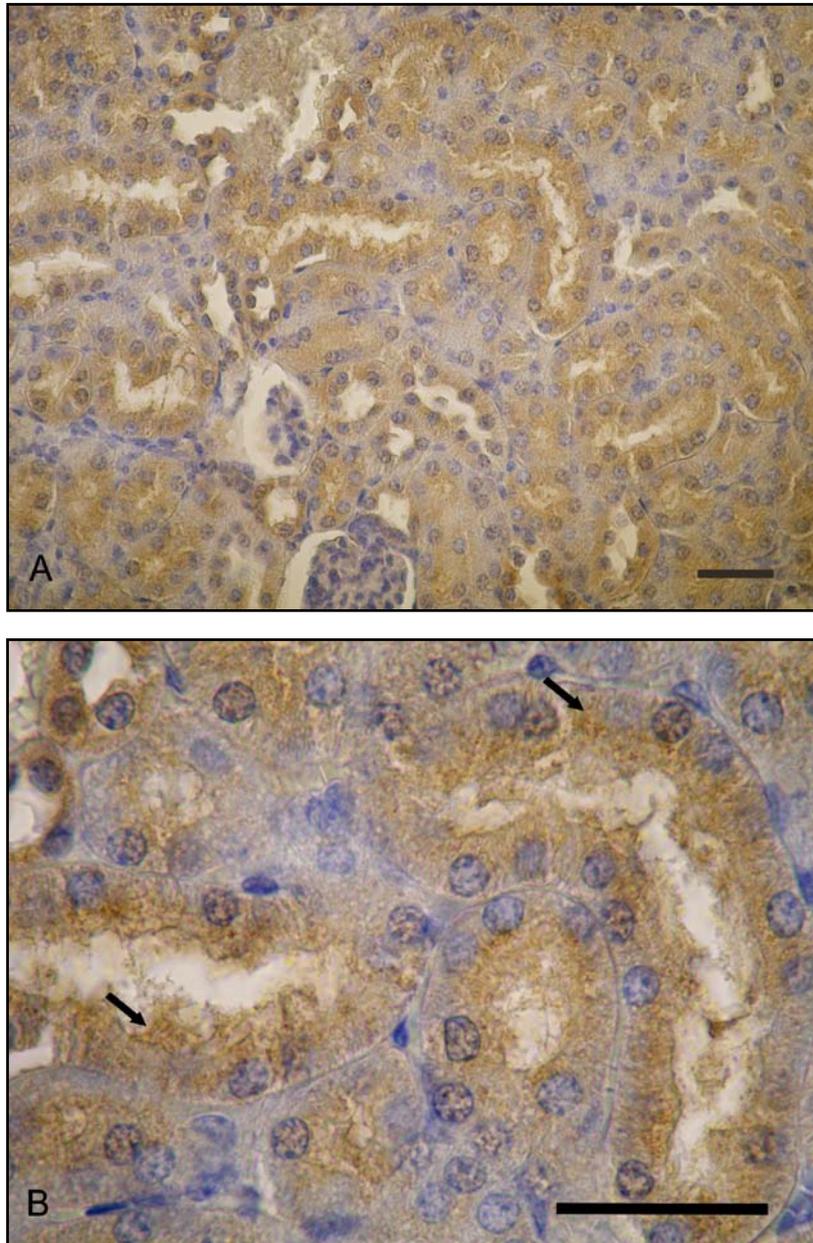


Figura 98. Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Intensa expresión de DMT1 en Túbulo Proximal, principalmente en segmento de S2 (día 3) (A). Expresión intracelular de DMT1, asociado a la membrana apical (flecha) (día 3) (B). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

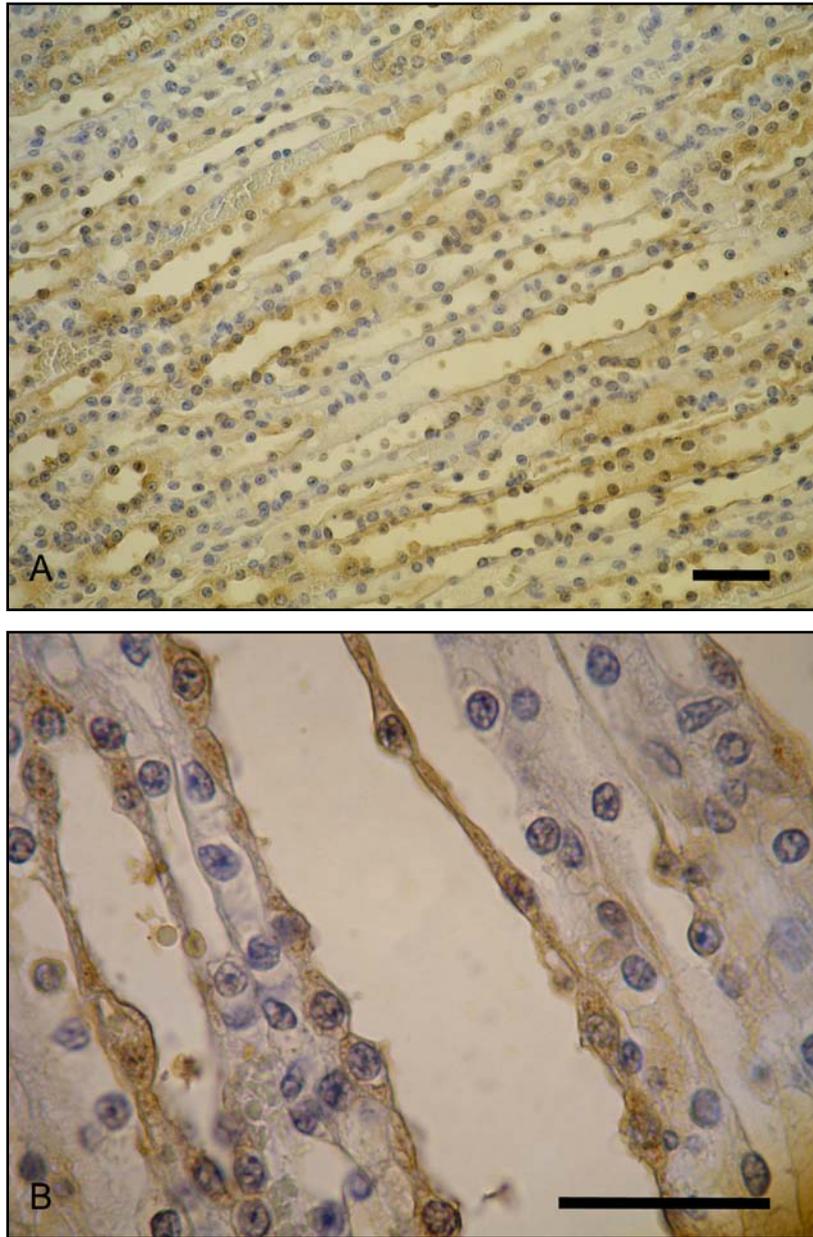


Figura 99. Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular homogénea de DMT1 a lo largo de la médula interna (A), con localización intracelular (B). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

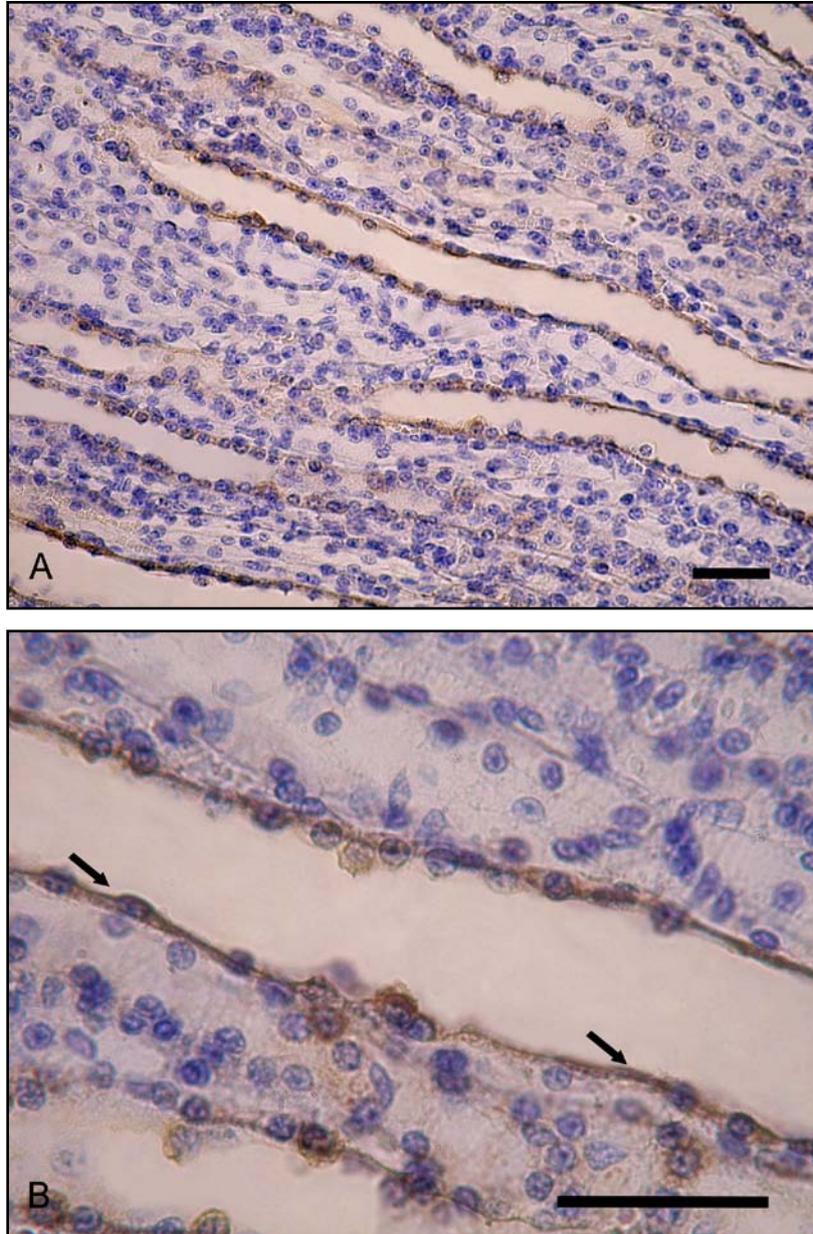


Figura 100. Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular de DMT1, principalmente en los túbulos de mayor diámetro (flecha) (día 3). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

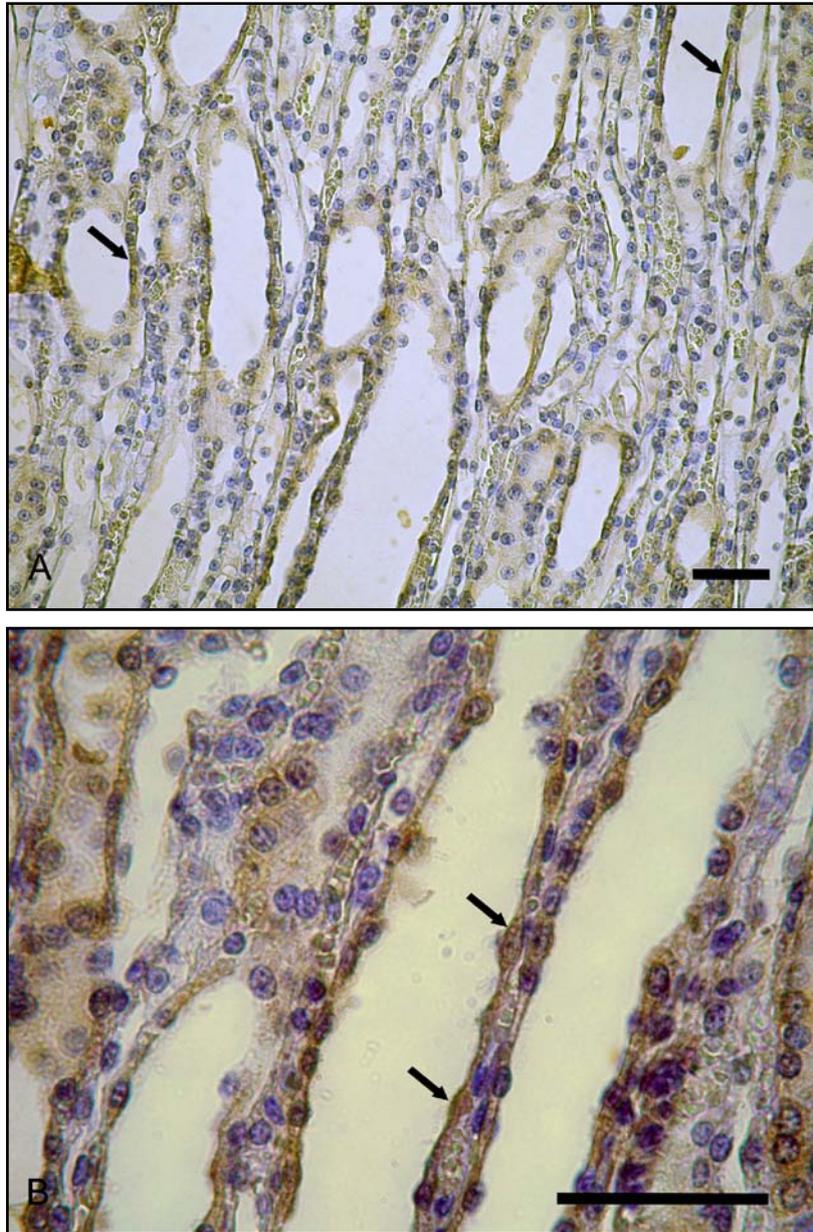


Figura 101. Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra expresión intracelular de DMT1, principalmente en los túbulos de mayor diámetro (flecha) (día 4). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

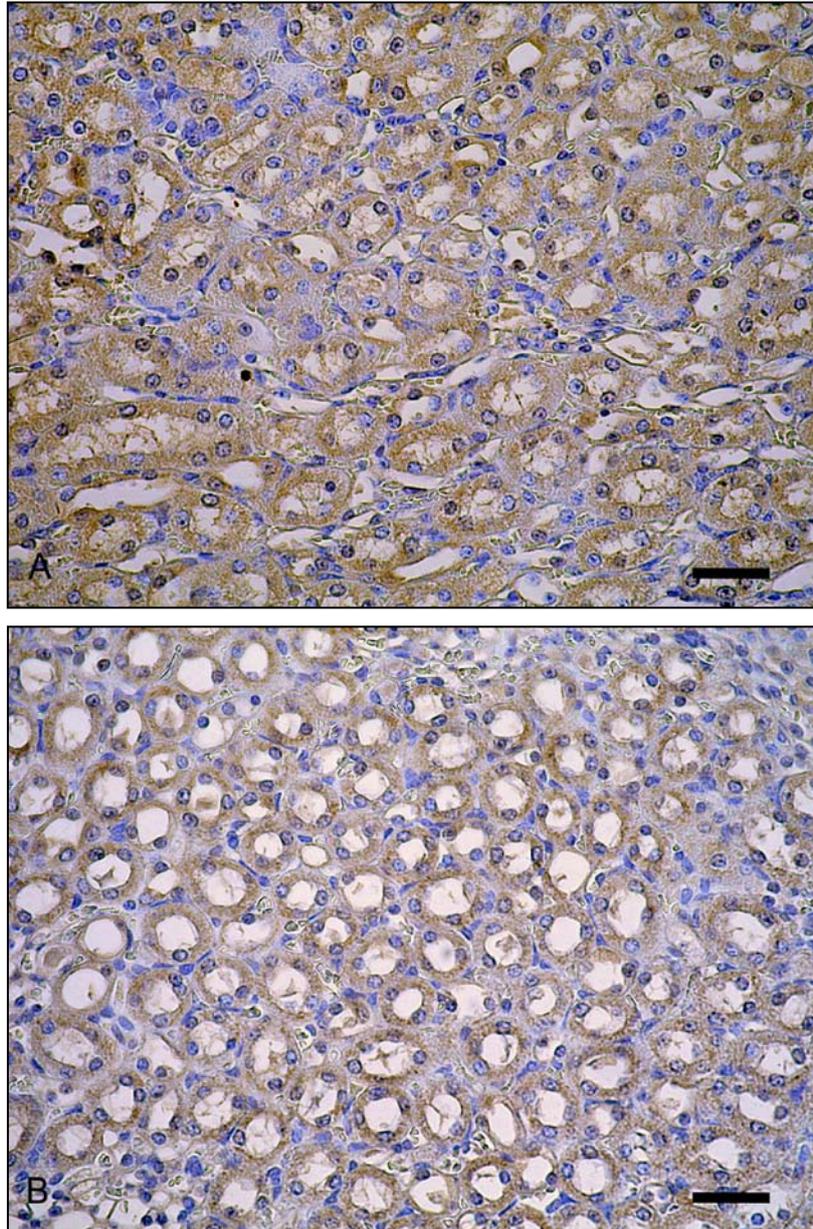


Figura 102. Expresión de DMT1 en Médula Renal Externa de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se trataron con solución fisiológica ó con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. No Anémicos (A): se muestra expresión intracelular de DMT1 en toda la médula externa. Anémicos día 3 (B): se muestra expresión intracelular de DMT1 en toda la médula externa. X 400 (A, B). Escala: 30 μ m.

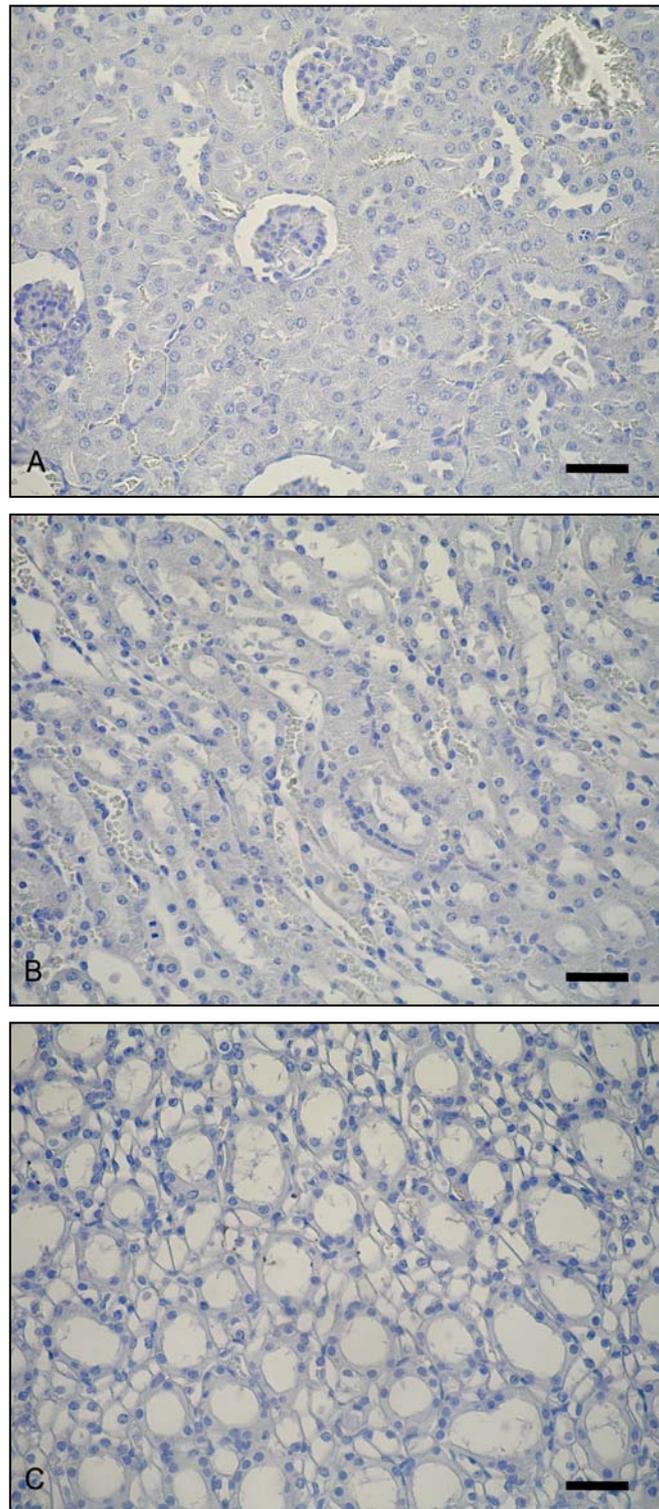


Figura 103. Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

PROHEPCIDINA

La observación histológica de nefronas de ratones No Anémicos mostró expresión de Prohepcidina en túbulos con morfología de túbulo proximal, con localización intracelular muy cercana a la membrana basal, sin observarse marcación en glomérulo y vasos sanguíneos (Figura 104).

Una vez identificada Prohepcidina en las nefronas corticales de animales No Anémicos, se intentó determinar el patrón de expresión de la proteína en los segmentos de túbulo proximal renal, basándonos en la morfología del epitelio tubular. Pudimos observar intensa inmunoreactividad en el segmento S2 de túbulos proximales, siendo menor la expresión de la proteína en el segmento S1, sin poder detectarse Prohepcidina en el segmento S3 (Figura 104).

La examinación de la zona cortical renal de ratones Anémicos (día 3) reveló un patrón de distribución de Prohepcidina similar al hallado en tejido de ratones No Anémicos. Se observó expresión de Prohepcidina en túbulos con morfología de túbulos proximales, con localización intracitoplasmática estrechamente asociada a la membrana basal (Figura 105). La expresión de Prohepcidina hallada fue intensa en el segmento S2 del túbulo proximal, moderada en S1 y ausente en el segmento S3 (Figura 105). Al igual que en tejido de animales No Anémicos, la proteína no fue observada en otras estructuras corticales.

De la observación de la corteza renal se depende uno de los resultados más importantes. Si bien la inmunohistoquímica no es una técnica cuantitativa, de nuestros resultados podemos inferir que en la corteza renal de ratones Anémicos la expresión de Prohepcidina fue menos evidente que en tejido de ratones No Anémicos.

El estudio inmunohistoquímico del tejido medular de ratones No Anémicos mostró marcada expresión de Prohepcidina en la médula interna, con clara localización intracitoplasmática (Figura 106).

Sin embargo, la presencia de un estado anémico evidenciado por los niveles de Hb, HCT y recuento de eritrocitos (Capítulo I), se asoció con una evidente disminución en la intensidad de expresión de Prohepcidina en médula interna con respecto al tejido de ratones No Anémicos (Figura 107).

El estudio de las nefronas se continuó con la detección de Prohepcidina en médula renal externa. Se evidenció moderada expresión de Prohepcidina en tejido renal de ratones No Anémicos, sin evidenciarse cambios frente a la anemia (Figura 108).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 109).

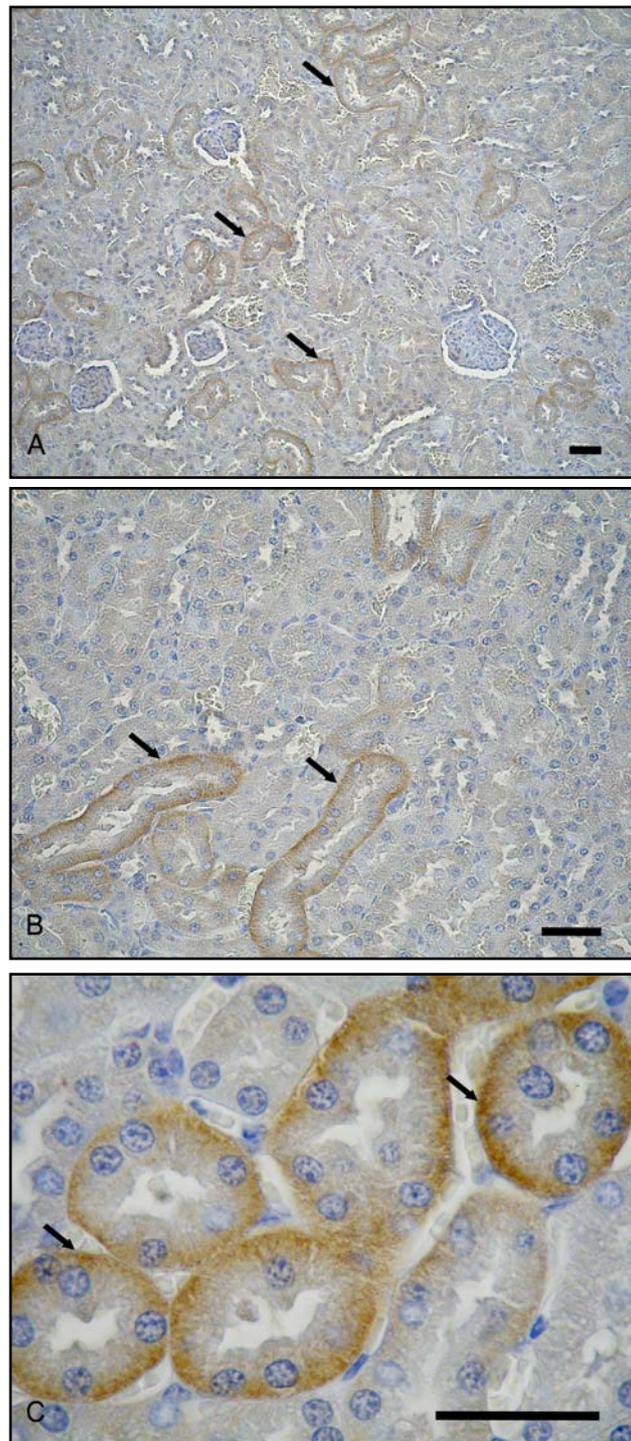


Figura 104. Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. En A y B se muestra expresión de Prohepcidina en estructuras con morfología de Túbulo Proximal, con evidente expresión en segmento S2 (flecha). En C se muestra inmunomarcación intracelular cercana a la cara celular basolateral (flecha). X 200 (A), X 400 (B), x 1000 (C). Escala: 30 μ m.

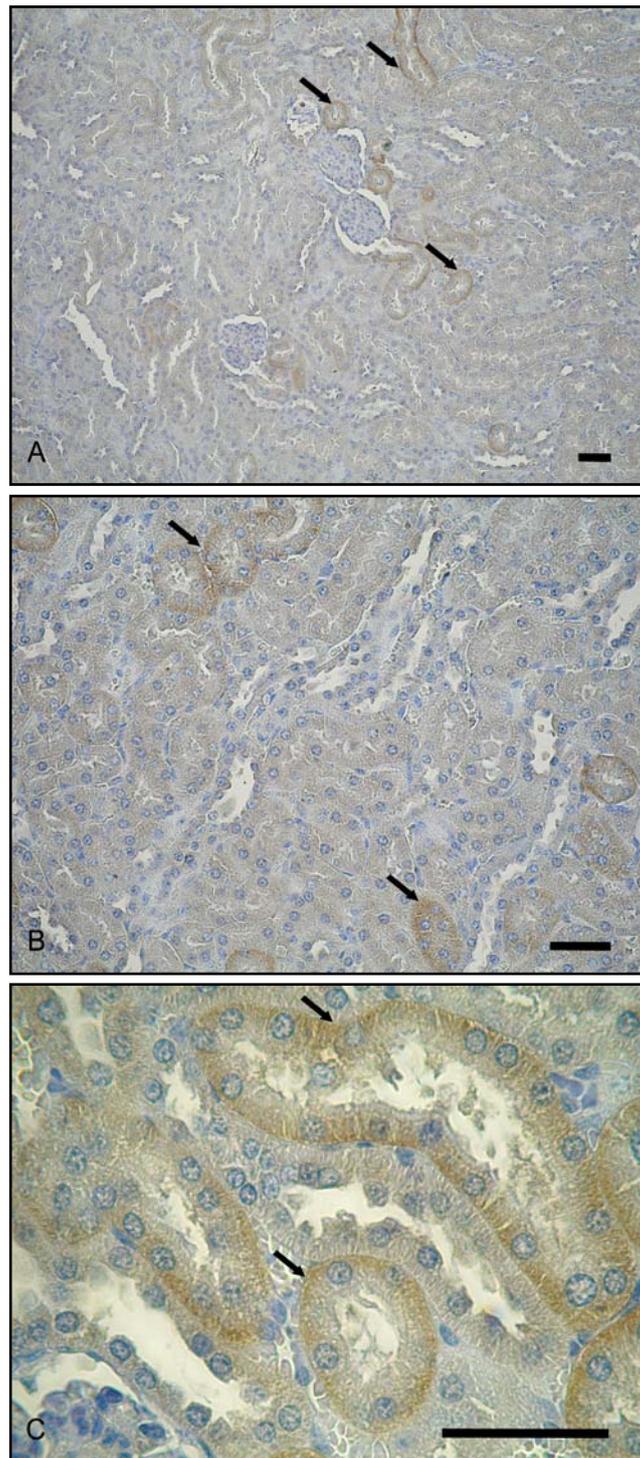


Figura 105. Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. En A y B se muestra moderada expresión de Prohepcidina en estructuras con morfología de Túbulo Proximal, con evidente expresión en segmento S2 (flecha) (día 3). En C se muestra inmunomarcación de Prohepcidina con localización intracelular cercana a la cara basolateral (flecha) (día 3). X 200 (A), X 400 (B), x 1000 (C). Escala: 30 μ m.

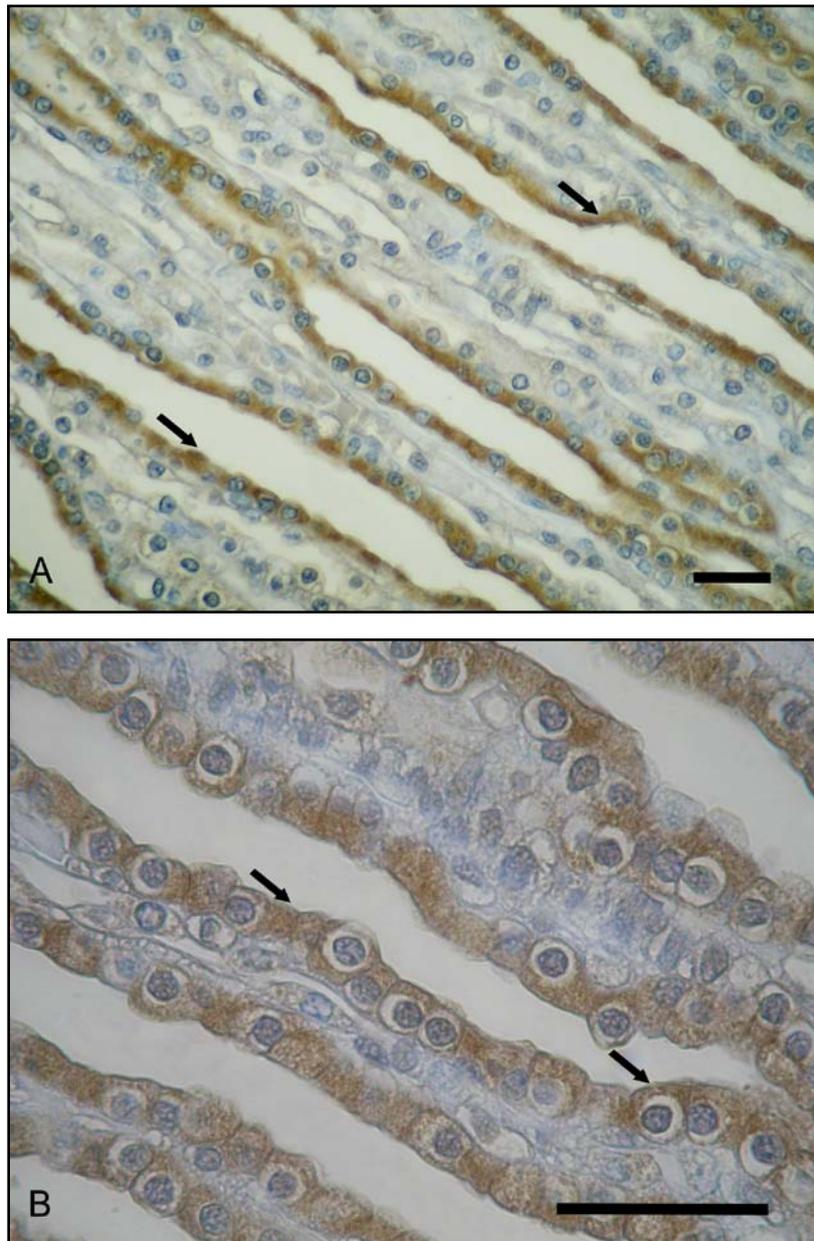


Figura 106. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. No anémicos: marcada expresión intracelular de Prohepcidina en túbulos renales (flecha). X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m.

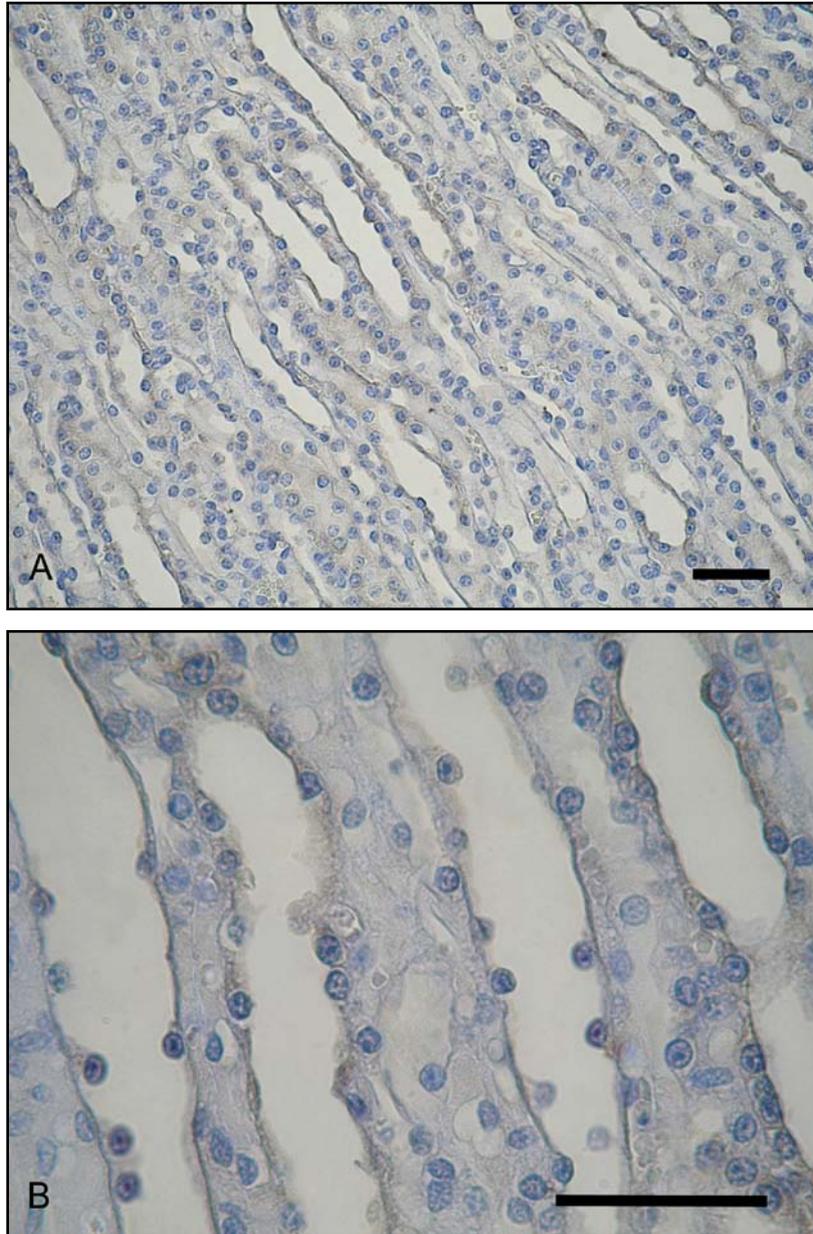


Figura 107. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Anémicos (día 3): moderada expresión de Prohepcidina en túbulos renales. X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m.

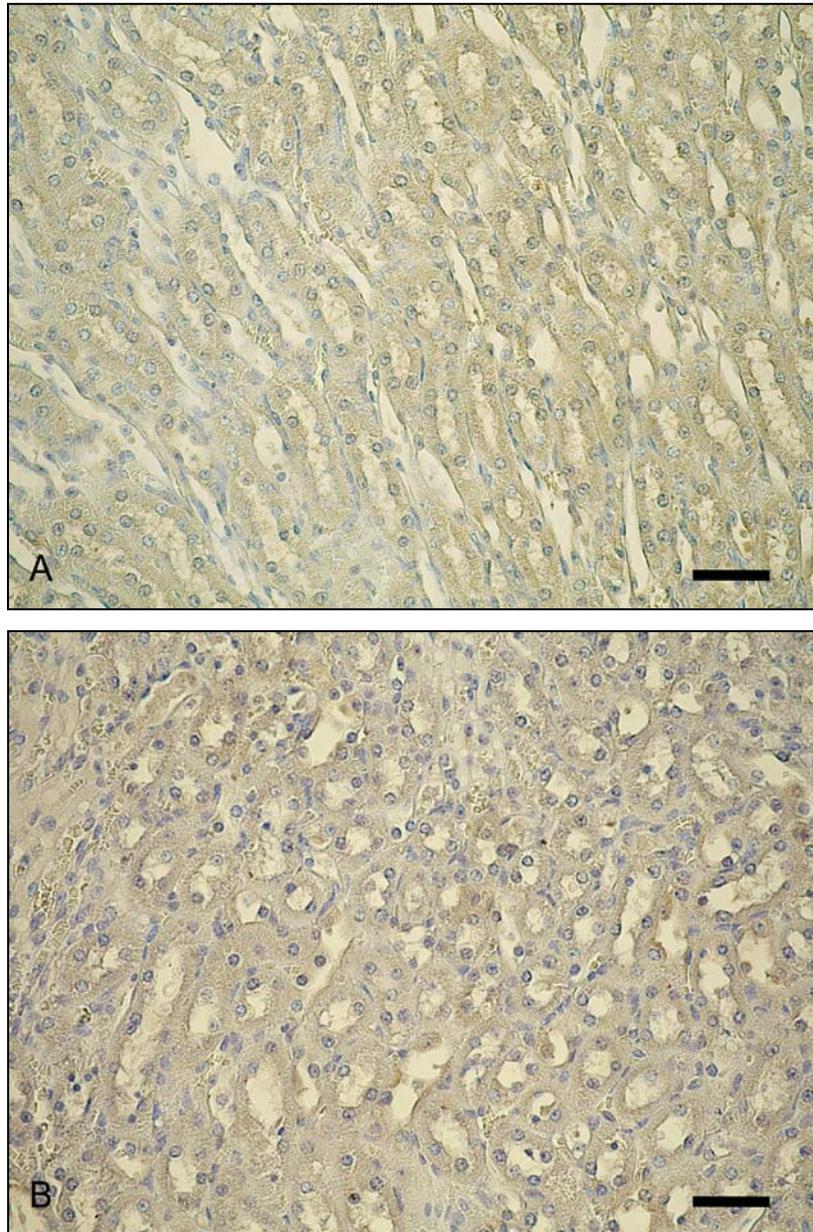


Figura 108. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratones Anémicos y No Anémicos. Ratones hembras se trataron con solución fisiológica ó con FHZ. Un grupo de animales ($n=3$) fue sacrificado y los tejidos se procesaron para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de Prohepcidina en médula renal interna de ratones No Anémicos (A) y Anémicos (B) (día 3). X 400 (A, B). Escala: 30 μm .

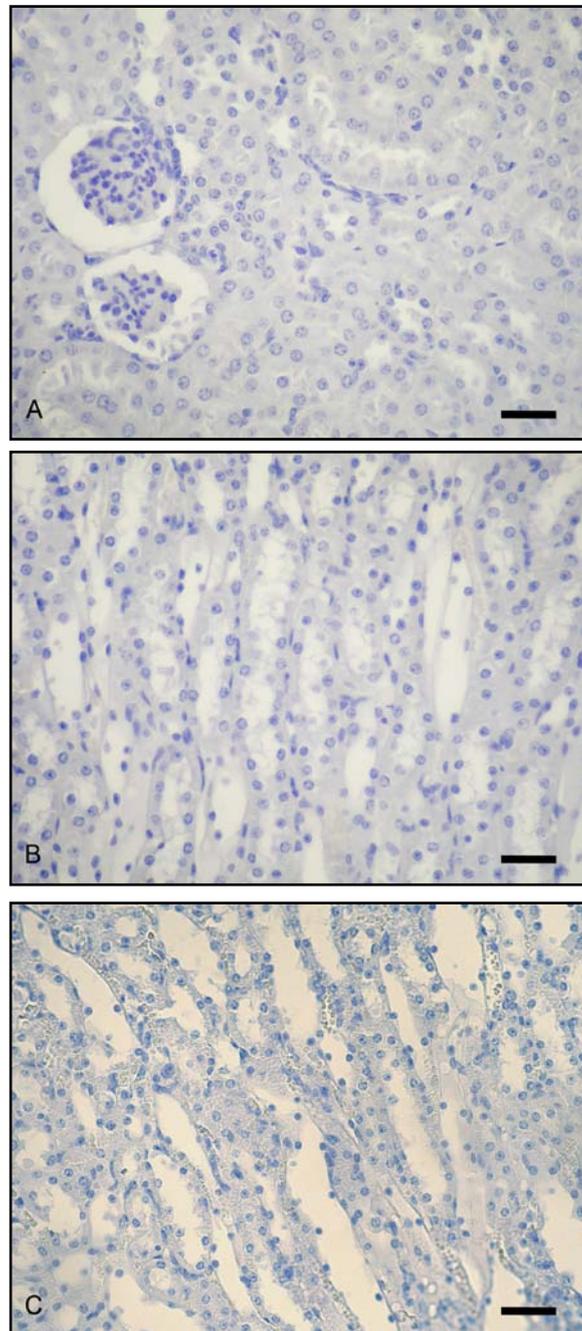


Figura 109. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal en Anemia. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

HIERRO TISULAR

La relación entre el tejido renal y el Metabolismo del Fe se confirmó mediante la identificación de dos proteínas claves de la ruta del Fe, como Prohepcidina y el transportador de Metales Divalentes 1, y de los cambios en la expresión de ambas proteínas. Por este motivo, la valoración del Fe renal mediante Tinción de Perl's fue el siguiente paso.

En la examinación del tejido renal de ratones No Anémicos no se observaron pigmentos de Fe^{3+} en la corteza y en la médula renal externa e interna (Figura 110).

Sin embargo, frente a la crisis hemolítica (día 3), la corteza renal reveló presencia intracelular de Fe^{3+} en estructuras con morfología similar a túbulo proximal (Figura 111).

En un análisis más detallado, y conociendo las características del epitelio del túbulo proximal se pudieron observar abundantes depósitos de Fe^{3+} en los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal, y ausencia en el segmento S3. En otras estructuras corticales de la nefrona, como glomérulo y vasos sanguíneos, no se evidenciaron pigmentos de Fe^{3+} (Figura 111).

A diferencia de los resultados hallados en la corteza renal de ratones Anémicos, no se detectaron depósitos de Fe^{3+} en médula externa e interna frente a la Anemia (Figura 112).

El monitoreo de los pigmentos de Fe^{3+} en la etapa de recuperación de la anemia (días 4 y 5) mostró cambios similares a los detectados el día 3, observándose pigmentos de Fe^{3+} en estructuras corticales con morfología de túbulo proximal, siendo más evidentes en los segmentos S1 y S2.

A partir de la identificación de Fe en tejido renal por Tinción de Perl's en condiciones de severa hemólisis se realizó la cuantificación del Fe total en riñón de ratones Anémicos y No Anémicos.

Nuestros resultados muestran que en los días de mayor hemólisis (días 2, 4), caracterizados por la determinación de parámetros hematológicos (Capítulo I), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de Fe total en tejido renal, entre tejido de ratones Anémicos y No Anémicos (Figura 113).

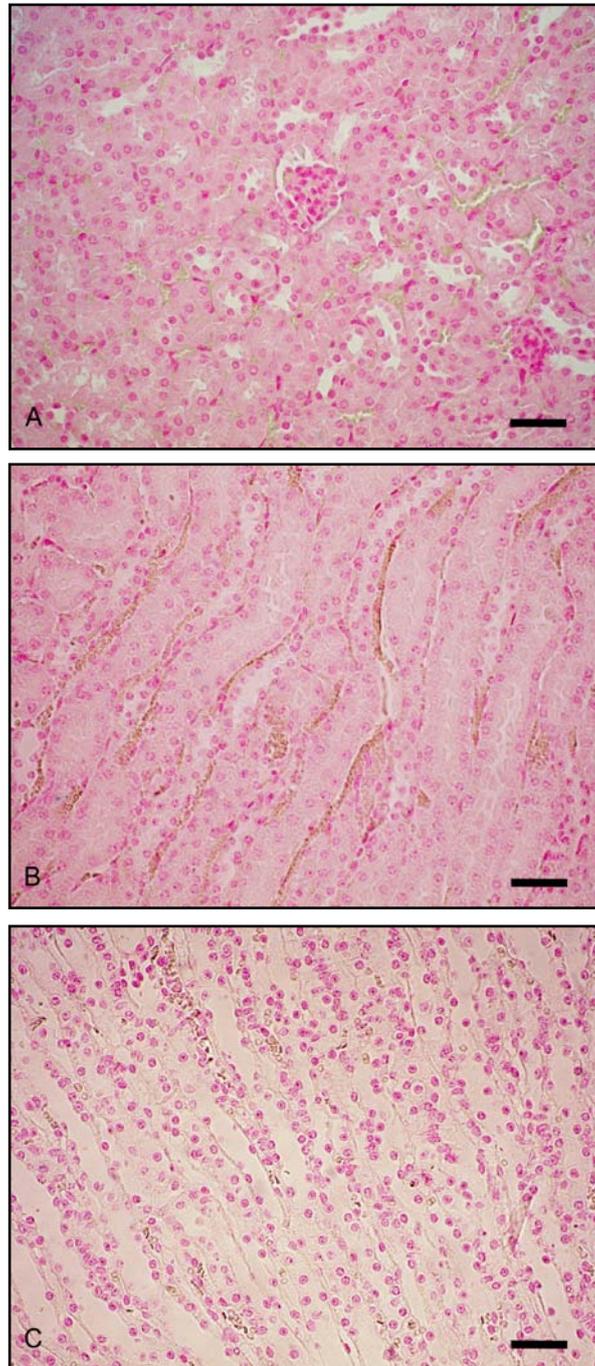


Figura 110. Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratones No Anémicos. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): No se observan pigmentos de Fe. G: glomérulo. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m.

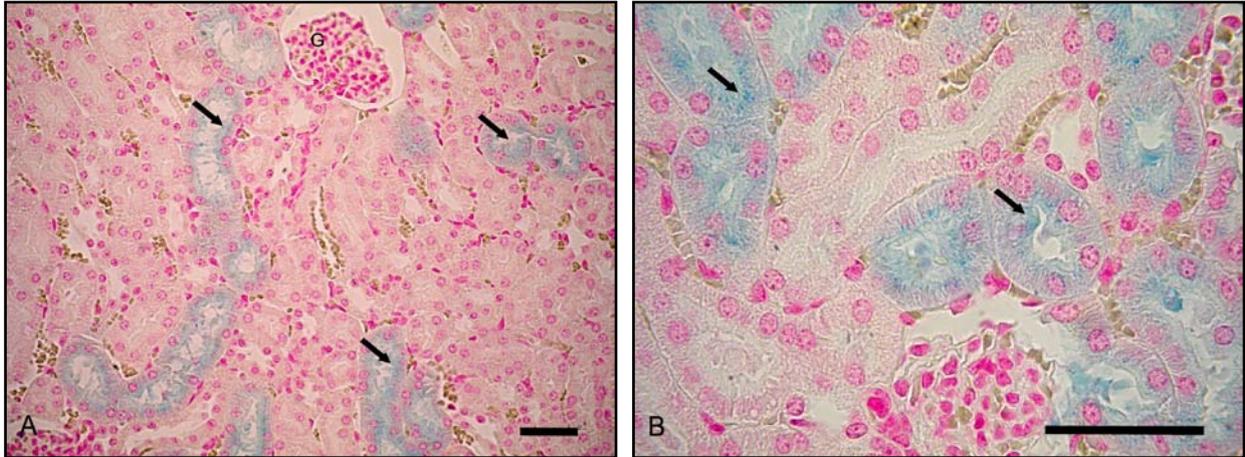


Figura 111. Tinción de Perl's de Corteza Renal de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. En A se muestra Fe en Túbulos Proximales, principalmente en segmento S1 y S2 (flecha) (día 3). En B se muestra localización intracelular de Fe (flecha) (día 3). G: glomérulo. X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m.

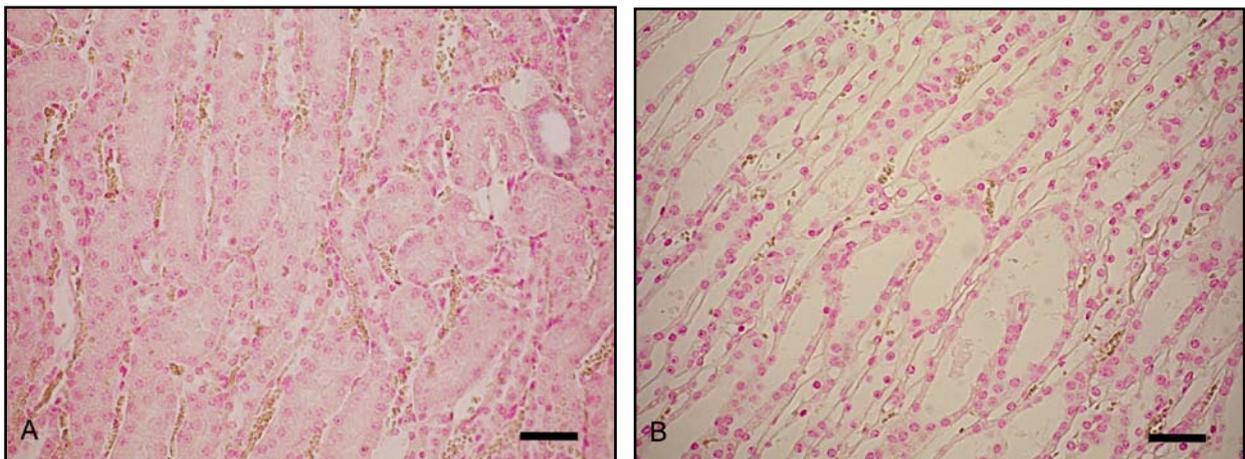


Figura 112. Tinción de Perl's de Médula Renal de Ratones Anémicos. Ratones hembras se anemizaron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. No se observan pigmentos de Fe en Médula externa (A) y Médula Interna (B) (día 3). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m.

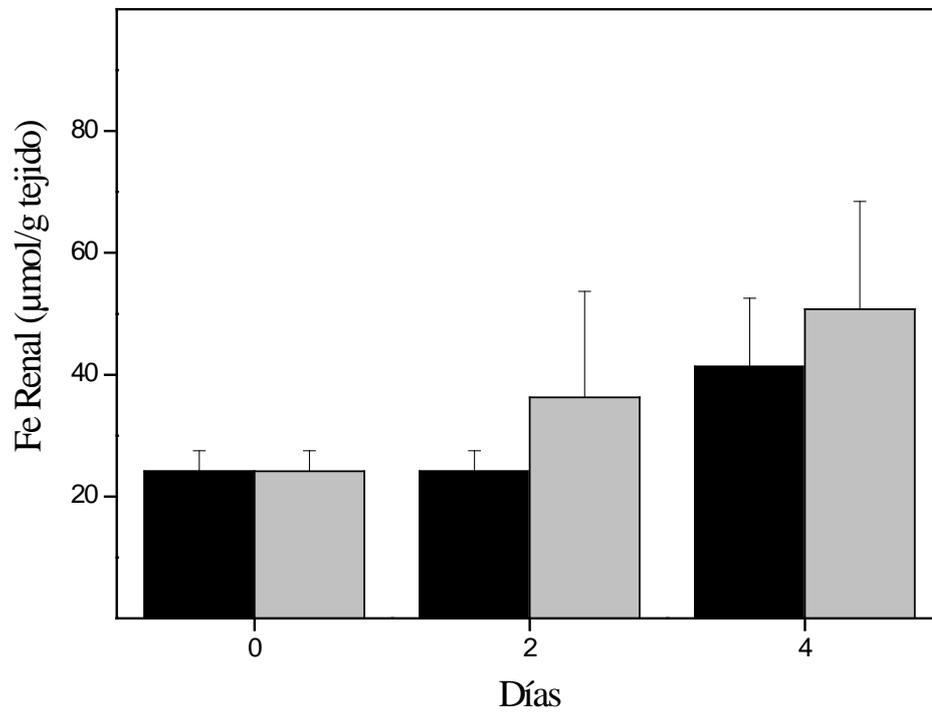


Figura 113. Cuantificación del Fe Renal en Tejido de ratones Anémicos y No anémicos. Ratones hembras se trataron con solución salina o FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido renal fue procesado para la cuantificación de Fe según se describe en Materiales y Métodos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre tejido Anémico (■) y No Anémico (■). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar ($p < 0.05$).

SOBRECARGA DE Fe

Una vez que se determinaron los cambios en la expresión renal de proteínas del metabolismo del Fe en una condición de alta demanda de Fe como la Anemia Hemolítica, decidimos continuar con nuestros estudios sobre el compromiso del riñón. Para ello nos propusimos identificar la expresión renal del importador de Fe DMT1 y de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe. El estudio de un estado de exceso de Fe reviste gran importancia ya que es una condición clínica frecuente, en la que diversos sistemas orgánicos responden para evitar la conocida citotoxicidad que es capaz de generar el exceso de Fe libre.

TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

Los estudios realizados en corteza renal de ratones con Sobrecarga de Fe mostraron expresión homogénea de DMT1 en la mayoría de las estructuras tubulares corticales, con localización intracelular. Estos resultados difieren de lo hallado en tejido de animales sin tratar, donde la inmunomarcación fue predominante en estructuras tubulares con morfología de túbulo proximal. Estructuras corticales como glomérulos y vasos sanguíneos no mostraron expresión de la proteína (Figura 114).

La médula renal externa e interna en Sobrecarga de Fe también mostró expresión de DMT1. El análisis de la médula externa de ratones con Sobrecarga de Fe mostró moderada expresión de DMT1, localizado en el interior de las células tubulares y con distribución homogénea en toda la zona renal (Figura 115). Este patrón de expresión de la proteína fue similar al observado en tejido de ratones sin Sobrecarga de Fe, descrito anteriormente. Por otro lado, se vio expresión intracitoplasmática de DMT1 en túbulos de la médula interna de ratones con Sobrecarga de Fe, sin detectarse diferencias con respecto a la expresión de la proteína hallada en médula interna de ratones sin Sobrecarga de Fe (Figura 116).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 117).

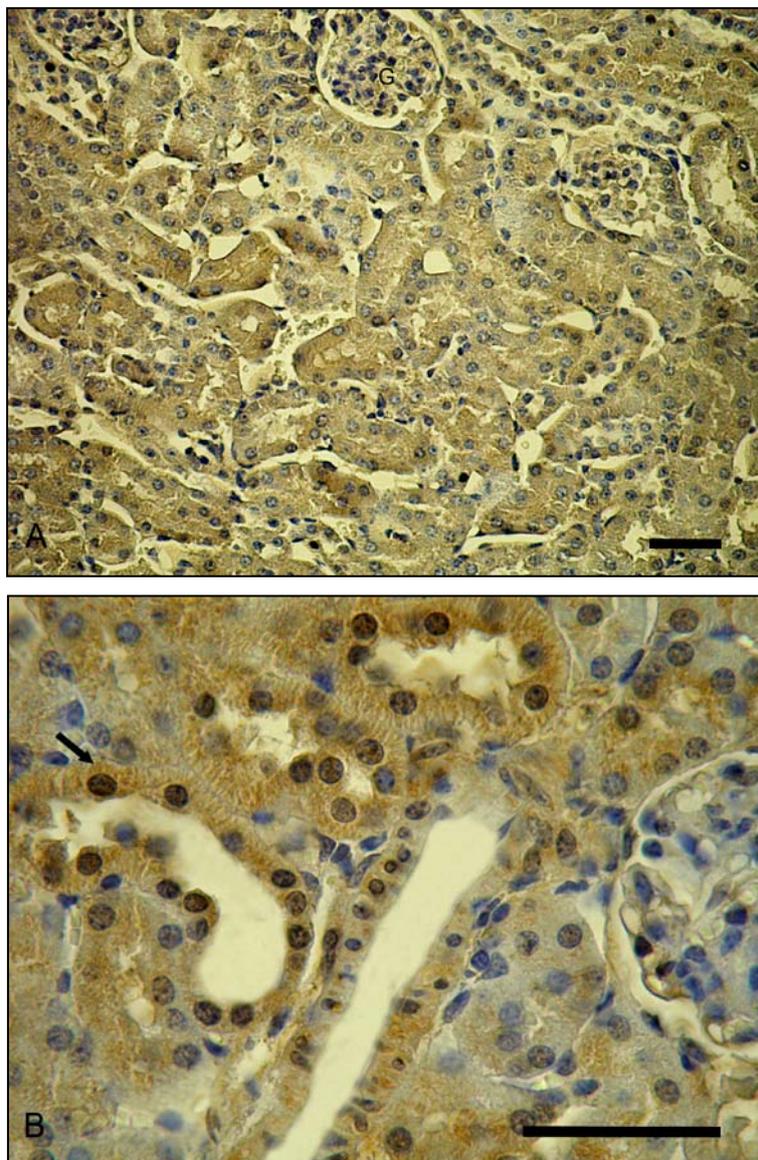


Figura 114. Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en células tubulares renales (día 20) (A). Expresión intracelular de DMT1 (flecha) (día 20) (B). G: glomérulo. X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m

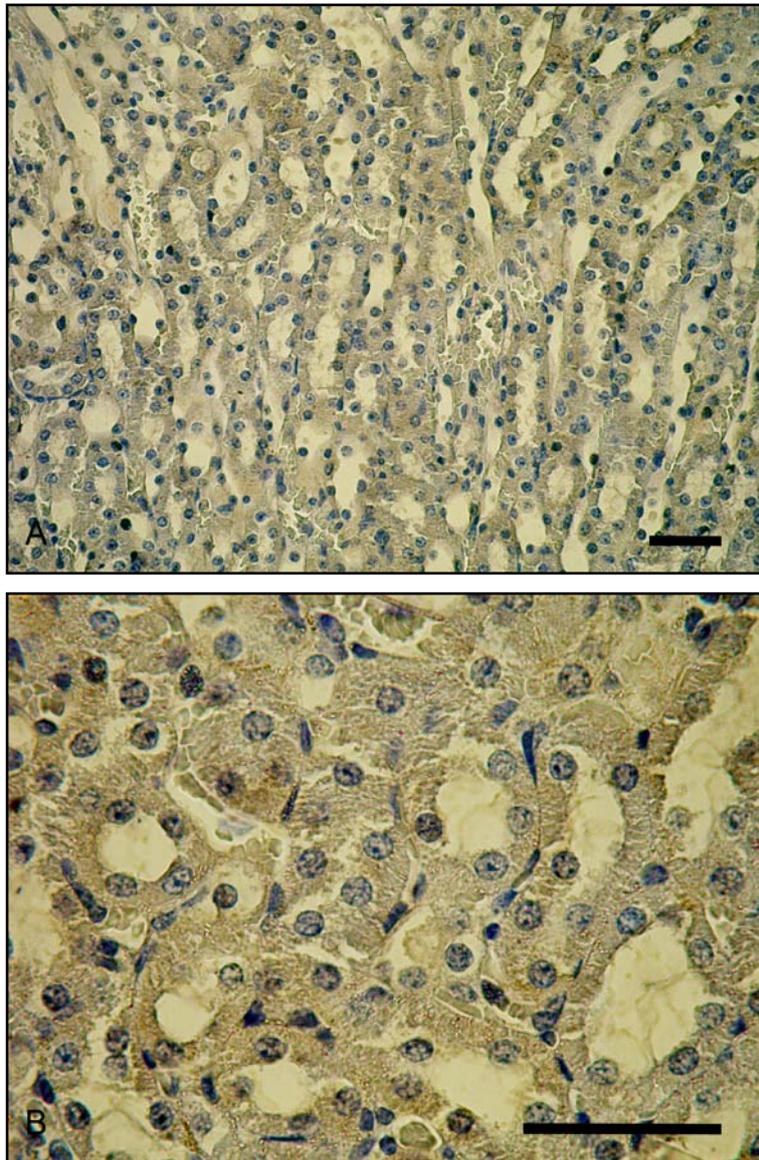


Figura 115. Expresión de DMT1 en Médula Renal Externa de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en la médula renal externa, con localización intracelular (día 20). X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m

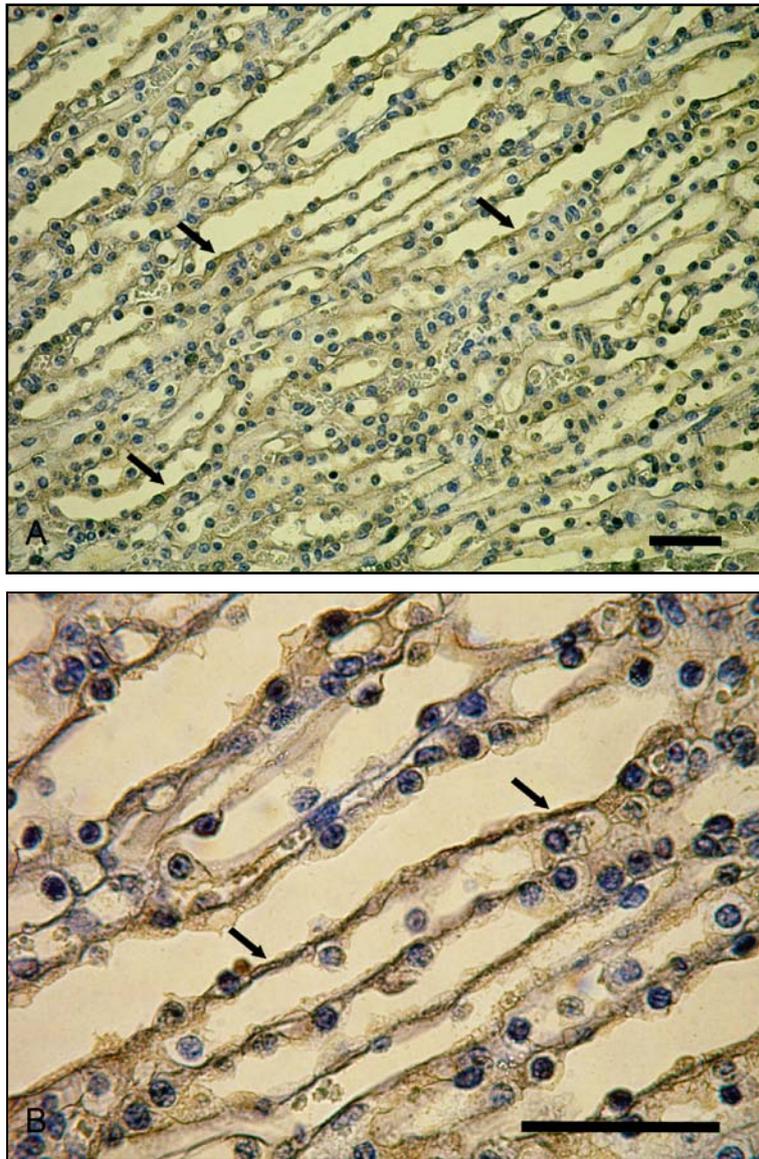


Figura 116. Expresión de DMT1 en Médula Renal Interna de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en la médula renal interna, con localización intracelular (flecha) (día 20). X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m

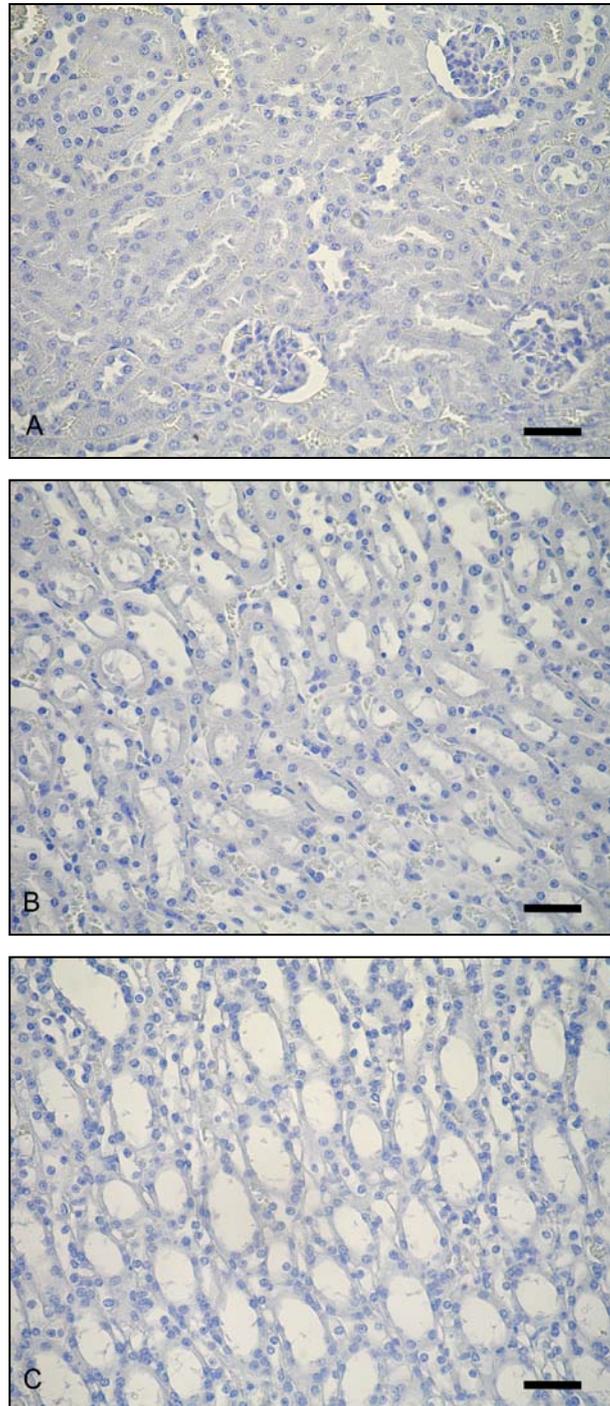


Figura 117. Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

PROHEPCIDINA

La observación de la corteza renal de ratones con Sobrecarga de Fe reveló marcada expresión de Prohepcidina en estructuras con morfología de epitelio del túbulo proximal, presentando una localización intracelular cercana a la membrana basal (Figura 118).

Cuando evaluamos la expresión de Prohepcidina en los diferentes segmentos de túbulo proximal cortical de la nefrona, se vio que el segmento S2 mostró la expresión más intensa de la proteína, siendo menos evidente en S1, y sin evidenciarse en el segmento S3. Otras estructuras corticales, como glomérulos y vasos sanguíneos, no evidenciaron expresión de la proteína (Figura 118).

La identificación cortical de Prohepcidina fue uno de los resultados más relevantes sobre la expresión renal de Prohepcidina. Si bien el patrón de expresión de Prohepcidina fue similar en tejido con y sin Sobrecarga de Fe, por la intensidad de la inmunomarcación podemos decir que la expresión de Prohepcidina fue menos evidente en la segunda condición.

Es importante mencionar, que los cambios en la expresión Prohepcidina coincidieron con la presencia de abundantes pigmentos hepáticos de hemosiderina y con elevados niveles de Fe hepático, cambios descritos en el Capítulo I.

El análisis de la médula renal externa de ratones con Sobrecarga de Fe mostró moderada expresión de Prohepcidina, localizándose en el citoplasma de las células tubulares (Figura 119). Estos resultados no muestran diferencias con respecto a la intensidad de expresión y a la localización de Prohepcidina en médula renal externa de ratones sin Sobrecarga de Fe (Capítulo III).

Cuando se analizó la médula interna de ratones con Sobrecarga de Fe se evidenció marcada expresión de Prohepcidina, con localización intracelular y con distribución homogénea a lo largo del tejido (Figura 119). No se hallaron diferencias en la expresión de la proteína con respecto al tejido de ratones sin Sobrecarga de Fe.

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 120).

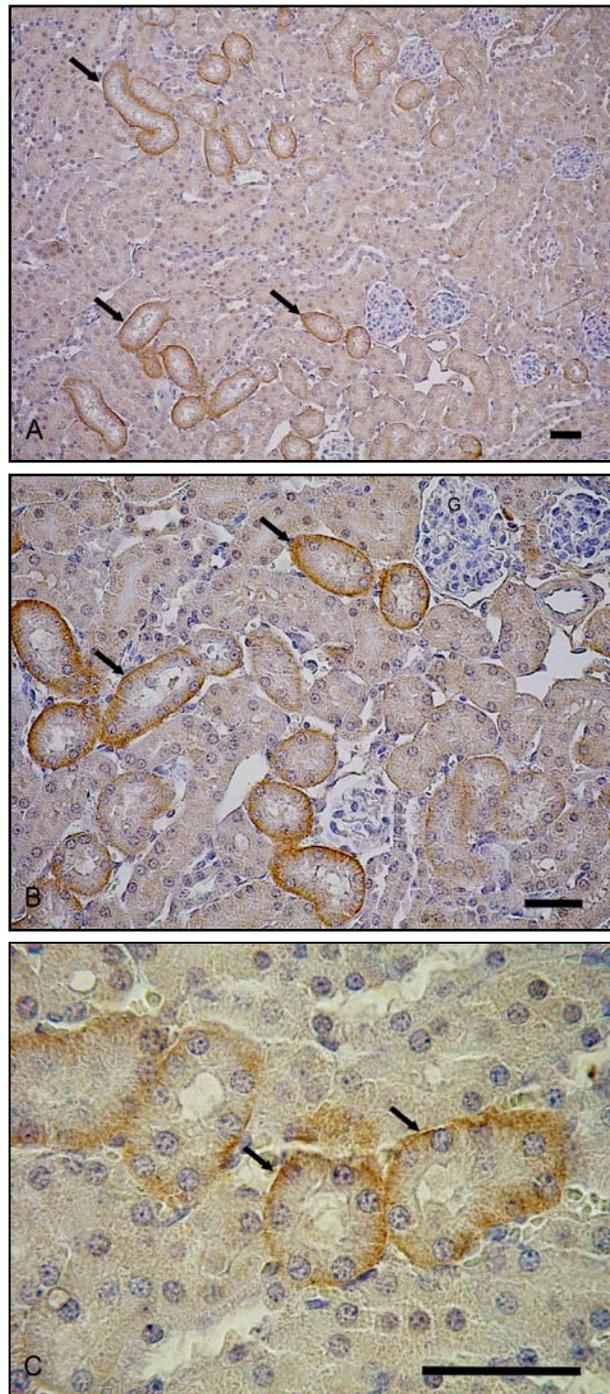


Figura 118. Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Marcada expresión de Prohepcidina en estructuras con morfología de Túbulo Proximal, con mayor inmunoreactividad en el segmento S2 (flecha) (día 20) (A, B). Inmunomarcación intracelular de Prohepcidina, cercana a la cara basolateral (flecha) (día 20) (C). G: glomérulo. X 200 (A), X 400 (B), x 1000 (C). Escala: 30 μ m.

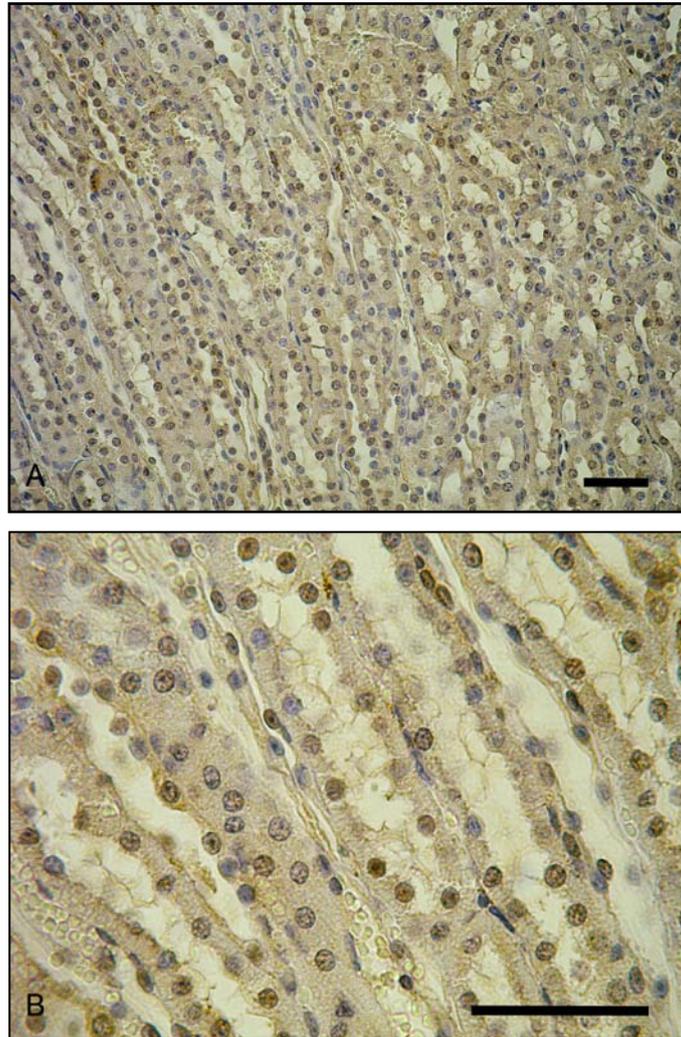


Figura 119. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de Prohepcidina en médula renal externa, con localización intracelular. X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m.

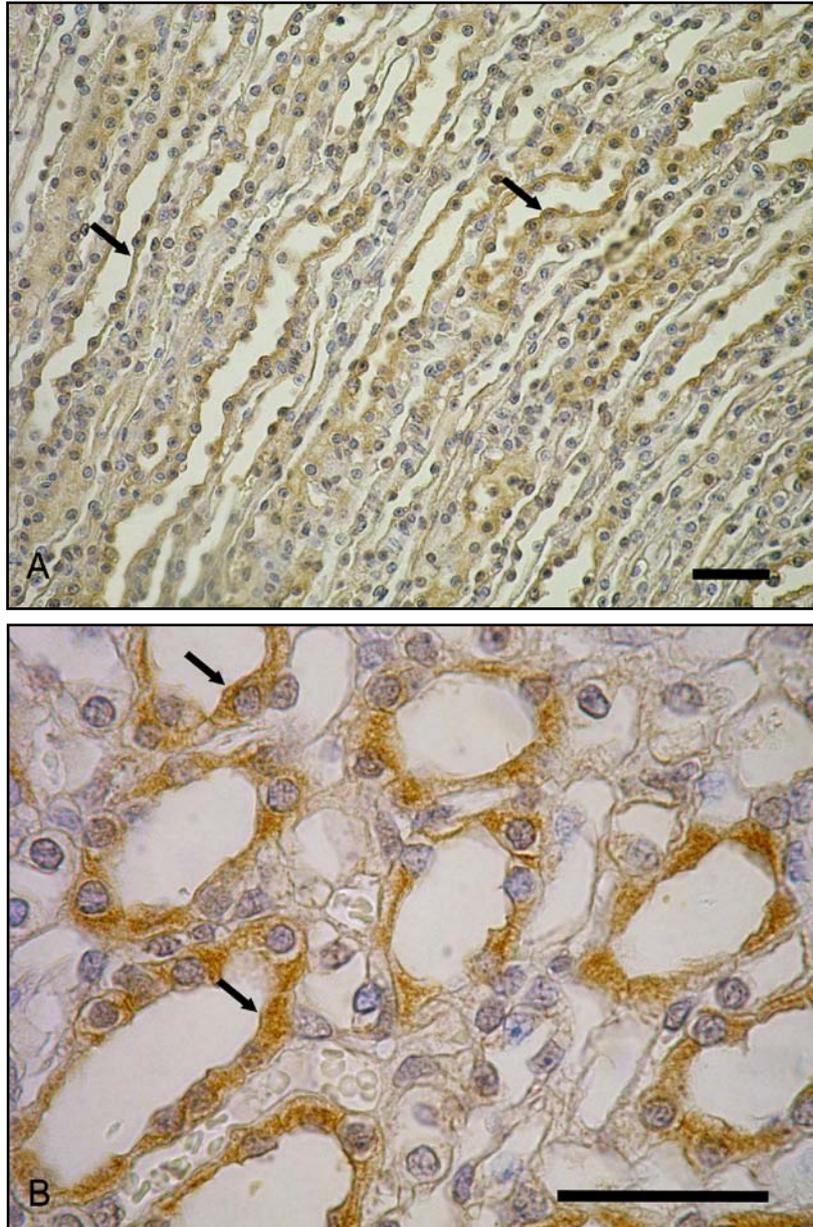


Figura 120. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Método. Marcada expresión de Prohepcidina en médula interna, con localización intracitoplasmática (flecha) (día 20). X 400 (A), x 1000 (B). Escala: 30 μ m.

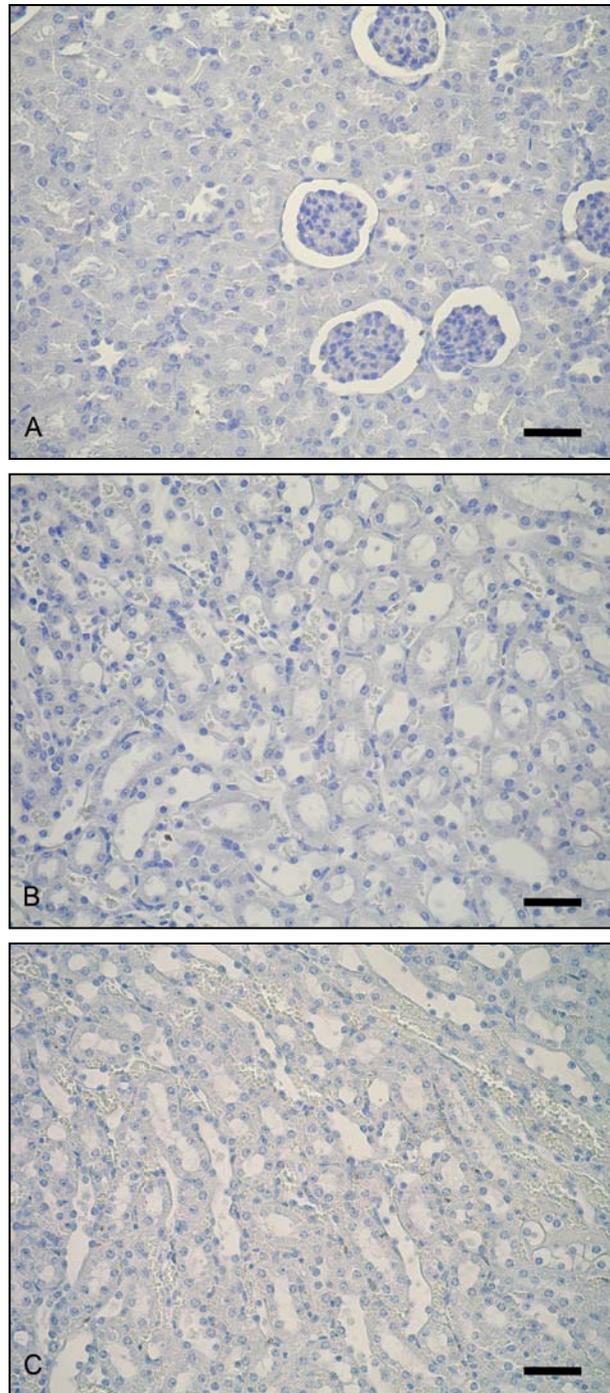


Figura 121. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

HIERRO TISULAR

El estudio de valoración del Fe^{3+} en riñón de ratones con Sobrecarga de Fe mostró abundantes pigmentos de Fe, localizado selectivamente en el tejido conectivo inter-tubular. Es importante destacar que no se detectó Fe^{3+} en el citoplasma de las células tubulares renales (Figura 122).

Una observación más detallada del tejido con Tinción de Perl's mostró Fe^{3+} con un perfil de distribución heterogéneo. En este sentido, el Fe^{3+} fue más notorio en la médula externa que en la corteza, estando ausente en la médula renal interna (Figura 122).

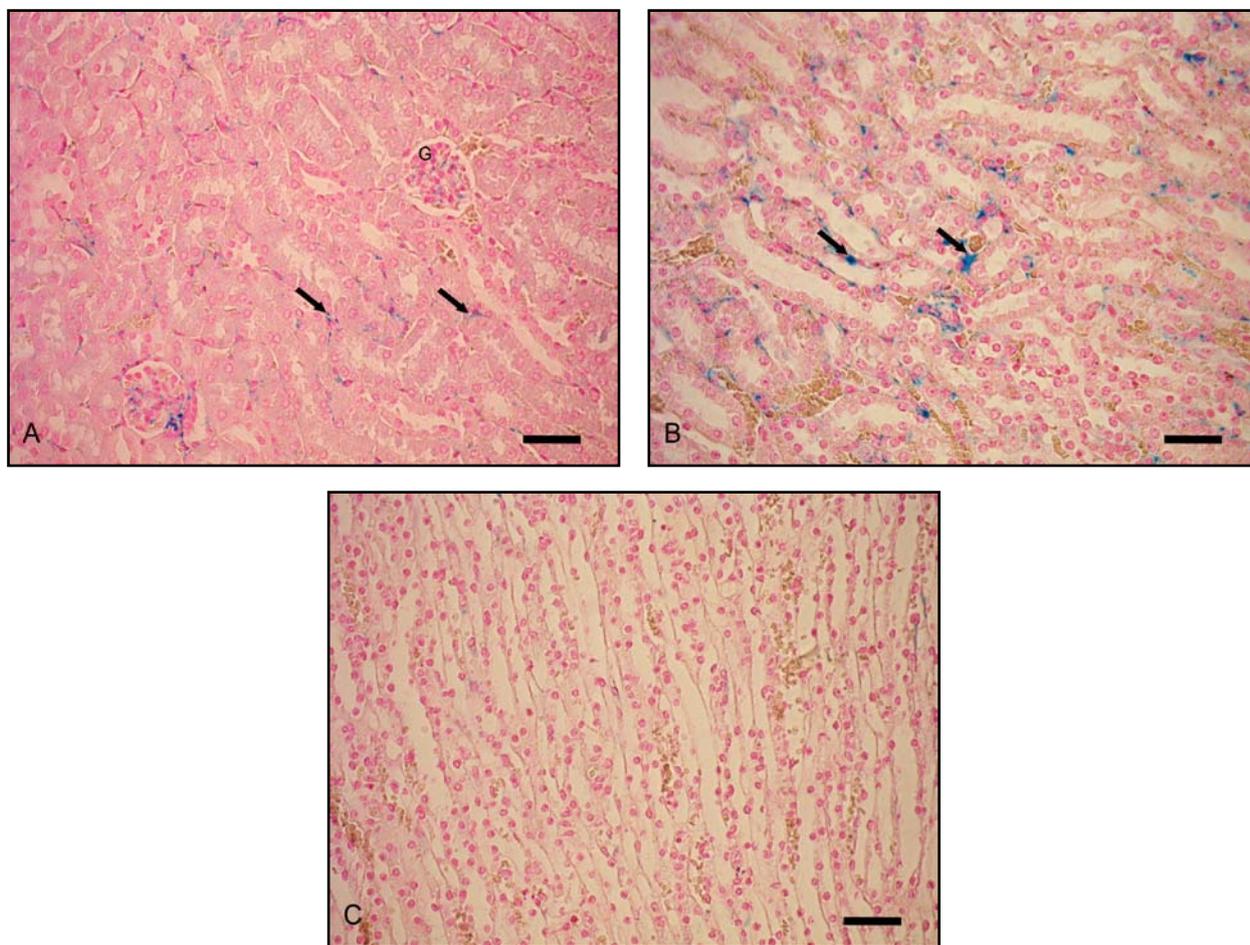


Figura 122. Tinción de Perl's en Tejido Renal de Ratones con Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Corteza (A): se muestran pigmentos de Fe en el tejido conectivo (flecha) (día 20). Médula externa (B) se muestran abundantes depósitos de Fe en el tejido conectivo inter-tubular (flecha) (día 20). Médula interna (C): no se observa Fe. G: glomérulo. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

MODELO DE ACOPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA

En el estudio del compromiso del tejido renal hemos obtenido resultados muy alentadores destacando la importancia de la fisiología renal en el balance del Fe. En este sentido, evidenciamos marcada actividad del riñón en la compensación de la anemia mediante la captación renal de Fe desde el ultrafiltrado glomerular.

A partir de los resultados previos nos propusimos avanzar en el estudio del compromiso renal, abordando estudios sobre la identificación renal y la regulación de la expresión de proteínas del metabolismo del Fe en un estado en un estado con alta demanda de Fe y exceso del metal.

TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

A fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en el modelo de Acople de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia Aguda, se mencionarán nuevamente los resultados obtenidos cuando se estudiaron ambas condiciones en forma independiente.

Como se describió en el Capítulo I, en los animales Anémicos la crisis hemolítica fue evidente los días 23 y 24, evidenciada por bajos valores de Hb y HCT. En esta etapa del protocolo experimental la médula renal externa no mostró cambios en la expresión de DMT1 respecto al tejido de animales sin tratar, mientras que en la médula interna se observó expresión de DMT1 principalmente en los túbulos de mayor diámetro. Es importante mencionar que los principales cambios en la expresión de DMT1 en tejido de animales Anémicos respecto al tejido de animales sin tratar se vieron en la corteza renal, donde se observó marcada expresión de DMT1 en túbulos cuya morfología sugiere que podrían ser túbulos proximales, principalmente en el segmento S2.

En el modelo de Sobrecarga de Fe se vio localización intracelular de DMT1 con distribución homogénea en la mayoría de los túbulos de la corteza y medula renal externa e interna (Capítulo II).

Luego desarrollamos el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, en el que la crisis hemolítica se evidenció entre los días 23 y 25, cuando los valores de Hb y HCT mostraron un marcado descenso. En este modelo se estudió la expresión renal de DMT1 durante la anemia aguda para comparar y contrastar los resultados hallados con los resultados obtenidos en animales con Anemia sin Sobrecarga de Fe.

El estudio de la expresión renal de DMT1 en el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia, mostró expresión de DMT1 intracelular y asociada a la membrana apical en túbulos de la corteza renal. En este sentido fue posible evidenciar mayor inmunomarcación en túbulos con morfología de túbulos proximales. A partir de estos resultados se intentó identificar con precisión la distribución de DMT1 en los diferentes segmentos del túbulo proximal mediante la observación de las características del epitelio tubular. Pudimos identificar marcada expresión de DMT1 en el segmento S2 y S3 del túbulo proximal, con moderada inmunoreactividad en el segmento S1. Los glomérulos y vasos sanguíneos no expresaron el transportador DMT1 (Figura 123).

Luego se estudió el patrón de expresión de DMT1 en la médula renal de animales con Sobrecarga de Fe seguida Anemia, durante la etapa de instauración de la anemia. El transportador DMT1 mostró expresión intracelular, con distribución homogénea en la mayoría de los túbulos de la médula renal externa e interna (Figura 124).

Es importante mencionar que los resultados hallados en corteza y médula renal en la crisis hemolítica (día 25) en animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, muestran un patrón de expresión de DMT1 similar al observado los días de severa hemolisis en animales Anémicos sin Sobrecarga de Fe. Además, en ambas condiciones pudo observarse localización intracitoplasmática de DMT1, cercana a la membrana apical.

Por otro lado, ya que anteriormente habíamos identificado al transportador DMT1 en riñón de animales con Sobrecarga de Fe (sin Anemia) hasta el día 20 del protocolo experimental, finalizamos este estudio determinando la expresión renal de DMT1 en tejido de animales con Sobrecarga de Fe entre los días 20 y 30.

Pudimos ver que los últimos días de Sobrecarga de Fe, la corteza renal mostró expresión intracitoplasmática de DMT1 con distribución homogénea en la mayoría de los túbulos renales, sin evidenciarse cambios con respecto a lo observado en días anteriores del protocolo experimental (Figura 125). Por otro lado, la médula renal

externa e interna de animales con Sobrecarga de Fe mostró expresión intracelular de DMT1 en la mayoría de los túbulos renales, sin observarse predominio de inmunomarcación en ninguna zona tubular renal. Estos resultados no muestran diferencias respecto a lo hallado en tejido de animales con Sobrecarga de Fe entre los días 0 y 20 del protocolo experimental (Figura 126).

Finalmente realizamos la identificación de DMT1 en riñón de animales con Anemia sin sobrecarga de Fe durante los últimos días del protocolo experimental, cuando los parámetros hematológicos indicaron la recuperación de la anemia.

El análisis de la corteza renal mostró presencia del transportador DMT1 en estructuras con morfología de túbulos proximales, donde la localización de DMT1 fue intracelular cercana a la membrana apical. Cuando se determinó la expresión de DMT1 en los distintos segmentos del túbulo proximal se vio mayor inmunoreactividad en el segmento S2 y S3, con moderada inmunomarcación en el segmento S1. Otras estructuras corticales como glomérulos y vasos sanguíneos no expresaron DMT1 (Figura 127).

La médula renal, externa e interna, mostró expresión intracitoplasmática de DMT1 evidenciándose distribución homogénea en la mayoría de los túbulos renales (Figura 128).

Estos resultados muestran que el patrón de distribución cortical de DMT1 en animales Anémicos con Sobrecarga de Fe fue similar los días de severa hemólisis (día 23) y en la etapa de recuperación de la anemia (día 28). Sin embargo, pudieron observarse diferencias en la intensidad de la inmunomarcación. En este sentido, durante la crisis hemolítica se vio marcada inmunoreactividad en el segmento S2 de túbulo proximal a diferencia de lo observado en la etapa de recuperación de la anemia, donde la inmunomarcación fue moderada, similar a la observada en tejido de animales sin tratar.

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 129).

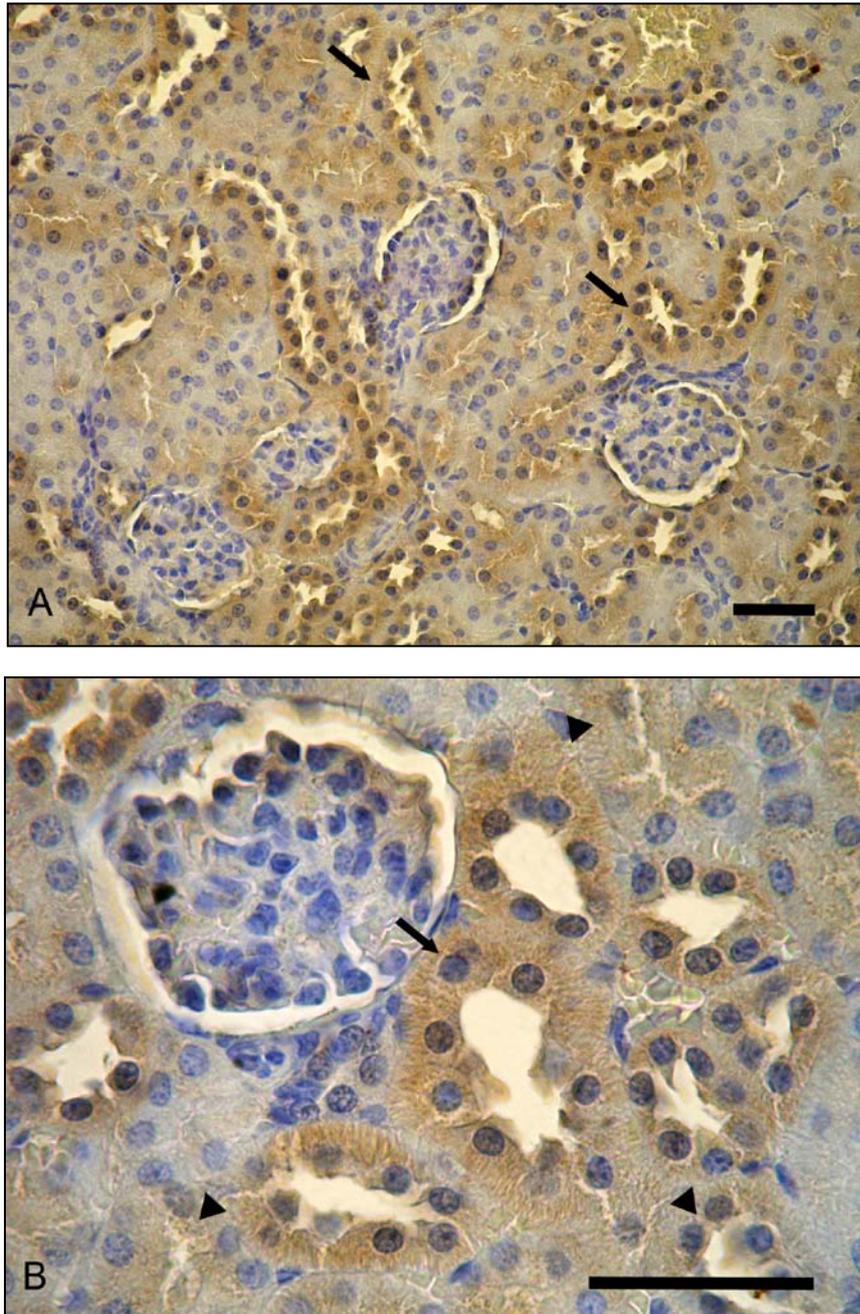


Figura 123. Expresión Cortical Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en túbulos con morfología de Túbulos Proximales con localización intracelular (flecha) y apical (cabeza de flecha) (día 25). X 400 (A), X 1000 (B). Escala: 30 μ m.

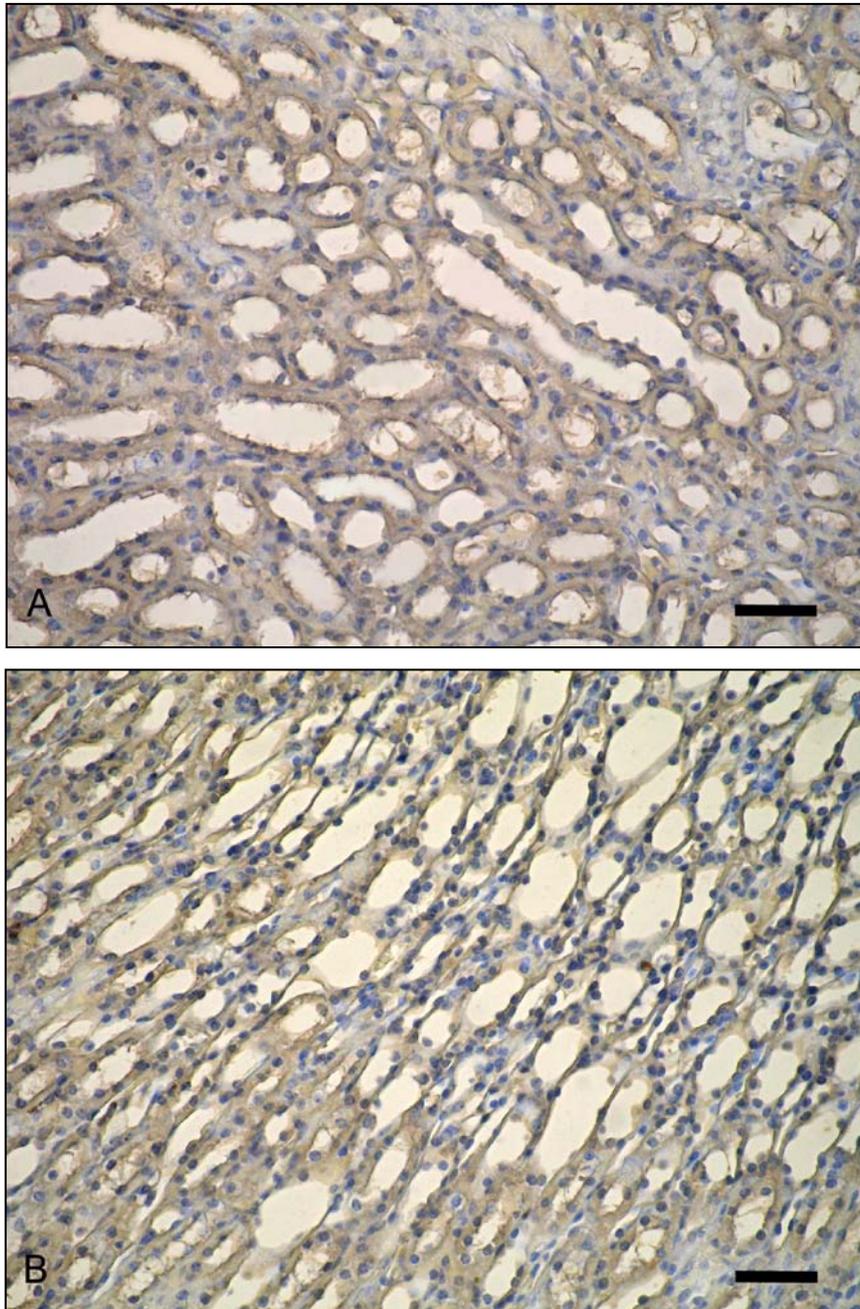


Figura 124. Expresión Medular Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en Médula Externa (A) y Médula Interna (B) (día 25). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m.

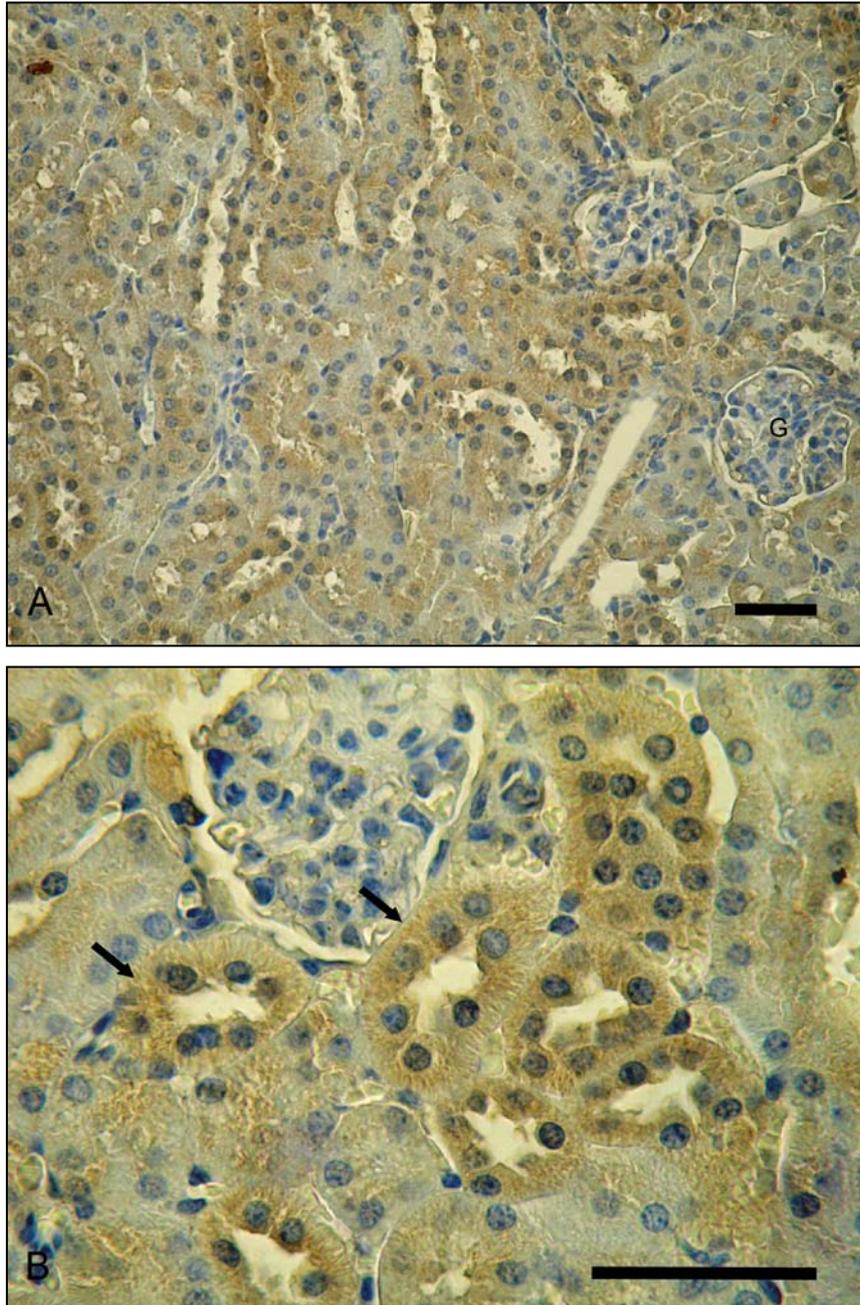


Figura 125. Expresión Cortical Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 con distribución homogénea en túbulos renales y localización intracelular (flecha) (día 28). X 400 (A), X 1000 (B). G: glomérulo. Escala: 30 μ m.

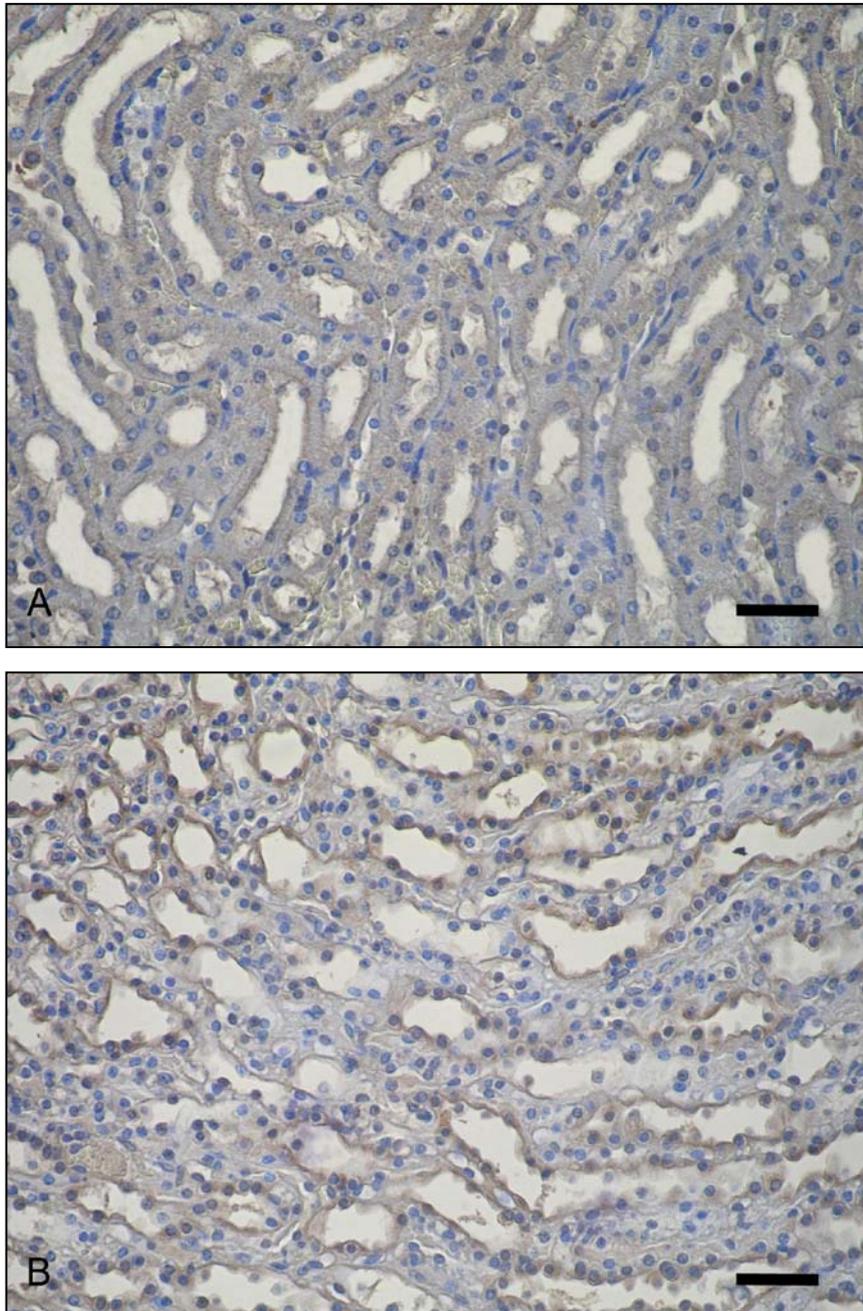


Figura 126. Expresión Medular Renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en Médula Externa (A) y Médula Interna (B) (día 28). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

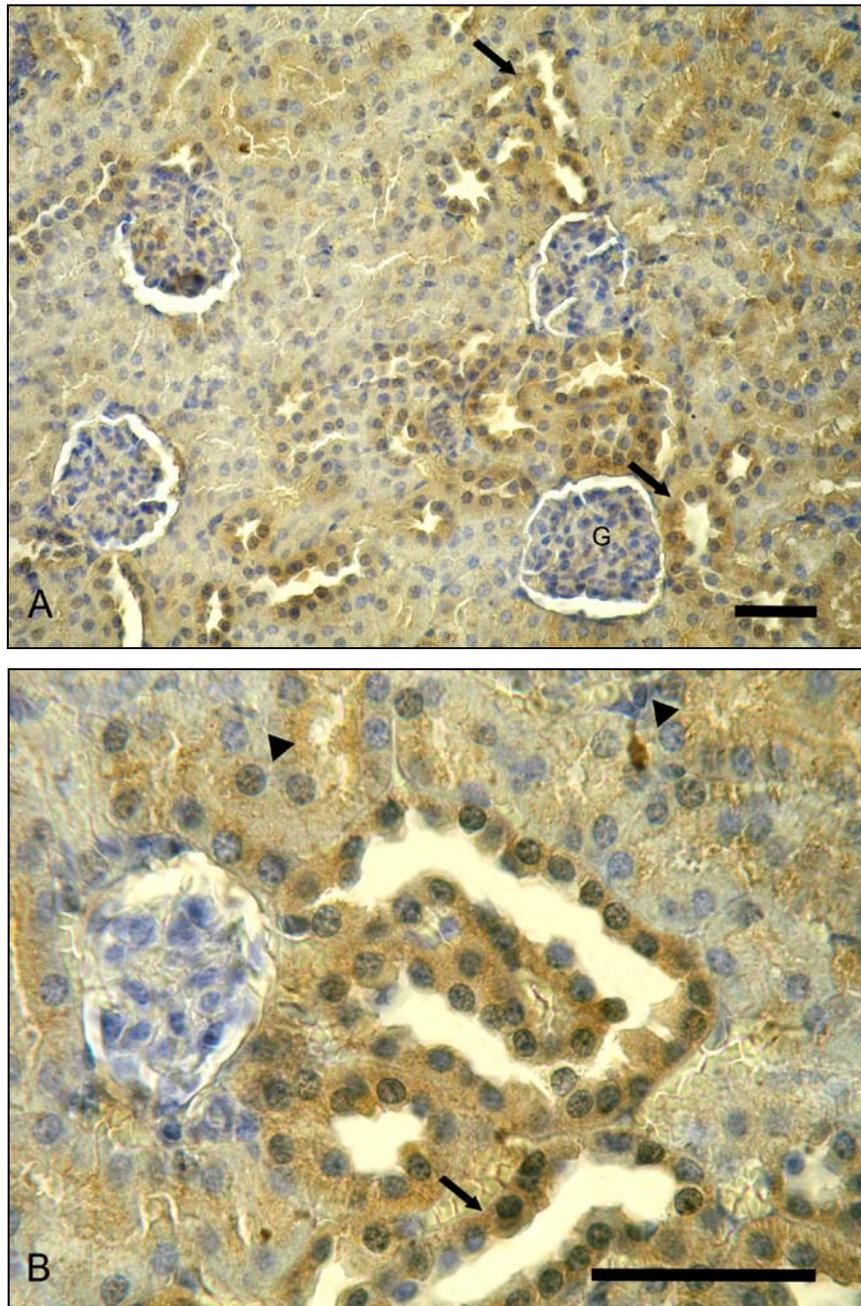


Figura 127. Expresión Cortical renal de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de DMT1 en túbulos con morfología de Túbulos proximales, con localización intracelular (flecha) y asociado a la membrana apical (cabeza de flecha) (día 28). X 400 (A), X 1000 (B). G: glomérulo. Escala: 30 μ m.

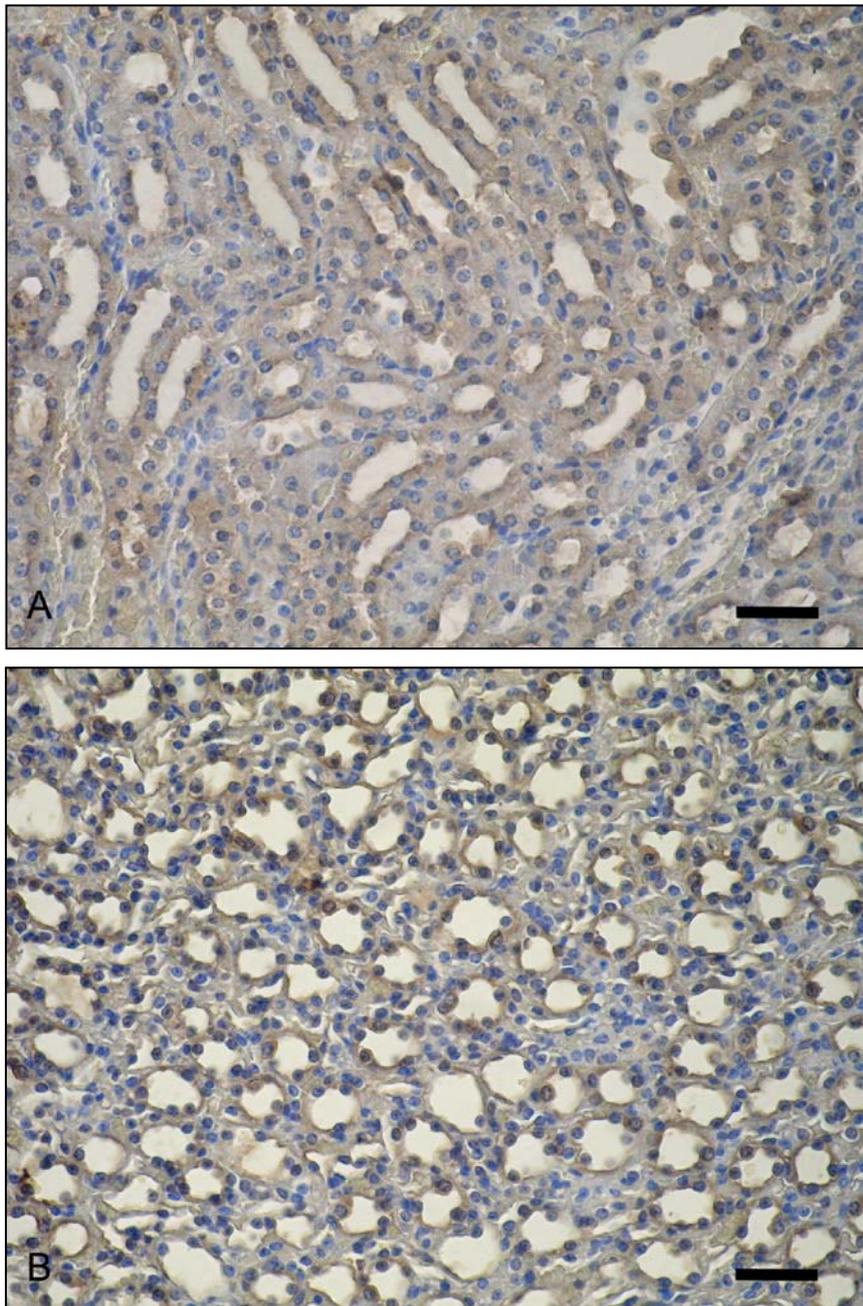


Figura 128. Expresión Medular Renal de DMT1 en Anemia sin Sobrecarga de Fe. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en Médula Externa (A) y Médula Interna (B) (día 28). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

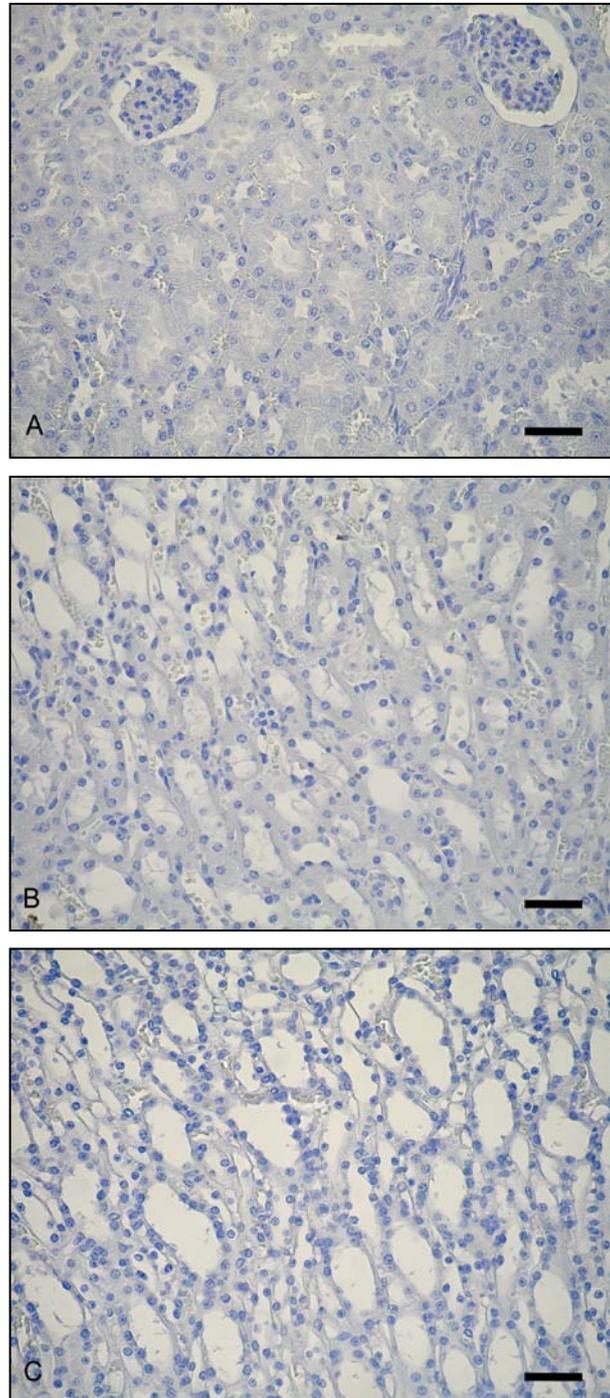


Figura 129. Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

PROHEPCIDINA

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, se describirán nuevamente los resultados hallados en el modelo de Anemia y de Sobrecarga de Fe por separado.

Los animales Anémicos mostraron marcada expresión cortical de Prohepcidina los días de severa hemólisis (día 23), principalmente en el segmento S2 de túbulos con morfología de túbulos proximales, con localización intracelular y cercana a la cara basolateral. Por otro lado, la médula interna mostró marcada expresión intracelular de Prohepcidina en la mayoría de los túbulos renales, mientras que la médula externa mostró expresión moderada de la proteína.

La corteza de animales con Sobrecarga de Fe (sin Anemia) mostró marcada expresión de Prohepcidina en túbulos con morfología de túbulo proximal, principalmente en el segmento S2, presentando localización intracelular cercana a la membrana basal. Los cambios más evidentes se evidenciaron en esta zona tubular, ya que en Sobrecarga de Fe se vio mayor intensidad de expresión de Prohepcidina respecto al tejido de animales sin tratar. La médula renal interna y externa mostró expresión intracelular de Prohepcidina con distribución homogénea en los túbulos renales.

Cuando estudiamos la corteza renal de animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia durante los días de severa hemólisis, vimos expresión de Prohepcidina intracelular muy cercana a la membrana basal, localizada principalmente en túbulos con morfología de túbulo proximal (Figura 130).

Una vez identificada Prohepcidina en la zona cortical, se intentó identificar la proteína en los segmentos de túbulo proximal renal. Pudimos evidenciar marcada inmunoreactividad en el segmento S2 del túbulo proximal, menor expresión de Prohepcidina en el segmento S1 y ausencia de la proteína en el segmento S3 (Figura 130).

Finalmente estudiamos la expresión de Prohepcidina en médula renal externa e interna de animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia los días de severa hemólisis. Pudimos observar expresión intracelular de Prohepcidina, con distribución homogénea en la mayoría de los túbulos renales (Figura 131).

De nuestros resultados se desprende que durante la crisis hemolítica, la expresión renal de Prohepcidina en tejido de animales con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia

mostró gran similitud con el patrón de expresión de la proteína en riñón de Animales con Sobrecarga de Fe (sin Anemia), a nivel cortical y medular.

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 132).

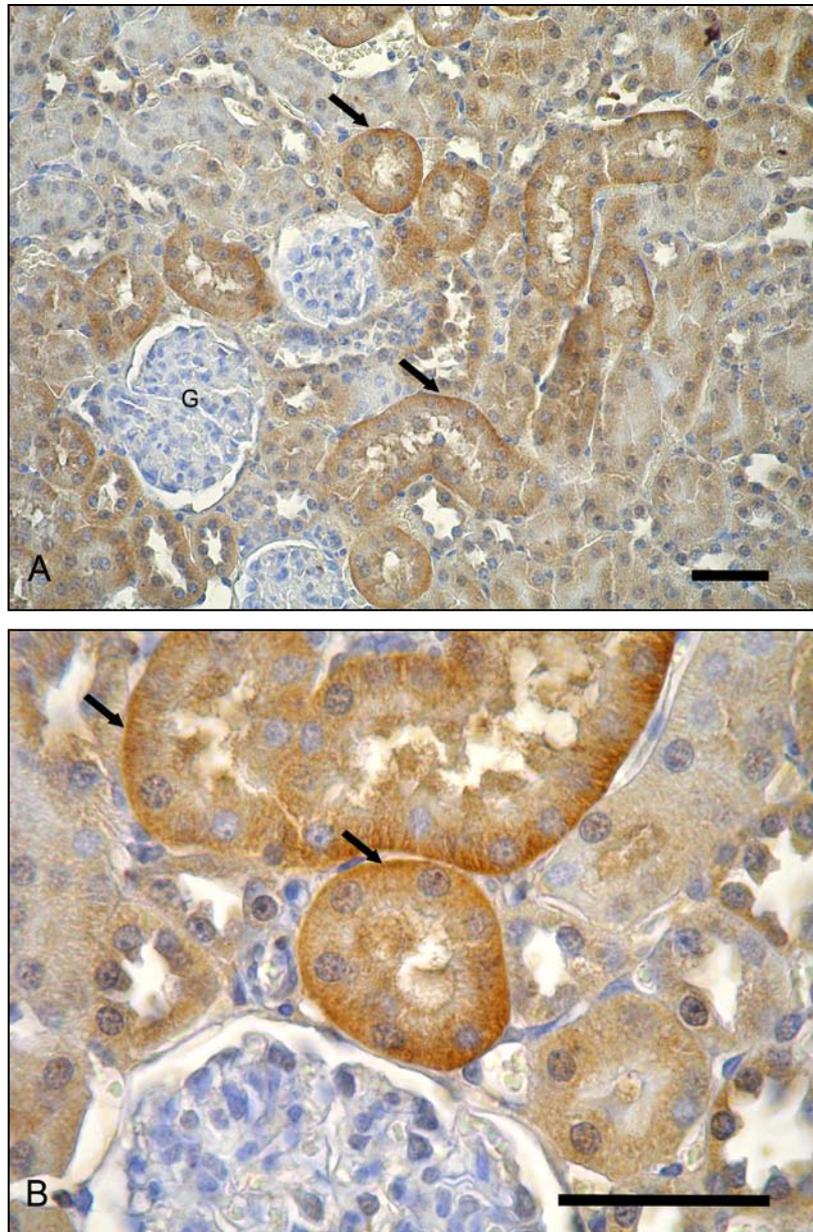


Figura 130. Expresión Cortical Renal de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina y el kit EnVision+System-HRP (DAB) según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra intensa expresión de Prohepcidina con localización intracelular y asociada a la membrana basolateral (fecha) (día 25). X 400 (A), X 1000 (B) Escala: 30 μ m.

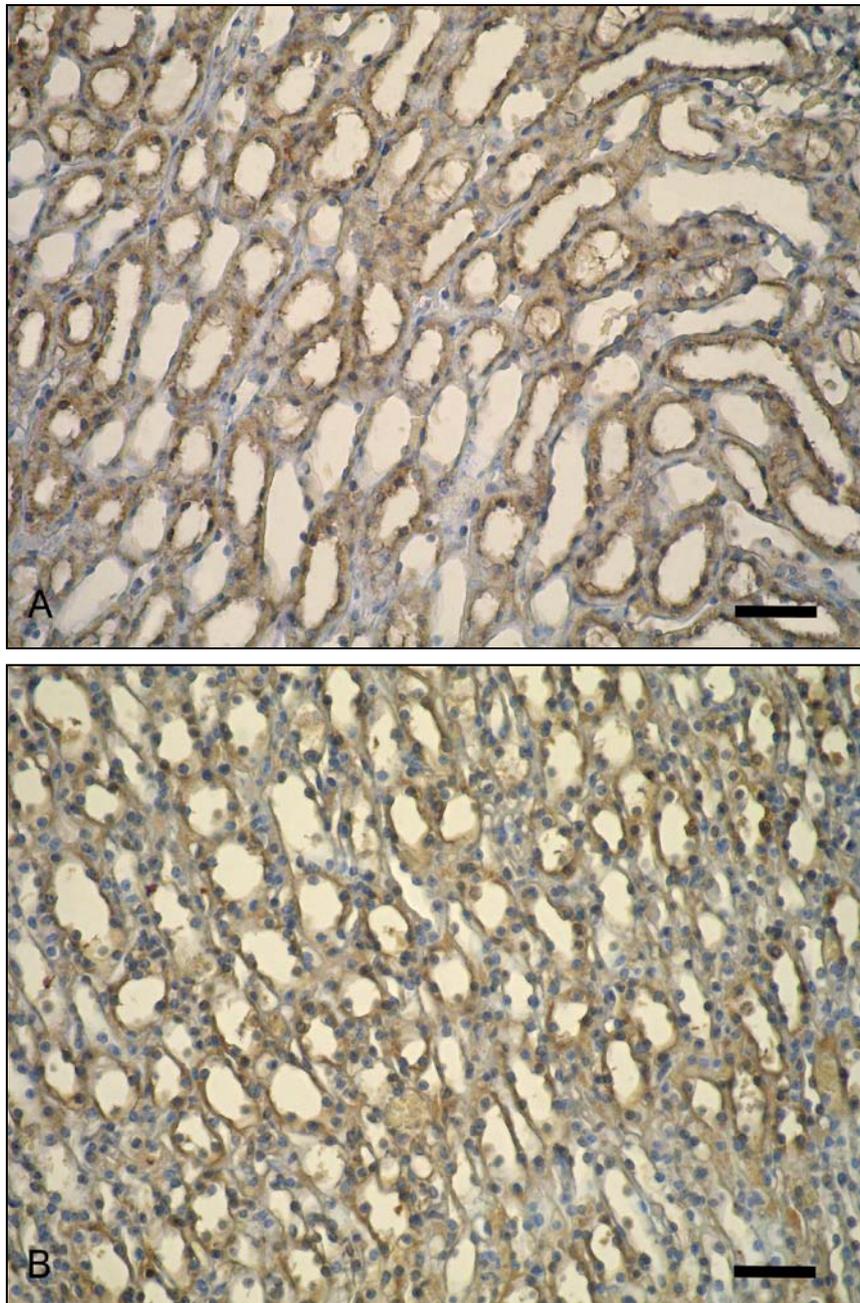


Figura 131. Expresión Medular Renal de Prohepcidina en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de Prohepcidina en Médula Externa (A) y Médula Interna (B) (día 25). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

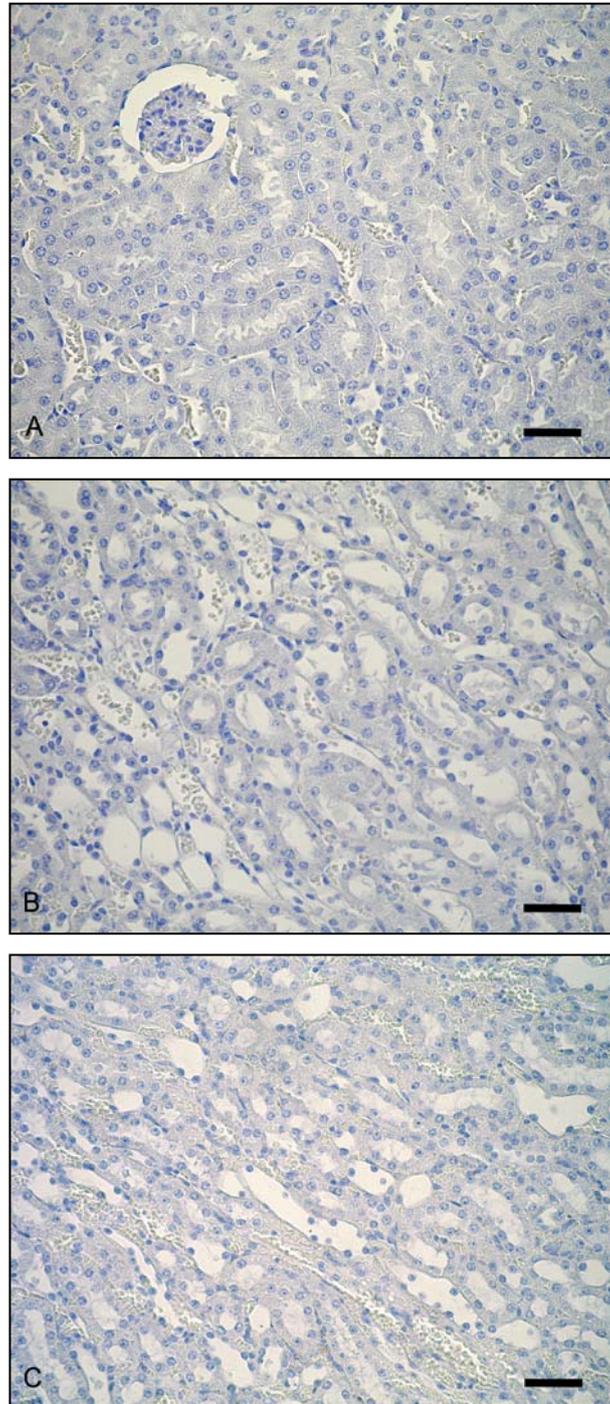


Figura 132. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal. Ratones hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con el kit EnVision+System-HRP (DAB). Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

HIERRO TISULAR

El estudio del Fe^{3+} en riñón en animales anémicos sólo evidenció pigmentos de Fe^{3+} en la corteza renal, localizado en el interior de los túbulos renales con morfología de túbulo proximal, principalmente en el segmento S2 del túbulo proximal.

Por otro lado, el tejido de animales con Sobrecarga de Fe mostró Fe hemosiderina localizado selectivamente en el tejido conectivo inter-tubular, evidenciándose principalmente en la médula renal externa y en la corteza renal.

Cuando realizamos la valoración del Fe^{3+} en riñón de ratones con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, pudimos observar abundantes pigmentos de Fe^{3+} , localizado específicamente en el tejido conectivo inter-tubular (Figura 133).

Una vez identificado el metal, realizamos un estudio más detallado para identificar las zonas renales que mostraron Fe. Pudimos identificar abundantes depósitos de Fe^{3+} en la médula renal externa, evidenciándose en menor cantidad en la corteza, sin poder identificarse Fe en la médula renal interna (Figura 133)

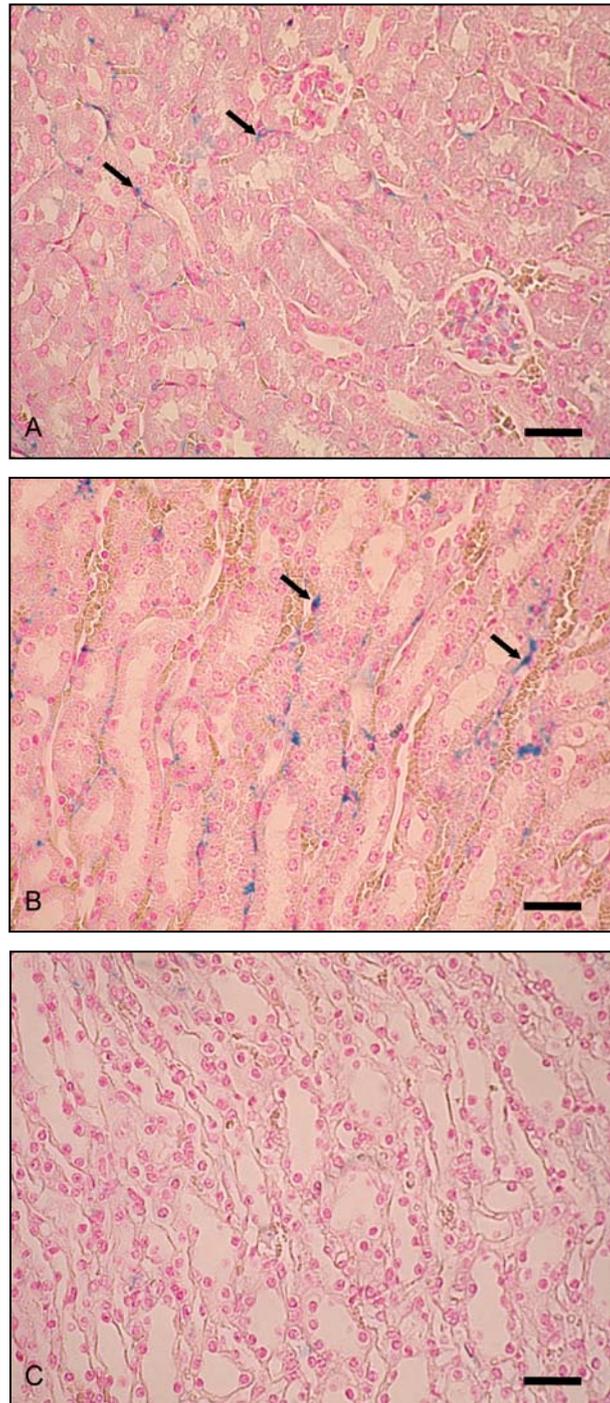


Figura 133. Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratonés con Sobrecarga de Fe seguida de Anemia. Ratonés hembras se trataron con Fe-Dextrán y FHZ. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Pigmentos de Fe en el tejido conectivo de corteza (A) y Médula externa (B) (flecha). No se observan Fe en la Médula Interna (C). X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

RATAS BELGRADE

Las ratas Belgrade resultan un interesante modelo animal para el estudio del Metabolismo del Fe, ya que poseen una mutación en el transportador de Metales Divalentes 1. El fenotipo asociado a esta mutación es una anemia microcítica e hipocrómica con elevados niveles de Fe sérico, que se hereda como un carácter autosómico recesivo. Los animales homocigotas para la mutación presentan alteraciones en la captación de Fe gastrointestinal como así también en el transporte de Fe desde endosomas al interior celular.

Los valores de HCT pertenecientes a las ratas Belgrade utilizadas fueron determinados con anterioridad por personal de Harvard School of Public Health. El HCT de ratas heterocigotas fue de: $41,71 \pm 0,85$ %, mientras que las homocigotas presentaron valores de $32,04 \pm 0,92$ %.

TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

Aunque es conocida la mutación que poseen las ratas Belgrade en el Transportador de Metales Divalentes 1, antes de comenzar nuestros estudios en este modelo animal se estudió la expresión de la proteína en riñón mediante una técnica inmunohistoquímica.

El análisis de la corteza renal de las ratas Belgrade heterocigotas (b/+) mostró expresión de DMT1. En este sentido es importante mencionar que aunque la proteína fue detectada en el riñón, muy pocos túbulos corticales mostraron inmunomarcación, siendo moderada la intensidad de expresión de DMT1 y localizándose intracelularmente. Debido al epitelio bajo, la gran luz tubular y la cercanía con los glomérulos, podría inferirse que las estructuras tubulares que expresan DMT1 serían túbulos distales (Figura 134). Sin embargo, la expresión de DMT1 parecería no estar delimitada exclusivamente a un segmento tubular específico, ya que también se detectó expresión de DMT1 en túbulos con morfología de túbulo proximal.

Cuando se estudió la corteza renal de ratas Belgrade homocigotas (b/b), también se detectó moderada expresión intracelular de DMT1 en estructuras con morfología de

túbulos distales, evidenciándose una vez más pocas estructuras tubulares con inmunomarcación específica (Figura 134).

Cabe destacar que pese a que ratas b/b son homocigotas para la mutación de DMT1, no se observaron grandes diferencias en la intensidad de expresión de DMT1 entre corteza de ratas heterocigotas y homocigotas.

El estudio de la médula renal externa de ratas Belgrade heterocigotas mostró expresión intracelular de DMT1 en las células tubulares, observándose distribución homogénea del transportador en todos los túbulos de la zona medular externa (Figura 135). Cuando se estudió la zona medular externa de riñón de ratas Belgrade homocigotas, DMT1 mostró un patrón de expresión similar al hallado en ratas heterocigotas, observándose inmunomarcación en la mayoría de los túbulos y con localización intracelular (Figura 135).

El análisis de la médula renal interna de ratas Belgrade heterocigotas mostró moderada expresión intracelular de DMT1 en estructuras tubulares. En este sentido es importante mencionar que la moderada expresión de la proteína se debe no sólo a la intensidad de la inmunoreactividad sino también a que pocos túbulos medulares mostraron inmunomarcación específica (Figura 136). Finalmente, cuando se estudió el tejido medular interno de ratas homocigotas, DMT1 mostró un patrón de expresión similar al hallado en ratas heterocigotas, sin detectarse cambios en la intensidad de expresión de la proteína (Figura 136)

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 137).

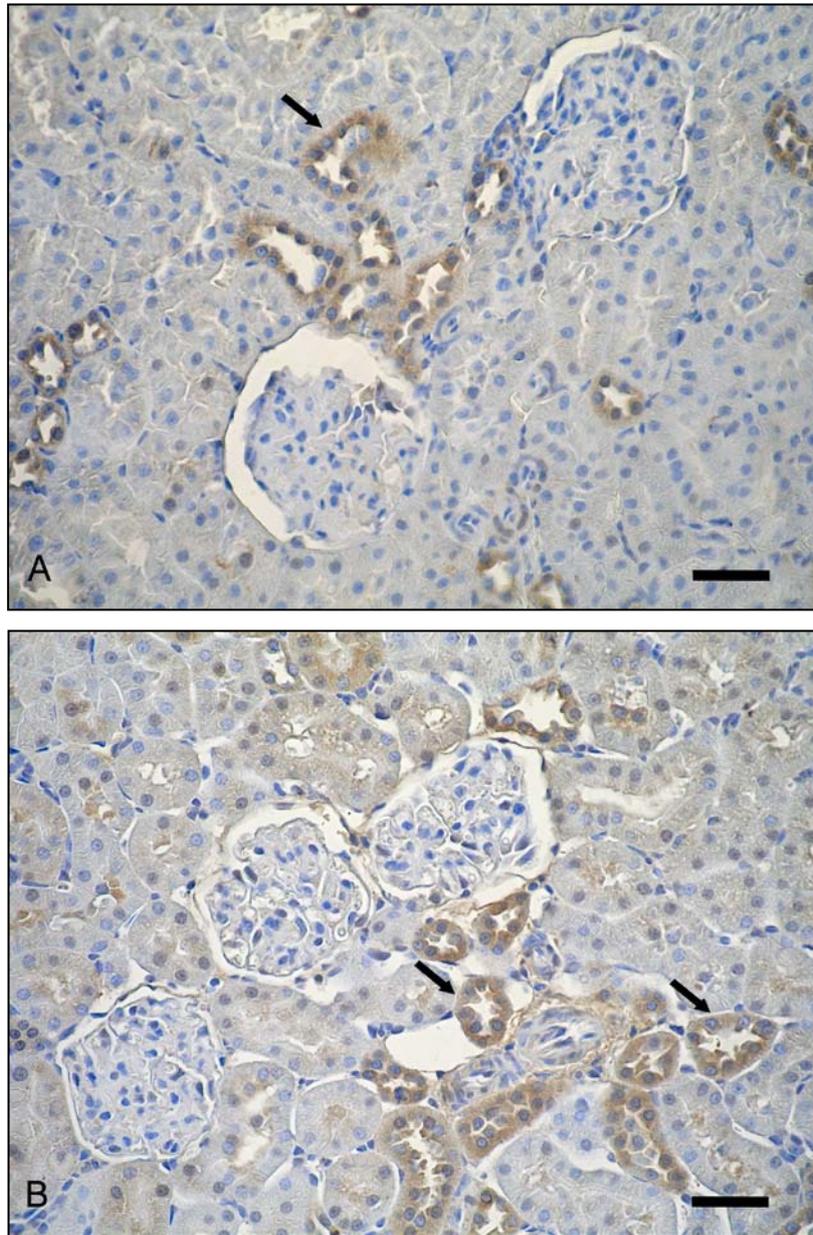


Figura 134. Expresión de DMT1 en Corteza Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-DMT1 y anticuerpo secundario-HRP según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en algunos túbulos con morfología de Túbulo Distal de ratas Heterocigotas (A) y Homocigotas (B) (flecha). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

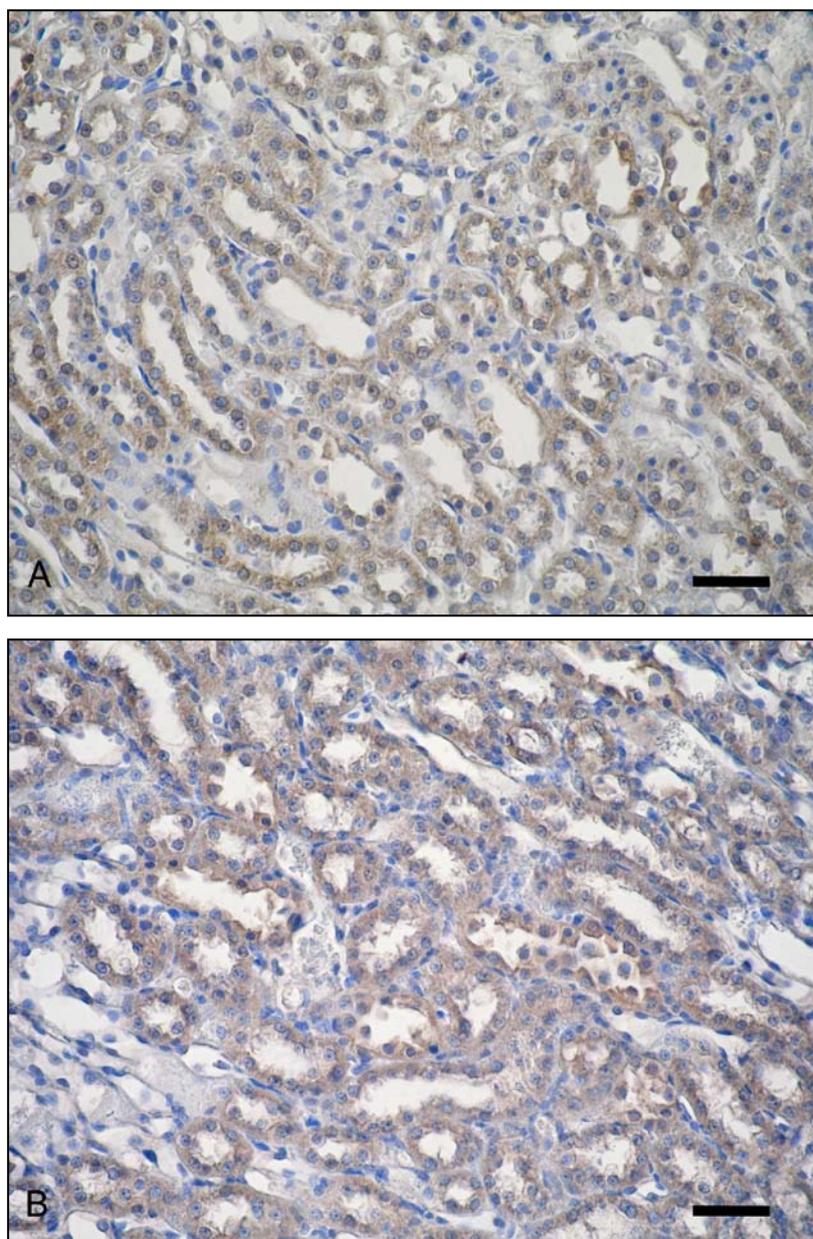


Figura 135. Expresión de DMT1 en Médula Externa de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1, con distribución homogénea en médula externa de ratas Heterocigotas (A) y Homocigotas (B) (flecha). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

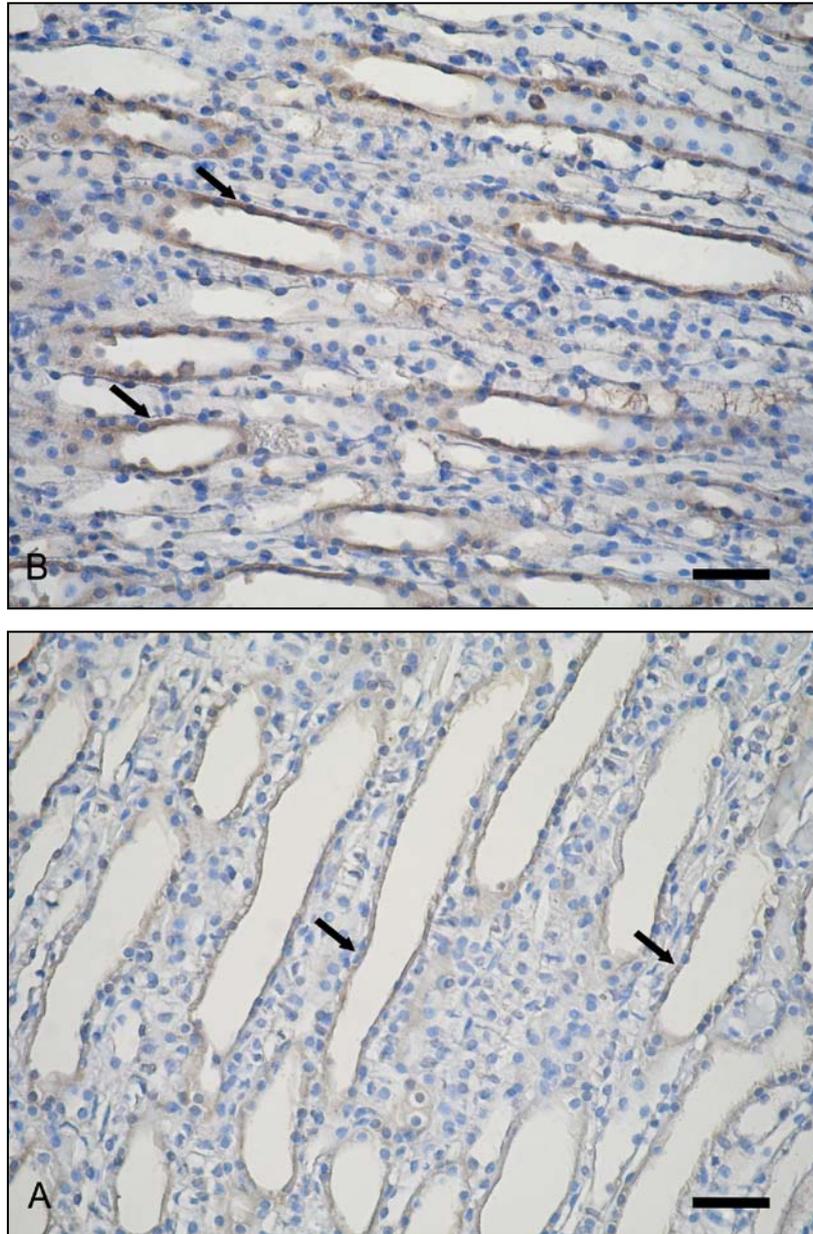


Figura 136. Expresión de DMT1 en Médula Interna de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de DMT1 en algunas estructuras tubulares de la médula interna de ratas Heterocigotas (A) y Homocigotas (B) (flecha). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

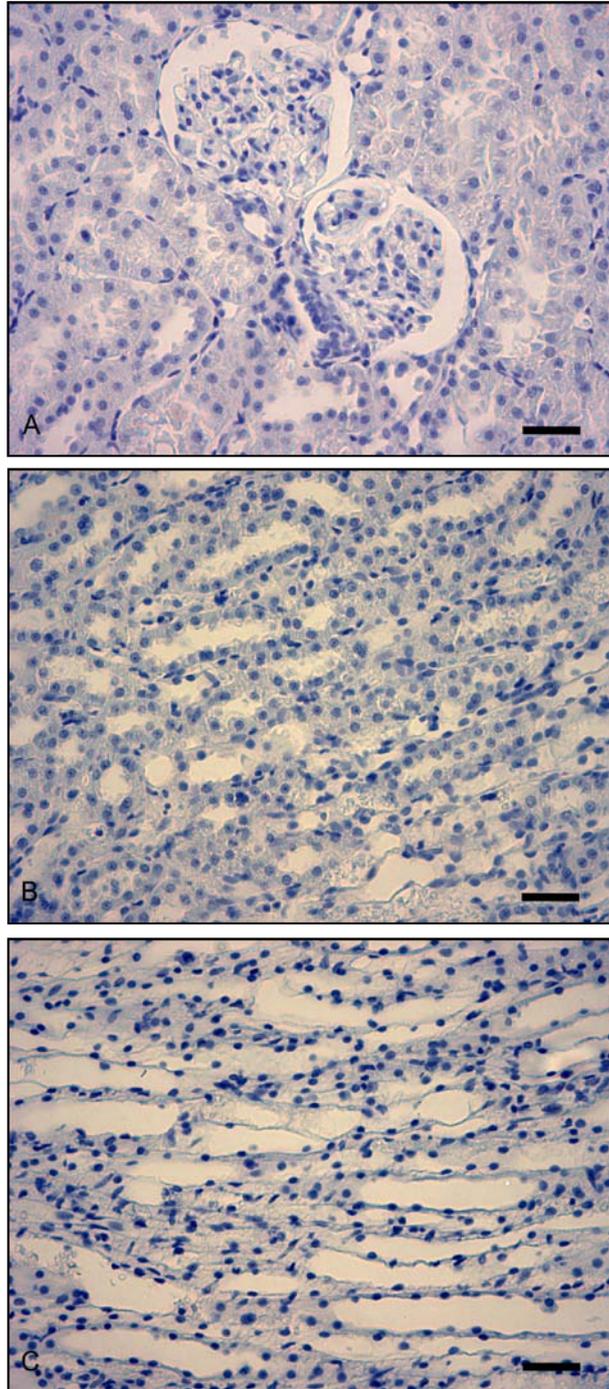


Figura 137. Control Negativo para DMT1 en Tejido Renal de Ratas Belgrade. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con anticuerpo secundario-HRP. Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

PROHEPCIDINA

El estudio del compromiso del riñón en la homeostasis del Fe ha adquirido relevancia en los últimos años. En este sentido, nuestros resultados previos sobre la síntesis renal de Prohepcidina en ratones sin tratar y con desbalance del Fe es de gran relevancia. Dado que hemos evidenciado el compromiso renal en el balance del Fe y ya que no ha sido reportada la síntesis extrahepática de hepcidina en ratas Belgrade, nos pareció interesante determinar la expresión renal de Prohepcidina en ratas Belgrade, debido a la alteración que poseen en la ruta del Fe.

El tejido cortical renal de ratas Belgrade heterocigotas (b/+) mostró expresión intracelular de Prohepcidina en túbulos con epitelio característico y gran luz tubular, cuya morfología y cercanía con los glomérulos sugiere que podrían ser túbulos distales. Por el contrario, los túbulos proximales y otras estructuras corticales como glomérulos y vasos sanguíneos no expresaron la proteína (Figura 138).

La corteza renal de ratas Belgrade homocigotas (b/b) mostró un patrón de expresión de Prohepcidina similar al hallado en tejido de ratas heterocigotas, hallándose la proteína en túbulos con morfología de túbulo distal, con localización intracelular (Figura 138).

La médula externa de Belgrade heterocigotas mostró moderada expresión de Prohepcidina, con distribución homogénea y localización intracelular en la mayoría de los túbulos (Figura 139). Si bien en este caso no se pudo identificar con precisión los túbulos de la médula externa que expresaron Prohepcidina, se podría inferir que la proteína estaría en túbulos colectores y segmentos fino y ascendente grueso del Asa de Henle, por ser abundantes en esta zona renal.

El análisis de la médula externa de ratas Belgrade homocigotas evidenció expresión de Prohepcidina, aunque no se detectaron diferencias en la intensidad de la inmunomarcación y en el patrón de distribución de la proteína con respecto al tejido renal de ratas heterocigotas (Figura 139).

Cuando se estudió la médula interna renal de ratas Belgrade heterocigotas también se vio expresión de Prohepcidina con localización intracelular (Figura 140). En la zona más profunda de la médula interna, Prohepcidina renal fue identificada en túbulos de epitelio cúbico orientados hacia la papila, morfología característica de túbulo colector (Figura 140). En la zona menos profunda de la médula interna, se observó

inmunomarcación en células tubulares epiteliales aplanadas, que podrían identificarse como células de túbulo colector y Asa de Henle fina (Figura 140).

Uno de los resultados más relevantes fue la detección de Prohepcidina en médula renal interna de ratas Belgrade homocigotas. En este caso, el estado anémico que poseen estos animales mostró asociación con una moderada expresión de Prohepcidina con respecto al tejido de Belgrade heterocigotas, manteniéndose la localización intracelular de la proteína (Figura 141).

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 142).

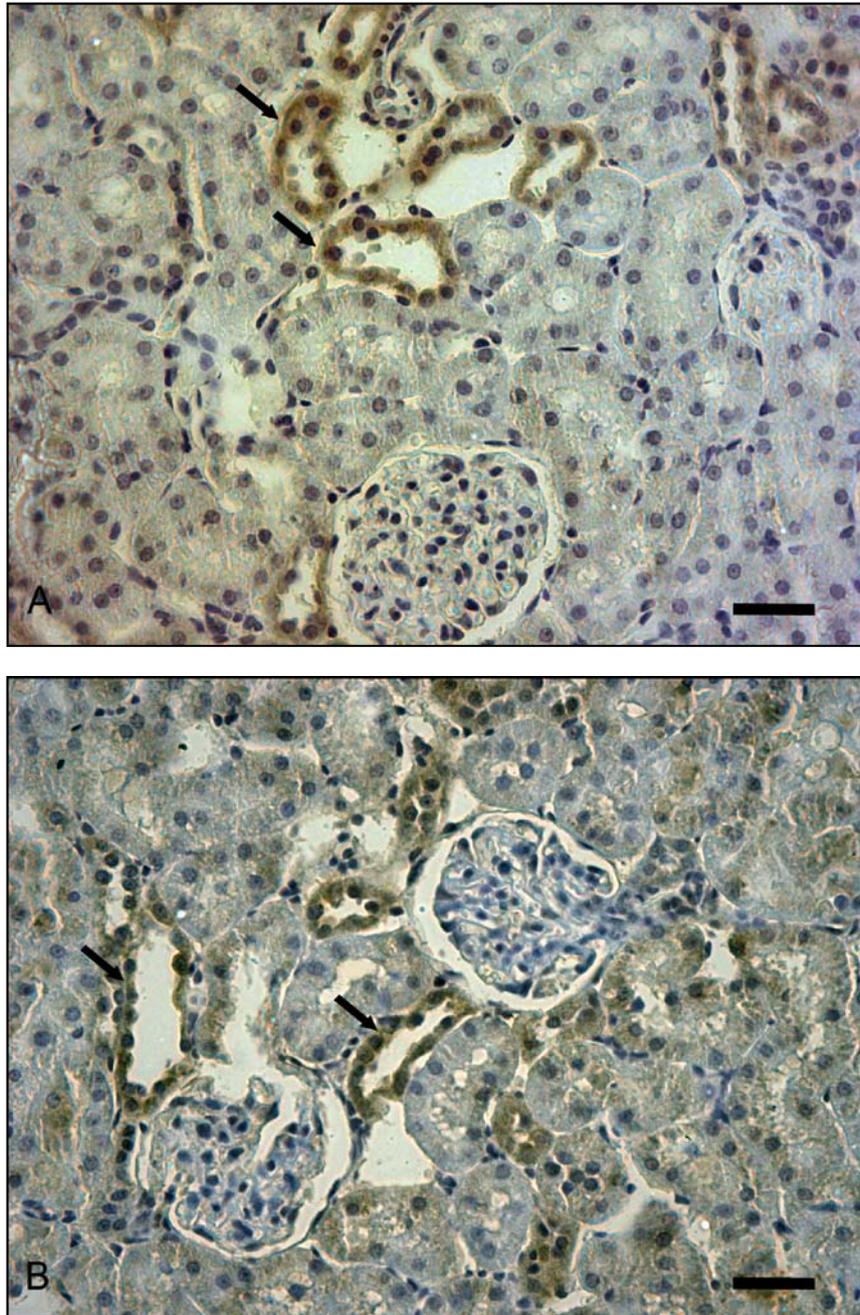


Figura 138. Expresión de Prohepcidina en Corteza Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Prohepcidina y anticuerpo secundario-HRP según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de Prohepcidina en estructuras tubulares con morfología de Túbulo Distal en ratas Heterocigotas (A) y Homocigotas (B) (flecha). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

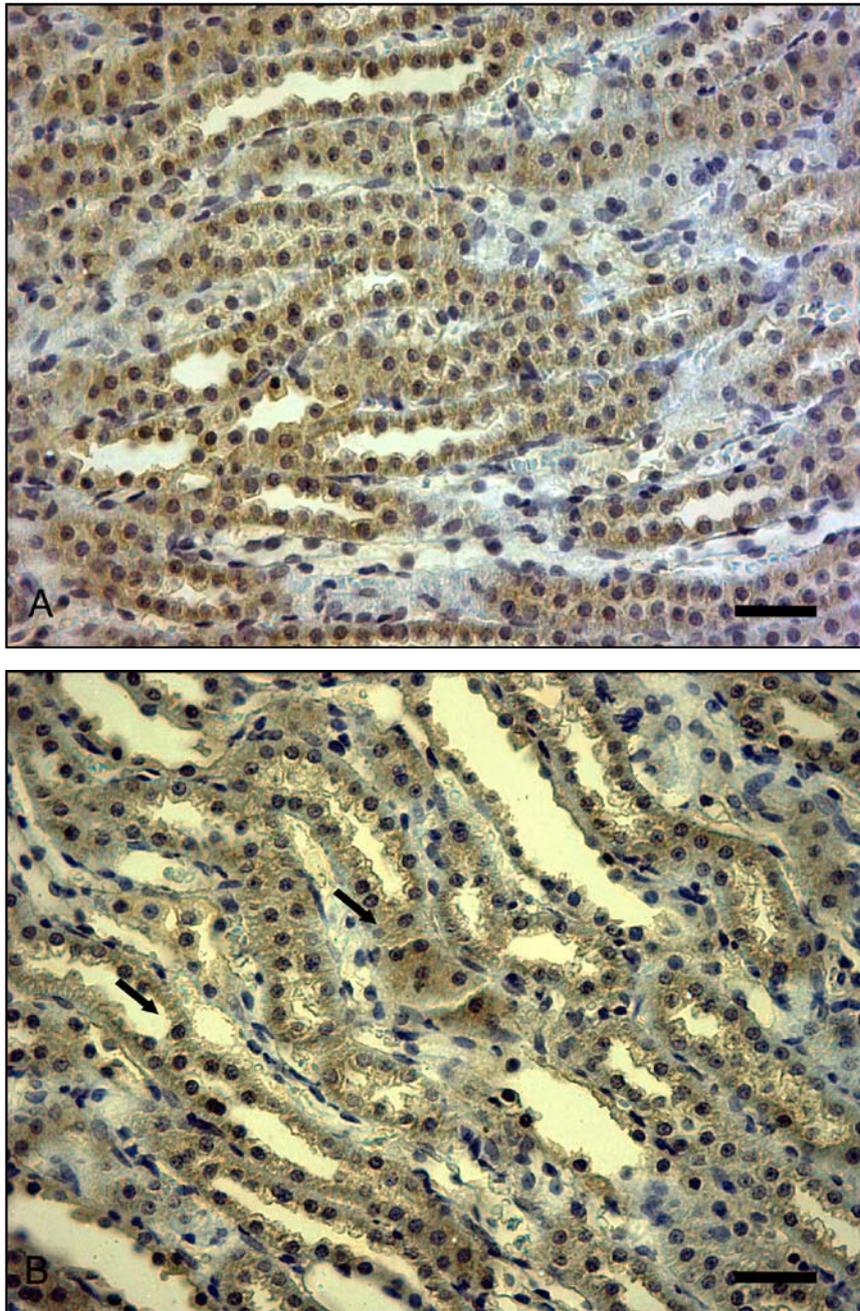


Figura 139. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Externa de Ratas Belgrade Heterocigotas y Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de Prohepcidina con distribución homogénea en los túbulos medulares en ratas Heterocigotas (A) y Homocigotas (B). X 400. Escala: 30 μ m

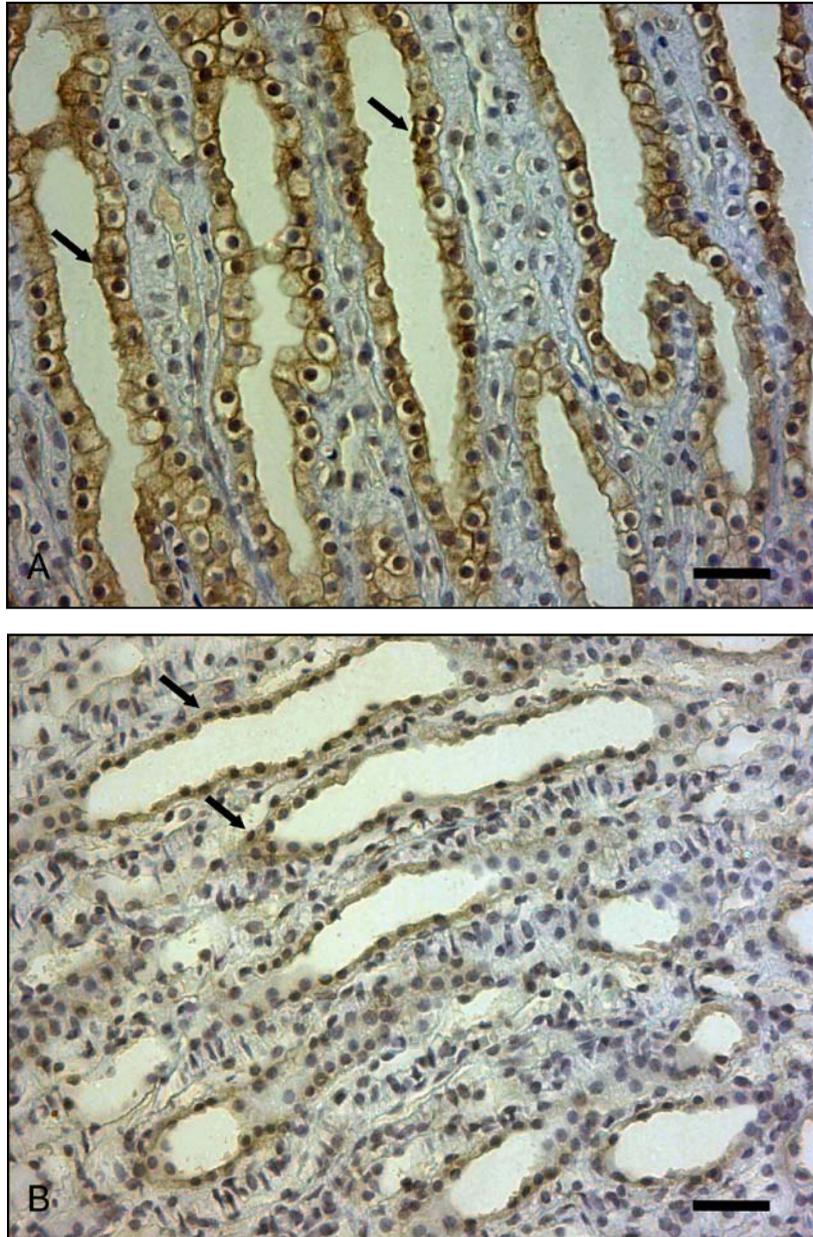


Figura 140. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratas Belgrade Heterocigotas. Un grupo de animales ($n=3$) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión intracelular de Prohepcidina en túbulos con morfología de Túbulos Colectores, en la zona profunda de la médula interna (flecha) (A). Expresión intracelular de Prohepcidina en la zona externa de la médula interna (flecha) (B). X 400 (A, B). Escala: $30\mu\text{m}$

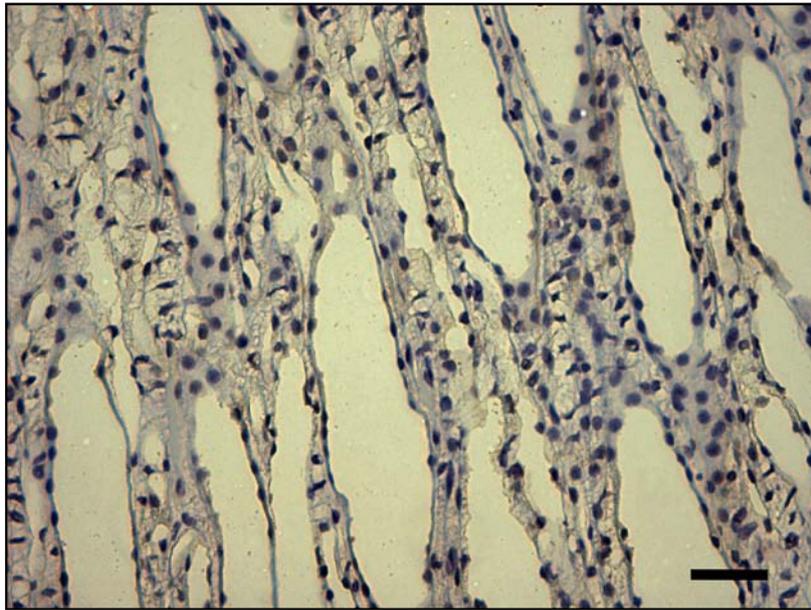


Figura 141. Expresión de Prohepcidina en Médula Renal Interna de Ratas Belgrade Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Moderada expresión intracelular de Prohepcidina. X 400. Escala: 30 μ m

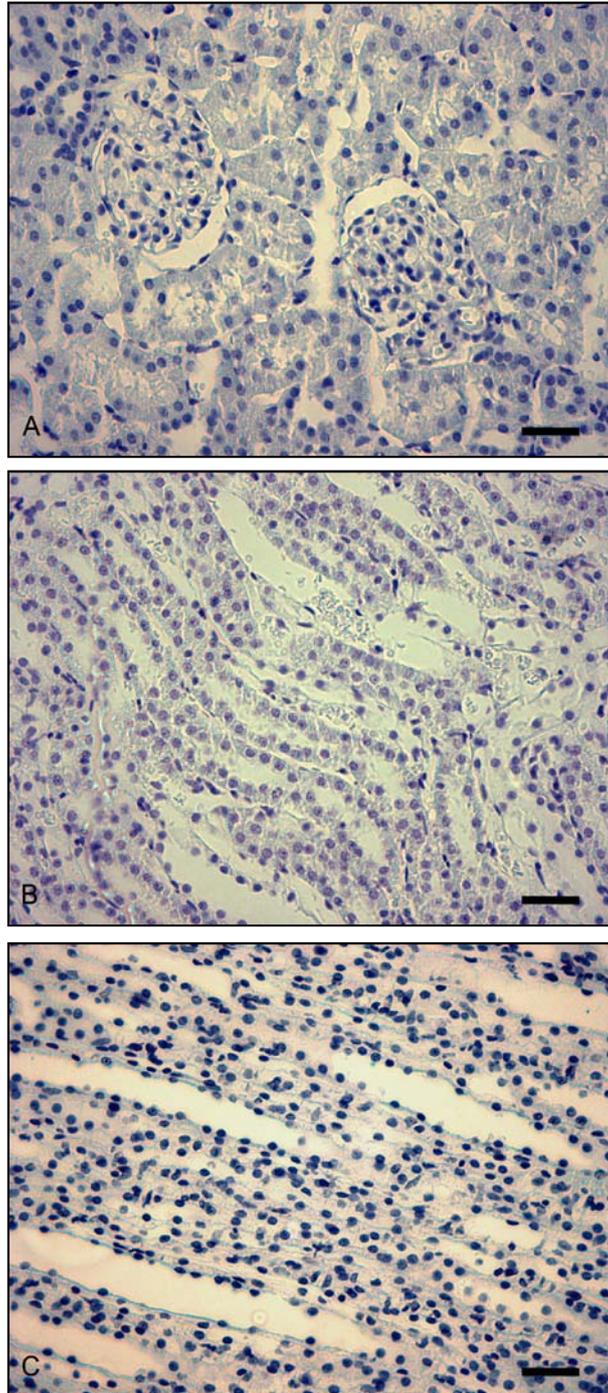


Figura 142. Control Negativo para Prohepcidina en Tejido Renal de Ratas Belgrade. Se utilizaron ratas Belgrade macho. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con anticuerpo secundario-HRP. Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): no se observa marcación inespecífica. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

ERITROPOYETINA TISULAR

Aunque es ampliamente conocido que el riñón es el principal órgano productor de Eritropoyetina, pocos trabajos han podido mostrar el sitio de producción de la hormona mediante técnicas inmunohistoquímicas. Más importante aún es la ausencia de información acerca de la expresión renal de Eritropoyetina en ratas Belgrade, modelo animal con compromiso de la eritropoyesis.

Por este motivo, es que parte de nuestro estudio se centraron en tratar de determinar el patrón de expresión de Epo en riñón de ratas Belgrade heterocigotas y homocigotas.

En el tejido renal de ratas Belgrade heterocigotas (b/+) se identificó Eritropoyetina específicamente en la unión cortico-medular y en la médula externa, sin observarse la proteína en otras zonas tisulares (Figura 143).

Cuando se identificó el tipo de células que expresaban Eritropoyetina, se vio que la proteína estaba presente en las uniones inter-tubulares y/o espacios intersticiales, que presentan numerosos fibroblastos intersticiales. Por el contrario no se observó marcación en el interior de las células tubulares renales (Figura 143).

El tejido renal de ratas Belgrade homocigotas (b/b) mostró un patrón de inmunolocalización de Eritropoyetina similar al observado en tejido de ratas Belgrade heterocigotas. Una vez más se vio expresión de Eritropoyetina en las uniones cortico-medulares y en la médula externa, localizándose la proteína solamente en las uniones inter-tubulares (Figura 144).

Es importante mencionar que, aún cuando las ratas Belgrade homocigotas poseen un grado severo de anemia con respecto a las heterocigotas, no se detectaron diferencias en la intensidad de la expresión renal de Eritropoyetina entre ambos modelos.

En el control negativo no se evidenció inmunomarcación inespecífica en el tejido renal cortical y medular (Figura 145).

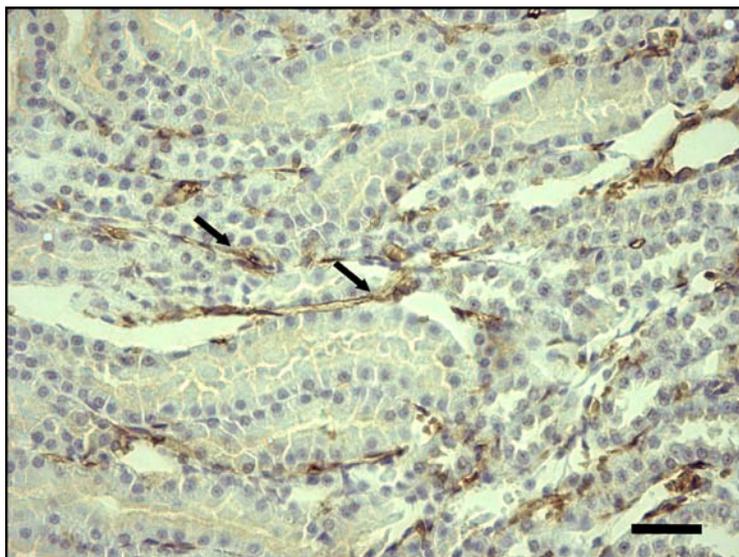


Figura 143. Expresión de Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas. Se utilizaron ratas Belgrade macho. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo policlonal anti-Eritropoyetina de rata y anticuerpo secundario-HRP según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de Eritropoyetina en los espacios inter-tubulares de la zona cortico-medular (flecha). X 400. Escala: 30 μ m

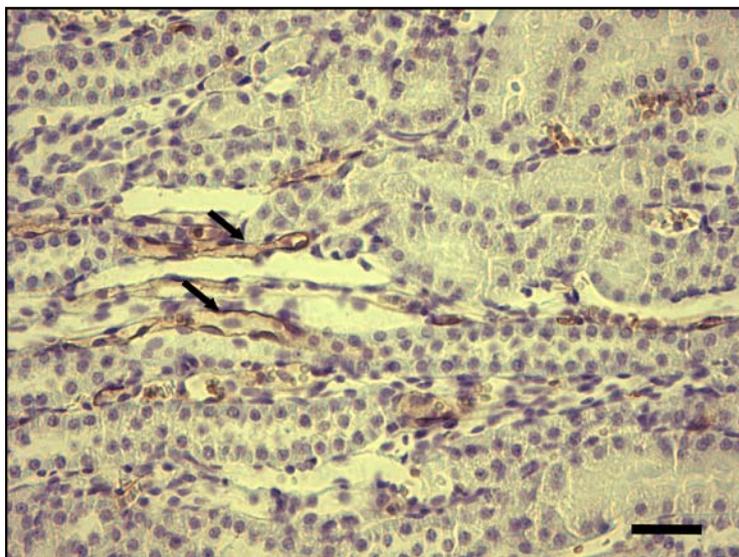


Figura 144. Expresión de Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade Homocigotas. Se utilizaron ratas Belgrade macho. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Expresión de eritropoyetina en los espacios inter-tubulares de la unión cortico-medular (flecha). X 400. Escala: 30 μ m

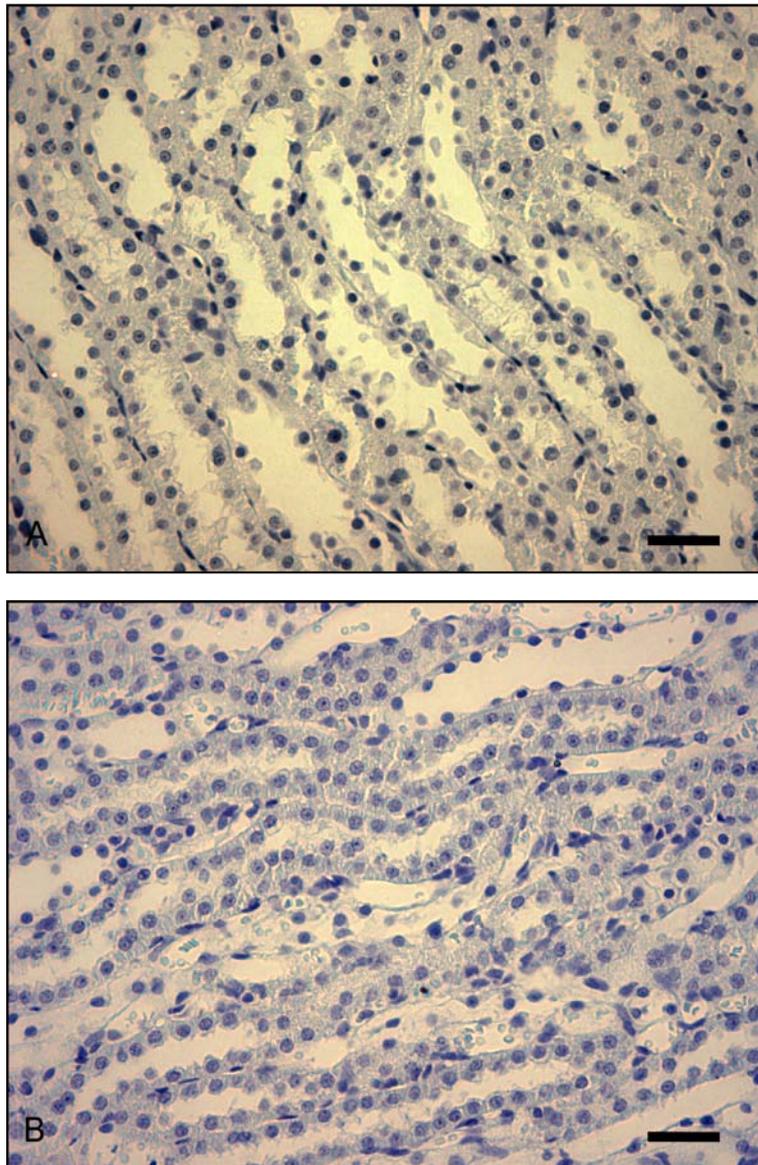


Figura 145. Control Negativo para Eritropoyetina en Tejido Renal de Ratas Belgrade. Se utilizaron ratas Belgrade macho. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado el tejido se procesó para Inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del anticuerpo primario y con anticuerpo secundario-HRP. No se observa marcación inespecífica en la zona córtico-medular de riñón de ratas Belgrade heterocigotas (A) y homocigotas (B). X 400 (A, B). Escala: 30 μ m

ERITROPOYETINA SÉRICA

Para completar nuestros estudios sobre la Eritropoyetina en ratas Belgrade, y dado que no fue posible identificar diferencias en la intensidad de expresión renal de Epo entre ratas heterocigotas y homocigotas, realizamos la determinación de los niveles séricos de Epo por un método ELISA, un inmunoensayo cuantitativo del tipo sándwich.

El coeficiente de correlación de la curva de calibrado realizada fue: $r^2: 0,99948$

Las ratas Belgrade heterocigotas presentaron niveles no detectables de Eritropoyetina por el método utilizado. Cuando se determinaron los niveles de Epo en ratas Belgrade homocigotas, quienes poseen un grado severo de anemia, se hallaron altos valores séricos de la hormona (Figura 146).

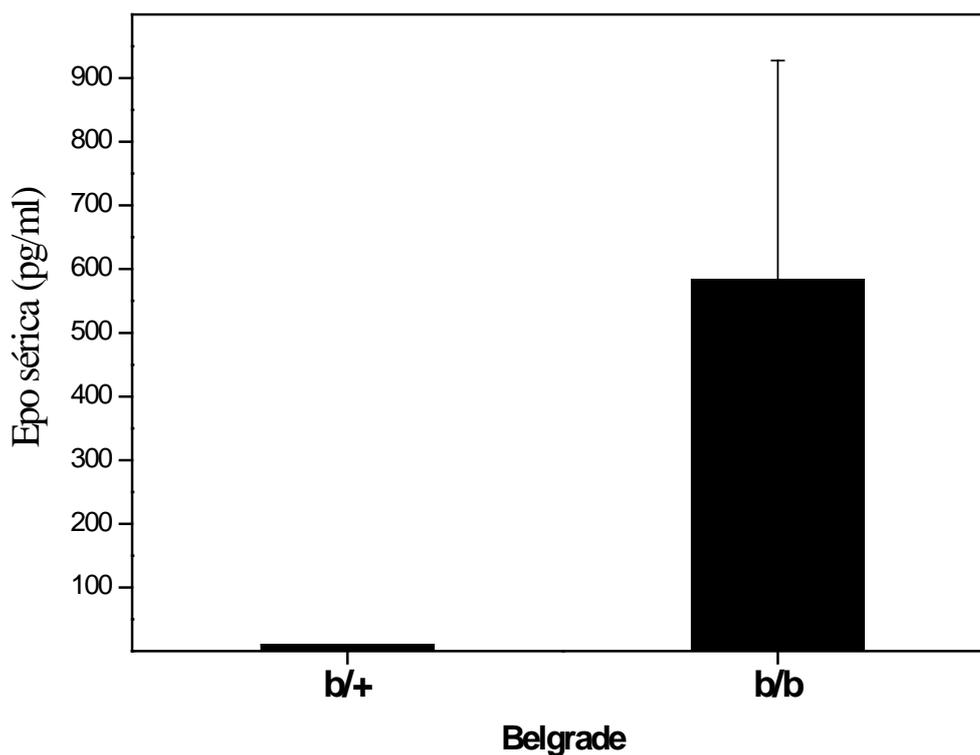


Figura 146. Eritropoyetina Sérica de Ratas Belgrade Homocigotas y Heterocigotas. Muestras sanguíneas se procesaron para la determinación de Epo sérica según se describe en Materiales y Métodos. Se detectaron elevados niveles de Epo en ratas Belgrade homocigotas (b/b) y no se detectó Epo en ratas heterocigotas (b/+). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

HIERRO TISULAR

Debido a la relación hallada entre el riñón, la eritropoyesis y el Metabolismo del Fe en ratas Belgrade mediante nuestros estudios sobre la expresión de Epo y Hpcidina, el siguiente paso fue la valoración de Fe renal mediante Tinción de Perl's.

La valoración del Fe en la corteza renal de ratas Belgrade heterocigotas no evidenció pigmentos de Fe³⁺ en los túbulos corticales y glomérulos. Tampoco se observó Fe³⁺ en túbulos de la médula renal externa e interna (Figura 147).

Similar a lo hallado en riñón de ratas heterocigotas, la observación histológica de tejido renal de ratas Belgrade homocigotas no mostró pigmentos de Fe³⁺ en el sistema tubular, pese a que estos animales son alimentados con una dieta suplementada en Fe para permitir su supervivencia (Figura 148).

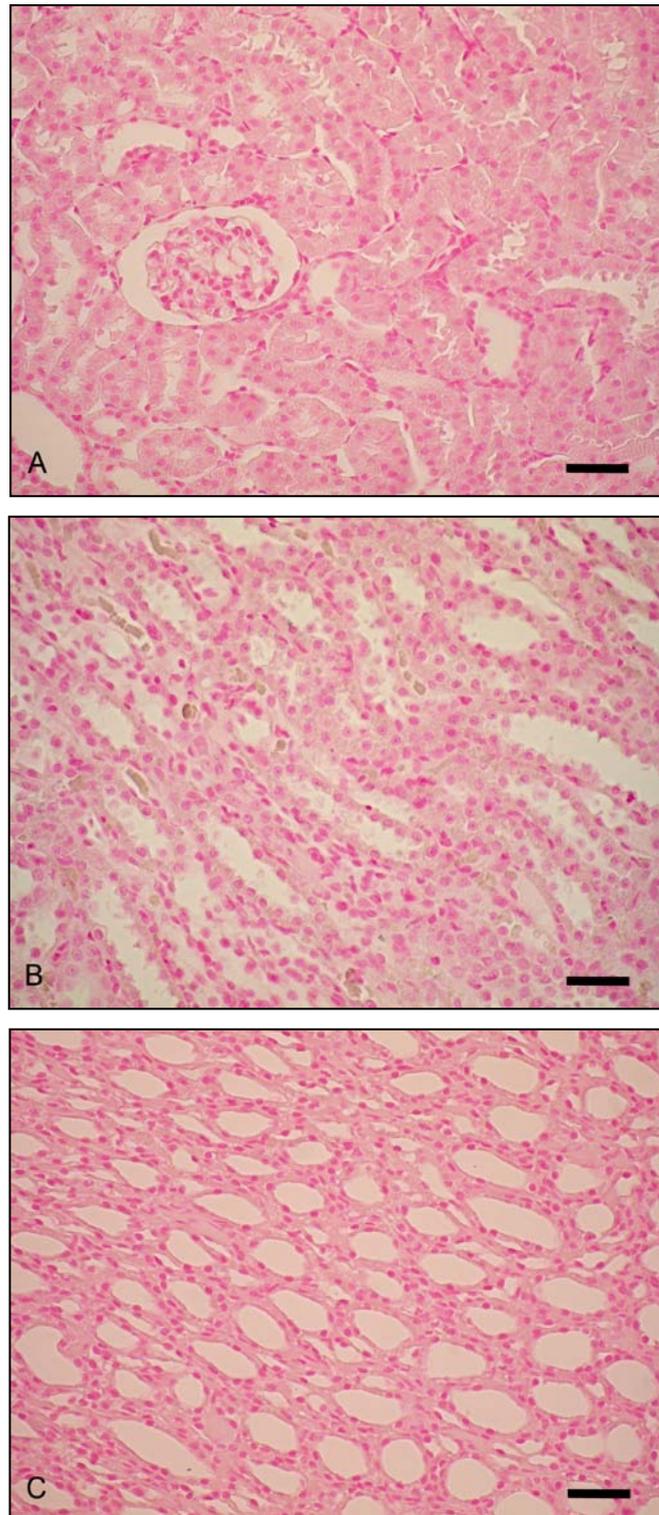


Figura 147. Tinción de Perl's del Tejido Renal de Ratas Belgrade Heterocigotas. Un grupo de animales ($n=3$) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): No se observan pigmentos de Fe. X 400 (A, B, C). Escala: $30\mu\text{m}$

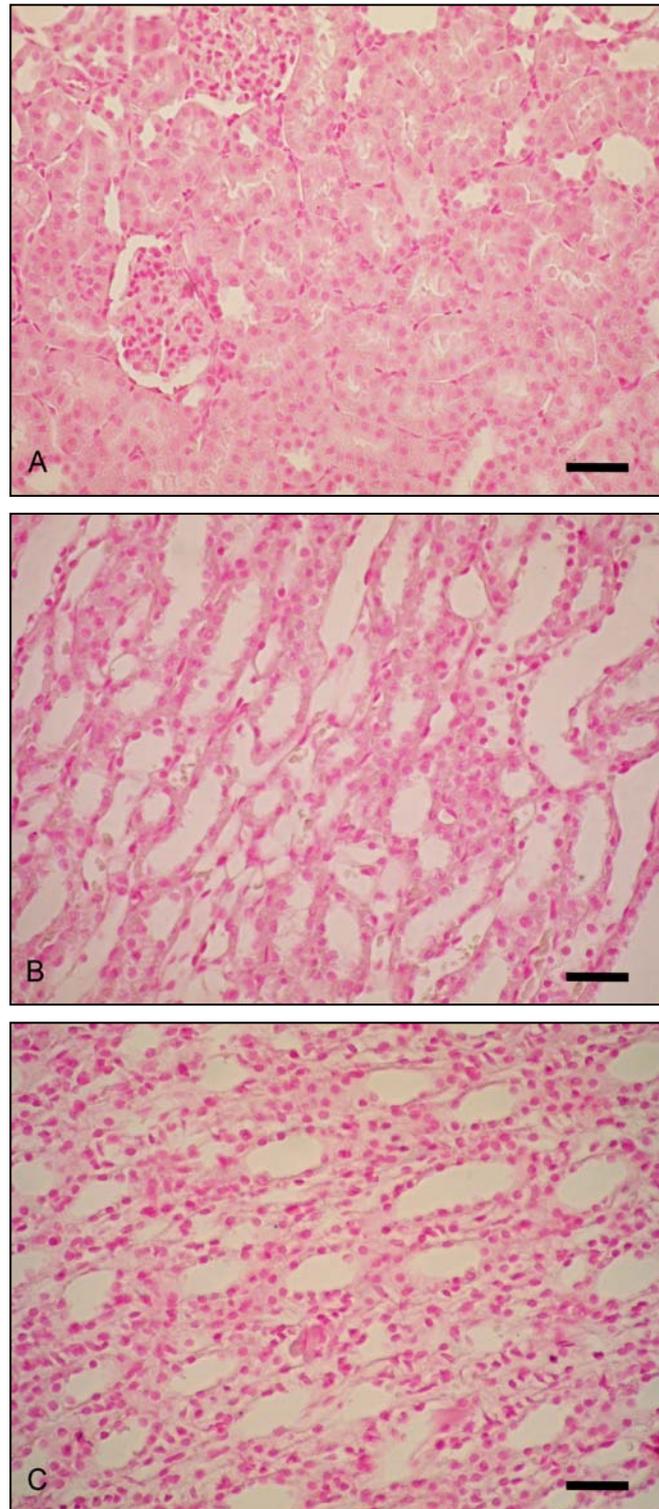


Figura 148. Tinción de Perl's del Tejido renal de Ratas Belgrade Homocigotas. Un grupo de animales (n=3) fue sacrificado y el tejido se procesó para la Tinción de Perl's según se describe en Materiales y Métodos. Corteza (A), Médula Externa (B) y Médula Interna (C): No se observan pigmentos de Fe. X 400 (A, B, C). Escala: 30 μ m

SECCIÓN IV. DISCUSIÓN

CAPÍTULO I:

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA EN MODELOS ANIMALES

1. ERITROPOYESIS EN EL MODELO DE MURINO DE ANEMIA HEMOLÍTICA

La acción hemolítica de las arilhidrazinas como la Fenilhidrazina ha sido reportada con respuestas variadas en función de los diseños experimentales implementados y de las distintas especies utilizadas (Kinuta M et al., 1995; Jain SK et al., 1980).

Nuestro estudio sobre la respuesta eritropoyética a la FHZ constituye un aporte al conocimiento de la hemopoyesis experimental en la cepa CF1, por la implementación de un protocolo novedoso diseñado para caracterizar exhaustivamente al eritrón durante la crisis hemolítica y en la etapa de regeneración eritropoyética. En forma paralela a los estudios en animales con disfunción eritropoyética, se evaluó el eritrón de ratones sanos por estudios morfológicos, hematológicos, bioquímicos y funcionales. La importancia de estos resultados reside en que en la literatura no se dispone de valores de referencia validados y sistematizados en ratón en las condiciones estudiadas (Roque M et al., 2008).

En concordancia con otros autores, observamos una marcada hemólisis durante el tratamiento con FHZ (Criswell KA et al., 2000; Latunde-Dada GO et al., 2006). Además determinamos que la concentración óptima de FHZ que producía los signos y síntomas característicos de la crisis de hemolítica fue 60 mg FHZ/Kg peso corporal.

El daño oxidativo inducido por Fenilhidrazina en la cepa CF1 se caracterizó por la presencia característica de abundantes células con Cuerpos de Heinz, alteraciones estructurales descritas en la membrana del eritrocito, generadas por la desnaturalización y precipitación de la Hb. Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Rifkind R et al (1965).

Es importantes destacar que la cuantificación de células con Cuerpos de Heinz en función de las dosis de FHZ nos aportó información sobre el posible mecanismo de clearance de los eritrocitos dañados por la injuria oxidativa, proceso que fue dependiente de la concentración de FHZ. En este sentido, el marcado aumento de Cuerpos de Heinz el día 2 y el drástico descenso el día 4, a altas dosis de FHZ, podría indicar que el principal mecanismo de remoción de eritrocitos dañados es el secuestro esplénico prematuro.

Por el contrario, la permanencia en circulación de Cuerpos de Heinz observados con bajas concentraciones de FHZ, sugiere moderada lisis y leve remoción celular, en coincidencia con lo reportado por Mc Millan D et al (1998).

Para profundizar en el conocimiento de la función del bazo en el proceso de hemocateresis realizamos estudios ultraestructurales. La Microscopia Electrónica de Barrido nos permitió identificar con precisión la estructura del parénquima esplénico y las alteraciones eritrocitarias que caracterizan al proceso de hemólisis extravascular.

En este sentido, las diversas alteraciones observadas en la membrana de los eritrocitos que condujeron a la transformación secuencial de eritrocitos bicóncavos en esferocitos proveen fuertes evidencias de eritrofagocitosis esplénica.

Los Cuerpos de Heinz observados en la membrana de los eritrocitos son estructuras producidas por precipitación de la Hemoglobina, que producen la deformación del eritrocito, favoreciendo así su atrapamiento en los sinusoides esplénicos cuando la sangre es filtrada a través del bazo (Hasegawa S et al., 1993).

Estas alteraciones conducen a la destrucción de los eritrocitos, pudiendo identificarse tres etapas bien diferenciadas. En una primera etapa se produce el “picoteo esplénico” de los Cuerpos de Heinz llevado a cabo por células del Sistema Retículo Endotelial. Luego en una etapa “post-picoteo” los eritrocitos se encuentran severamente dañados, y finalmente adquieren morfología de esferocitos, un estadio final en el proceso de destrucción eritrocitaria llevado a cabo por el Sistema Retículo Endotelial esplénico.

Un indicador diagnóstico de la restauración de la eritropoyesis fue la reticulocitosis observado luego de la inducción de Anemia Hemolítica, que fue dependiente de la concentración de FHZ. Como es ampliamente conocido, la presencia de precursores eritroides inmaduros, de mayor tamaño que los eritrocitos maduros pero capaces de transportar hemoglobina, evidencia la recuperación de la eritropoyesis frente a la anemia (Latunde-Dada GO et al., 2006).

Como es esperable, en forma paralela al aumento de Reticulocitos, aumentó el VCM, cambios que coincidieron con la normalización de parámetros hematológicos como Hb, HCT, eritrocitos. Este estado de recuperación eritropoyética posthemólisis se acompañó con el descenso en el número de células con Cuerpos de Heinz.

Finalmente, cabe mencionar que la presencia de Reticulocitos de variada morfología observados durante la Anemia Hemolítica suele asociarse a la existencia de

Reticulocitos con distinto grado de maduración, diferenciados por su contenido de ribosomas y ARN (Rifkind RA et al., 1965).

El rol del bazo en la restauración de la eritropoyesis post-hemolisis ha sido descrito por diversos autores (Kozlov VA et al., 1980; Latunde-Dada GO et al., 2006; Hara H et al., 1976). Es sabido que bajo estímulo eritropoyético, células madres pluripotenciales proliferan en la médula ósea y migran hacia el bazo donde anidan y se diferencian (Rencricca NJ et al., 1970). En este sentido, diversos autores han demostrado la presencia de precursores eritroides en sangre periférica de animales tratados con FHZ (Hara H et al., 1976; Hara H et al., 1977). Para avanzar en el conocimiento de la función esplénica en la restauración de la eritropoyesis se encararon estudios estructurales.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, nuestros estudios confirmaron que la recuperación del eritrón evaluada por parámetros hematológicos, fue paralela a hiperplasia esplénica.

Otro indicador que avaló el indiscutible rol del bazo en la recuperación eritropoyética fue la presencia de elevado número de Islotes Eritroblásticos, definidos como unidades anatómicas formadas por un macrófago central rodeado por un anillo de eritroblastos en proceso de maduración (Yokoyama T et al., 2003). La presencia de macrófagos y megacariocitos en el tejido esplénico de animales con FHZ sugiere nuevamente la participación hemopoyética y eritrofagocítica de este órgano. Los depósitos de Hemosiderina observados en tejido esplénico de animales tratados con FHZ podrían deberse a la excesiva eritrofagocitosis asociada a la remoción de eritrocitos dañados durante la hemólisis, aunque algunos autores consideran que el aumento en los depósitos de Fe^{3+} estaría asociado a la eritropoyesis extramedular (Roque M et al., 2008; Veuthey TV et al., 2008).

El hígado es otro de los órganos que puede asumir funciones eritropoyéticas en condiciones de esplenectomía ó de alta demanda eritropoyética, de acuerdo a lo reportado por otros autores (Ploemacher RE et al., 1977; Wolber FM et al., 2002). Estos estudios avalan no sólo la presencia de Islotes Eritroblásticos observados en el hígado de ratones tratados con FHZ sino que además coinciden con el incremento en el número de Islotes evidenciado los últimos días del protocolo experimental.

Otro órgano que adquirió relevancia en nuestro estudio fue el riñón. La presencia de Islotes Eritroblásticos hallados en riñón en nuestras condiciones experimentales, y el leve incremento observado en su semicuantificación, sugieren la posibilidad que el

riñón sería otro sitio de eritropoyesis extramedular. La participación del riñón no ha sido descrita como órgano eritropoyético hasta el presente. Una de las hipótesis indicaría que la eritropoyesis renal ocurriría por migración de células precursoras desde médula ósea más que por activación de células madre (Roque M et al., 2008).

Una relación funcional y estructural a destacar es la localización de los Islotes Eritroblásticos hepáticos y renales, que podría ser clave para en el proceso de recuperación del eritrón. La disposición perivascular de estas agrupaciones celulares indicaría un sitio estratégico para su liberación a circulación frente a la demanda eritroide.

A partir de nuestros estudios podemos concluir que la respuesta regenerativa eritropoyética luego de la inducción de Anemia Hemolítica Aguda por FHZ, resulta de la acción coordinada de diversos tejidos extramedulares como el bazo, hígado y riñón.

Otro de nuestros objetivos fue profundizar los cambios en la restauración de la eritropoyesis, estudiando la respuesta hematológica y morfológica a la anemia cuando un eje regulatorio de la eritropoyesis se encuentra inhibido farmacológicamente. Es sabido que la eritropoyesis y el Sistema Renina-Angiotensina (SRA) se encuentran interrelacionadas (Rodgers KE et al., 2000; Veuthey TV et al., 2008). Se ha descrito la existencia de un SRA activo en la médula ósea, que modularía el crecimiento de colonias hemopoyéticas (Haznedaroglu IC et al., 1996). Otros autores han propuesto que la Angiotensina II tendría un importante efecto proliferativo, probablemente a través de la activación directa del receptor de Angiotensina I presente en progenitores hemopoyéticos de la médula ósea, o a través de la estimulación de células estromales para producir factores de crecimiento (Rodgers KE et al., 2002). Por este motivo, la presencia de inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) podría reducir los niveles de Angiotensina II y como consecuencia modular la actividad eritropoyética.

El retraso temporal en la restauración de la eritropoyesis luego del tratamiento con Enalapril y FHZ es sin duda el resultado más destacable de este modelo. Este comportamiento podría ser atribuido a la acción del inhibidor de la ECA, quien reduciría los niveles de Angiotensina II afectando la producción de glóbulos rojos. La inhibición de la eritropoyesis evidenciada luego del tratamiento con Enalapril, podría explicar la recuperación tardía de la eritropoyesis, coincidente con lo reportado por Cole J et al (2000). De esta manera, nuestro modelo evidenció además la regulación múltiple

de la eritropoyesis, dado que la modulación del eje RA afectó la respuesta eritropoyética.

Previamente nuestros resultados evidenciaron la participación de tejidos extramedulares en la recuperación hematopoyética murina (Roque M et al., 2008). Los estudios morfológicos realizados nos permitieron evaluar el grado de participación de diversos tejidos extramedulares en la recuperación eritropoyética cuando la actividad de la ECA está inhibida.

Reforzando nuestros resultados previos, la marcada congestión eritrocítica esplénica y la pérdida de la típica organización de la pulpa observada en los ratones tratados E y FHZ, sugiere una participación activa de este tejido en respuesta a la crisis hemolítica (Roque M et al., 2008). Estos cambios muestran una fuerte relación con la semicuantificación de los Islotes Eritroblásticos y sugieren la participación esplénica en la restauración de la anemia hemolítica (Sadahira Y et al., 2000).

Al igual que lo reportado en ratones con Anemia Hemolítica, la hemosiderina y los abundantes macrófagos esplénicos hallados en bazo luego del tratamiento con Enalapril podría indicar la actividad eritrofagocítica esplénica (Roque M et al., 2008).

Otra de las evidencias más importante que surge de nuestros estudios morfológicos, es el incremento en el número de Islotes Eritroblásticos renales los días 18 y 20 en los ratones tratados con E y FHZ. Similar a lo observado en tejido renal de ratones anémicos sin Enalapril, los islotes se localizaron principalmente cerca de los vasos sanguíneos, un sitio clave para una rápida y efectiva liberación de células a la circulación periférica (Roque M et al., 2008). Por otro lado, el aumento en el número de Islotes Eritroblásticos renales, coincidente con la disminución en la actividad eritropoyética esplénica, podría sugerir que el riñón contribuye en la restauración de la volemia post-hemólisis, y explicaría el retardo en la recuperación hematológica.

Aunque no se ha descrito la participación del riñón en la recuperación eritropoyética, es importante resaltar la presencia de Islotes Eritroblásticos en este tejido bajo la inhibición farmacológica de un eje regulatorio de la eritropoyesis. En este sentido, la eritropoyesis renal podría ocurrir por migración de células precursoras desde médula ósea más que por la activación de células madre.

Se ha descrito la presencia de Islotes Eritroblásticos en tejido hepático luego de la inducción de Anemia (Ploemacher RE et al., 1977; Wolber FM et al., 2002; Roque M et al., 2008). Por este motivo, la ausencia de estas agrupaciones celulares en hígado de

animales anémicos con inhibición farmacológica del SRA podría deberse a la injuria observada en el parénquima hepático. En este sentido, otros autores han reportado previamente signos de daño tisular en el tratamiento con Enalapril (Gonzalez de la puente MA et al., 2001; Quilez C et al., 1999).

Nuestros resultados muestran que bajo las condiciones descriptas, la inhibición de la ECA por Enalapril afectó el rango temporal de respuesta a la anemia hemolítica aguda inducida por FHZ, y que cada tejido se comportó en forma diferente en la recuperación de la volemia post-hemólisis. Nuestros resultados también sugieren que la recuperación tisular eritropoyética post-hemólisis bajo inhibición del SRA también depende de la acción coordinada de órganos extramedulares, confirmando el rol del bazo en la recuperación del eritrón.

2. SOBRECARGA DE HIERRO

Se conoce ampliamente que el Fe es un nutriente esencial, cuyo balance está estrictamente regulado ya que tanto su carencia como su exceso comprometen la sobrevivencia. Las patologías asociadas a excesos de Fe suelen ser complejas y no han sido del todo esclarecidas, ya que el organismo carece de mecanismos fisiológicos para la excreción del exceso de Fe. La sobrecarga de Fe origina severos daños en estructuras celulares por la generación de especies reactivas de oxígeno (Fraga CG et al., 2002; Emerit J et al., 2001). El Fe se acumula en el Sistema Retículo Endotelial, afectándose su biodisponibilidad (Hershko C et al., 1998).

Con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre el metabolismo del Fe, estudiamos proteínas claves de la ruta del Fe en estado de suficiencia y de exceso de Fe. En este sentido, la fisiopatología del modelo de Sobrecarga de Fe podría ser análoga a la observada en enfermedades humanas. En la actualidad se conocen diversas patologías que cursan con Sobrecarga de Fe, entre ellas la Hemocromatosis (Andrews N, 2000; Kushner JP et al., 2001).

Nuestros estudios sobre el desarrollo de Sobrecarga de Fe inducida por Fe-Dextrán constituyen un importante aporte en el estudio de metabolismo del Fe en nuestra cepa de

ratones, ya que nos permitieron no sólo caracterizar los cambios de la ruta del Fe sino también establecer valores de referencia que identifican el estado del Fe.

Debido a que en una primera etapa hemos optimizado el modelo de Anemia Hemolítica, caracterizado por alta demanda de Fe, el desarrollo posterior del modelo de Sobrecarga de Fe fue fundamental para estudiar proteínas relacionadas con el balance del Fe.

Para la optimización de nuestro modelo de Sobrecarga de Fe fue esencial la valoración de los niveles plasmáticos de Fe. El aumento de los niveles plasmáticos de Fe observado en nuestro modelo podría deberse a la unión del Fe a la Tf y a otros ligandos como el citrato, constituyendo el hierro no unido a Transferrina (Pérez G et al., 2005; Trinder D et al., 2002). Se ha descrito que la saturación de Transferrina no es completa, lo que le permite actuar a esta proteína como amortiguador frente a excesos de Fe evitando la toxicidad de su exceso (Kohgo Y et al., 2008).

La semicuantificación del Fe hepático permitió confirmar el estado de Sobrecarga de Fe. En este sentido, los abundantes pigmentos de Fe^{3+} presentes luego de la inducción de Sobrecarga reflejaron la capacidad del hígado para almacenar Fe como Ferritina o hemosiderina (Matsuno T et al., 1985). A su vez, del recuento de hepatocitos con Fe se desprende que la Sobrecarga de Fe fue tiempo y dosis dependiente. La ausencia de diferencias en el porcentaje de células de Kupffer con Fe el día 20 en animales tratados con ambas dosis de Fe-Dextrán, podría deberse a la completa saturación de estas células dada su conocida capacidad de captación y almacenamiento de Fe (Latunde-Dada GO, et al., 2006).

De la cuantificación de los niveles hepáticos de Fe surge un aumento del Fe hepático total post-tratamiento. En las células de Kupffer, esto podría reflejar su función fagocítica, destacando la presencia de un mecanismo de detoxificación basado en una elevada tasa de captación y una baja tasa de liberación de Fe (Trinder D et al., 2002). En los hepatocitos podría deberse a su capacidad de captar el Fe circulante unido a Transferrina y el NTBI. Este mecanismo estaría mediado por DMT1 y un transportador llamado zip14, altamente expresado en la membrana de los hepatocitos (Liuzzi JP et al., 2006).

Las diferencias en la cuantificación del Fe hepático total entre ambos grupos de animales tratados con las concentraciones ensayadas de Fe-Dextrán confirman que la

respuesta es dependiente del tiempo y de la concentración, como se describió en la semicuantificación.

Podemos concluir que los estudios cuantitativos y semicuantitativos nos permitieron establecer la dosis de 1 g Fe-Dextrán/Kg peso corporal como la más adecuada para la inducción de sobrecarga de Fe, sin comprometer la sobrevivencia del animal.

Este estudio nos permitió caracterizar en Sobrecarga de Fe, parámetros hematológicos y el estado del Fe funcional y de depósito. Esto será fundamental para posteriores estudios de la regulación de proteínas de la ruta del Fe.

3. MODELO DE ACOPLADO CON INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA.

En una primera etapa optimizamos y caracterizamos los modelos de Anemia Hemolítica Aguda y de Sobrecarga de Fe, situaciones de alta demanda y de exceso de Fe respectivamente. Estas situaciones experimentales fueron diseñadas para abordar los estudios de caracterización y regulación de las proteínas del Fe como Prohepcidina y DMT1 que se describen posteriormente. A partir de los resultados obtenidos y de las conclusiones que surgieron de estos estudios, nos planteamos estudiar las proteínas del metabolismo del Fe en un modelo de acoplado donde coexistieran dos situaciones bien definidas como son: a) estado de exceso de Fe (sobrecarga); b) estado de suficiencia (balance de Fe normal) con alta demanda de Fe (anemia). Para ello, se indujo inicialmente la Sobrecarga de Fe y posteriormente se indujo la Anemia Hemolítica.

El desarrollo de este modelo constituyó un aporte novedoso por el diseño de un modelo animal “*in vivo*”, con condiciones fisiopatológicas análogas a las observadas en humanos.

Hemos descrito previamente que la Fenilhidrazina es un agente hemotóxico cuyo principal mecanismo de acción está asociado a la desnaturalización y precipitación de la Hemoglobina sobre la membrana celular (Rifkind RA et al., 1965; Rifkind RA, 1965). Esto favorece la captación de los hematíes por macrófagos del bazo, y la posterior

traslocación de fosfatidil-serina (PS) desde la membrana plasmática interna hacia la externa, constituyendo esto una señal para la fagocitosis macrofágica (Berger J, 2007).

Teniendo en cuenta los cambios hematológicos y bioquímicos observados, podemos deducir que el grado de anemia visto en el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de anemia fue similar al hallado en Anemia con balance normal de Fe.

El daño oxidativo de la FHZ produce la aparición de Cuerpos de Heinz, inclusiones eritrocíticas de Hb oxidada que fueron observadas en el modelo de acople de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia, al igual que lo reportado previamente en Anemia sin exceso de Fe. Sin embargo, aunque los Cuerpos de Heinz no se observaron en los eritrocitos en exceso de Fe sin anemia, no podemos descartar que el Fe por si mismo haya contribuido con el cuadro oxidativo sobre la Hb observado en Anemia con exceso de Fe.

Otro dato interesante a destacar es la recuperación tardía observada en la Anemia con exceso de Fe previo. El aumento de Reticulocitos y la normalización de parámetros hematológicos ocurrieron tardíamente en esta condición, lo que sugiere una limitada disponibilidad de Fe para la eritropoyesis. Este comportamiento podría deberse a los elevados niveles de Hepsidina asociados al exceso de Fe, que inducirían la internalización y posterior degradación del exportador de Fe Ferroportina, disminuyendo la liberación de Fe (Ganz T et al., 2006; Fleming MD, 2008).

Finalmente, la normalización en el recuento de Reticulocitos observada entre los días 28 y 30 sugiere una menor demanda eritroide y coincide con la normalización de los restantes parámetros hematológicos.

Para la evaluación de la eritropoyesis se determinaron los niveles de Epo plasmática, principal hormona estimulante de la eritropoyesis que se libera cuando disminuye la masa eritrocitaria, afectando de esta manera la presión parcial de oxígeno (Foley RN, 2008; Berger J, 2007). La Epo es sintetizada principalmente por las células intersticiales del túbulo renal, aunque en menor medida en tejidos extrarrenales como hígado y cerebro (Koury St et al., 1988; Fried W et al., 1972; Maxwell P et al., 1977). La función más relevante es actuar como regulador de la mitogénesis y diferenciación de progenitores eritroides (Metcalf D, 1998; Sawyer ST et al., 1994).

El aumento de Eritropoyetina plasmático observado en la Anemia con y sin exceso de Fe, confirmó la intensa demanda eritropoyética en la crisis hemolítica. Por otro lado, la relación inversa evidenciada entre los niveles de Epo y la Hb coincide con lo

descrito en humanos con Anemia por deficiencia de Fe (Spivak JL et al., 1993; Roque ME et al., 2001). Además nuestros resultados de Epo plasmática coinciden con el comportamiento descrito por Spivak JL et al (1993), donde la respuesta de Epo es del tipo “todo o nada”.

Se sabe, que uno de los nutrientes esenciales en el proceso eritropoyético es el Fe. El organismo tiene sistemas que controlan eficientemente el balance del Fe para evitar los efectos tóxicos del Fe en exceso sobre tejidos y órganos. Una de las funciones más importantes del hígado es actuar como órgano de captación de Fe (Matsuno T et al., 1985). De esta forma el tejido contribuye a mantener el balance del Fe y evita la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha propuesto que el principal mecanismo detoxificador del hígado dependería del aumento en la tasa de captación y de la disminución en la tasa de liberación del Fe (Trinder D et al., 2002).

En nuestro modelo de Sobrecarga de Fe (con y sin Anemia) se identificaron elevados depósitos de Fe en el hígado, valorados por un método cuantitativo, que avalan su función de órgano regulador del balance del Fe biodisponible.

Otro de los roles del hígado es la síntesis de proteínas. En este caso, en Sobrecarga de Fe aumentará la síntesis de Hefcidina, el regulador negativo de la liberación de Fe. Resultados aún no publicados de nuestro laboratorio determinaron que la sobreexpresión de Prohepcidina asociada a la Sobrecarga de Fe reduciría la expresión de Ferroportina, único exportador de Fe descrito hasta el presente. Este mecanismo pone en evidencia el rol del hígado no sólo como órgano detoxificador sino también como órgano regulador del Fe. Esto podría explicar la retención hepática del Fe, disminuyendo su toxicidad y su biodisponibilidad para la producción eritroide. La baja disponibilidad explicaría también el retardo en la recuperación de la Anemia en animales con Sobrecarga de Fe y Anemia respecto a los Anémicos sin Sobrecarga de Fe.

Para completar el estudio del estado del Fe del organismo, fue necesaria la valoración del Fe funcional circulante. El aumento del Fe plasmático observado en Sobrecarga de Fe refleja nuevamente los excesivos niveles del metal, asociados a la elevada capacidad de la Tf para incorporar y transportar excesos de Fe (Kohgo H et al., 2008). Cuando posteriormente se indujo Anemia, con y sin exceso de Fe previo, los niveles plasmáticos de Fe disminuidos podrían indicar la utilización del Fe fácilmente

disponible para satisfacer las demandas de este nutriente para la eritropoyesis, en coincidencia con lo descrito por Fleming MD et al (2008).

CAPÍTULO II:***ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y DE REGULACIÓN DE
PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DEL HIERRO***

Como se mencionó anteriormente, se desarrollaron y optimizaron modelos animales con desbalance del Fe como Anemia Hemolítica y Sobrecarga de Fe para realizar estudios estructurales y evaluar el estado del Fe y la funcionalidad de la eritropoyesis.

La importancia de haber caracterizado exhaustivamente estos modelos experimentales reside en que constituyen una herramienta indispensable para los estudios propuestos en la etapa posterior de este trabajo de tesis. Una vez optimizados estos modelos disfuncionales, encaramos estudios sobre la regulación de la expresión de proteínas del metabolismo del Fe como DMT1, importadora de Fe, Prohepcidina, regulador negativo de su absorción, y Epo, principal regulador de la eritropoyesis. De esta forma, podremos establecer relaciones funcionales y regulatorias entre proteínas de la ruta del Fe y de la eritropoyesis.

Este enfoque nos permitió abordar el interrogante sobre el rol dual de Eritropoyetina: principal estímulo para la eritropoyesis y regulador negativo de Hepsidina. También analizamos las implicancias funcionales y regulatorias de la coexistencia de elevados niveles de Epo y de Hepsidina en la Anemia con Sobrecarga de Fe.

Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica

Hepsidina es un péptido-hormona cuya síntesis ha sido descrita principalmente en el hígado (Pigeon C et al., 2001; Park CH et al., 2001). En la actualidad Hepsidina es considerada el regulador central de la homeostasis del Fe dado que coordina su uso, captación y almacenamiento (Ganz T et al., 2006). En este sentido, la primera evidencia entre la asociación entre Fe y Hepsidina fue aportada por Pigeon C et al (2001) quienes demostraron su función clave en la homeostasis del Fe limitando la absorción intestinal y su liberación desde los macrófagos.

Si bien en la actualidad se conocen ampliamente los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de Hepsidina, quedan aún por esclarecer las vías regulatorias que participan en procesos asociados a la anemia de las enfermedades crónicas, una entidad caracterizada por anemia hipoproliferativa con defectivo reciclamiento del Fe desde es SRE y escasa respuesta a la Epo.

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue contribuir a ampliar el conocimiento sobre la regulación de Hepsidina en hígado, identificando los cambios en su expresión y localización celular en la Anemia Hemolítica.

Dado que hepcidina es un conocido regulador negativo de la absorción de Fe (Pigeon C, Iiyin G, et al., 2001), la baja expresión hepática de Prohepcidina observada por nosotros en condiciones basales podría reflejar el estado de balance de Fe del organismo en ausencia de estímulo, coincidente con la ausencia de depósitos hepáticos de Fe 3+ reportada por nosotros en condiciones basales. A diferencia de la expresión de Prohepcidina que hemos hallado en ratones condiciones basales, los estudios de Kulaksiz H et al., (2004) reportaron marcada expresión de Prohepcidina en hígados humanos y porcinos, reflejando diferencias de especie para la expresión de esta proteína.

Por otro lado, de acuerdo a lo reportado por Ganz T et al (2003), la anemia es un conocido estímulo para la supresión de la síntesis de hepcidina, disminuyendo así su efecto inhibitorio sobre la absorción de Fe y liberación del metal desde macrófagos, y favoreciendo la disponibilidad de Fe para la eritropoyesis. En este sentido, la ausencia de cambios en la expresión hepática de Prohepcidina que observamos en la anemia no coincide con estudios de otros autores, quienes han observado cambios en el ARNm de Hecidina luego del tratamiento con FHZ (Vokurka M et al., 2006, Ganz T et al., 2003). Las diferencias halladas con respecto a otros autores podrían deberse a que en nuestro estudio se ha evaluado la expresión de la proteína y no su ARNm como así también a diferencias en las condiciones experimentales.

Si bien es sabido que la anemia se asocia con la regulación de la expresión de Hecidina, hasta el presente no se han identificado con claridad los mecanismos, ya sean directos o indirectos, involucrados en la regulación de Hecidina. Sin embargo, varios autores han propuesto algunos mecanismos de regulación posiblemente implicados (Nicolas G, Viatte L 2002; Pinto JS et al., 2008; Nicolas G, Chauvet C 2002).

Por un lado, debido a que el promotor de Hecidina contiene varios sitios de unión para HIF-1, es posible que el mecanismo de regulación de Hecidina en anemia esté mediado por la hipoxia asociada a la anemia. En este sentido, se ha propuesto que la expresión de Hecidina estaría regulada transcripcionalmente mediante la interacción de HIF-1 con secuencias HRP del ARNm de Hecidina, en forma dependiente de los niveles de oxígeno (Safran M et al., 2003; Malyszko J et al., 2007).

Por otro lado, Nicolas G et al (2002c) han evidenciado una disminución de Hecidina hepática luego de que ratones fueron inyectados con Epo, sugiriendo que la

síntesis de Hecpidina sería regulada negativamente por Epo. Estudios similares fueron desarrollados por Pak M et al (2006), quienes además evidenciaron una disminución de Hecpidina luego de flebotomizar ratones, situación que fue revertida con inyecciones de inhibidores de la eritropoyesis.

A pesar de las evidencias existentes sobre la regulación que Epo ejercería sobre Hecpidina, aún no se ha determinado con precisión el mecanismo de acción involucrado en esta regulación. En este sentido, algunos autores han observado que la disminución de Hecpidina en células hepáticas luego del tratamiento con Epo es revertida con el pretratamiento de las células con un anticuerpo que bloquea el receptor de Epo (Pinto JP et al., 2008). De esta forma, los autores sugieren la existencia de un mecanismo directo, mediado por el receptor de Epo, por el cual la Epo regularía la síntesis de Hecpidina. Sin embargo, Vokurka M et al (2006) han demostrado que la disminución del ARNm de Hecpidina en ratones tratados con Epo exógena no se produce cuando los animales han sido previamente irradiados, sugiriendo que el efecto regulatorio de Epo sobre la síntesis de Hecpidina sería indirecto.

En la búsqueda de relaciones regulatorias entre Hecpidina y Anemia también se ha demostrado una fuerte relación entre los niveles de Hemoglobina y el ARNm de Hecpidina, sugiriendo que la Anemia, la hipoxia, o ambas, tendrían un efecto sobre la expresión de Hecpidina (Détivaud L et al., 2005).

Finalmente, también se ha planteado que la elevada actividad eritropoyética asociada a la anemia ó los bajos niveles de Fe biodisponibles como consecuencia de su utilización para la formación de precursores eritroides, podrían regular la expresión de Hecpidina en anemia (Ganz T et al., 2006; Vokurka M et al., 2006). Sin embargo, quedan por esclarecer los mecanismos involucrados en esta regulación.

Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica

El Transportador de Metales Divalentes 1 es una proteína asociada a la membrana plasmática conocida por su capacidad de incorporar Fe^{2+} al interior celular (Fleming MD et al., 1997; Gunshin H et al., 1997). A partir de la identificación de DMT1 colocalizado con Transferrina en compartimentos intracelulares, también se ha

propuesto su participación en el movimiento intracelular de Fe (Gruenheid S et al., 1999).

Debido a que se ha reportado expresión de DMT1 en diversos tejidos, entre ellos intestino e hígado, se pone en evidencia su rol clave en la homeostasis del Fe del organismo (Hubert et al., 2002).

Tejido Duodenal

Es ampliamente conocido que la absorción de Fe dietario ocurre principalmente en el segmento duodenal del intestino. Los mecanismos fisiológicos involucrados en el transporte de Fe a través del epitelio intestinal han sido caracterizados por ser dependientes de la acidificación del lumen intestinal y por relacionarse en forma inversa con el Fe de depósito del organismo (Conrad ME et al., 1963). Se ha reportado una inadecuada absorción duodenal de Fe en modelos de ratas y ratones mutantes para DMT1, destacando su importancia en el balance de Fe (Fleming MD et al., 1998; Edwards JA et al., 1975).

A partir del conocimiento del rol que juega DMT1 en la captación apical de Fe, hemos decidido estudiar los cambios en la expresión y localización de DMT1 en nuestro modelo de Anemia Hemolítica inducida por FHZ.

La expresión de DMT1 hallada en enterocitos duodenales y la ausencia de DMT1 en las criptas de Lieberkuhn en condiciones basales, coincide con lo descrito previamente por Trinder D et al (2000). A partir de estos conocimientos se podría postular que el aumento gradual de la expresión de DMT1 desde las criptas duodenales hacia las vellosidades, podría ocurrir al mismo tiempo que los enterocitos maduran, adquieren las proteínas necesarias para la absorción de Fe y migran hacia la parte superior de las vellosidades.

La localización intracelular de DMT1 observada por nosotros en tejido duodenal en condiciones basales indicaría la participación de DMT1 en el manejo del Fe intracelular, de acuerdo a lo descrito por Ma Y et al (2006), quienes han demostrado la presencia de DMT1 en vesículas intracelulares de células epiteliales. En este sentido, Gruenheid S et al (1999) han trabajado con diversas líneas celulares y han observado la localización de DMT1 en endosomas, confirmando la actividad intracelular de DMT1.

La carencia de pigmentos de Fe hemosiderina que demostramos en tejido duodenal en condiciones basales, confirma el balance normal de Fe de los animales, destacando la ausencia de Fe de depósito.

En el estudio de la expresión duodenal de DMT1 en Anemia, la marcada expresión apical de DMT1 observada por nosotros coincide con estudios en ratones con una dieta deficiente en Fe, una condición de alta demanda de Fe (Cannone-H F et al., 1999; Oates PS et al., 2000). Resultados similares reportados por Latunde-Dada GO et al (2006), podrían confirmar que el patrón de expresión de DMT1 obtenido en nuestro modelo de Anemia reflejaría su función absorbente del Fe dietario.

La expresión apical de DMT1 que hemos observado en la Anemia podría indicar que la regulación de este importador sería dependiente de los niveles de Fe. Se ha descrito en la literatura que la presencia de un Elemento de Respuesta al Hierro (IRE) en el ARNm de ciertas proteínas interacciona con alta afinidad con una proteína citoplasmática llamada Proteína Reguladora de Hierro (IRP), y que dicha unión varía en función de la disponibilidad de Fe (Theil EC et al., 1998). Por este motivo, los bajos niveles de Fe asociados a la Anemia facilitarían la asociación de IRE-IRP en el ARNm de DMT1, favoreciendo la estabilización del transcrito de DMT1 y aumentando su expresión (Canonne-Hergaux F et al., 1999). El mecanismo de la regulación de la expresión de DMT1 mediado por la interacción IRE-IRP podría explicar la marcada expresión de DMT1 que hemos hallado en la Anemia, debido a que el anticuerpo que hemos utilizado reconoce ambas isoformas de DMT1.

El Fe observado por nosotros en enterocitos en la anemia aguda, podría ser atribuido a la conocida expansión de la superficie duodenal absorbente en la Anemia Hemolítica como mecanismo adaptativo para incrementar la captación de Fe en el borde en cepillo (Latunde-Dada GO et al., 2006).

Es interesante analizar el perfil temporal de la expresión duodenal de DMT1 en nuestro modelo de Anemia, ya que los principales cambios ocurrieron 5 días después de iniciada la inducción de Anemia Hemolítica.

Estos resultados podrían ser explicados por el modelo de programación de células de la cripta descrito por Trinder D et al (2000). Según este modelo, el tiempo que tardan en producirse los cambios en la expresión duodenal de DMT1 sería el tiempo necesario para que los enterocitos inmaduros de la cripta detecten bajos niveles de Fe (Weintraub LR et al., 1964; Linder MC et al., 1977). Se postula que luego, estos enterocitos

adquieren las proteínas necesarias para la absorción de Fe y migran hacia la vellosidad para diferenciarse en células capaces de absorber Fe (Trinder D et al., 2000).

Estudios posteriores aportan nuevas evidencias sobre la regulación de la expresión de proteínas del Fe, señalando que las señales que modifican la absorción de Fe estarían mediadas por Hefcidina, afectando en forma directa a los enterocitos maduros (Frazer DM et al., 2003). En este sentido, nuestros resultados sobre la expresión temporal de DMT1 en la anemia hemolítica coinciden con lo reportado por Frazer DM et al (2004), quienes han demostrado mayor expresión duodenal de DMT1 el día 5 de la anemia, evidenciando además bajos niveles de Hefcidina hepática y baja absorción de Fe.

Frazer DM et al (2004) han propuesto que el tiempo necesario para que se produzcan cambios en la absorción duodenal de Fe luego del tratamiento con FHZ, coincide con el tiempo necesario para alterar la expresión de Hefcidina. De este modo, una vez que los niveles circulantes de Hefcidina se modifican, los cambios en la absorción de Fe se producen en forma rápida.

Esto da origen a un nuevo modelo para la absorción de Fe, que explica los cambios en la expresión de proteínas del metabolismo del Fe en dos etapas: por un lado, el transporte de Fe a través de la superficie duodenal apical sería modulado por el estado del Fe del enterocito. Por otro lado, el flujo de Fe por la cara basolateral estaría regulado por hormonas sistémicas como Hefcidina (Wessling-Resnick M 2006). Este modelo en dos etapas ha sido avalado por la influencia que ejerce el contenido luminal de Fe en la expresión duodenal de DMT1, el cual es inhibido luego de la administración intragástrica de altas dosis de Fe, sin cambios en la expresión de Ferroportina y de su ARNm (Frazer DM et al., 2003).

El bajo pH de la superficie de la mucosa de los enterocitos reportado previamente, favorecería la actividad de DMT1 en condiciones basales y en Anemia, dado que se ha descrito que su funcionalidad es óptima a pH ácidos (Gunshin H et al., 1997; Trinder D et al., 2000).

Tejido Hepático

En las últimas décadas se realizaron importantes avances en el estudio del metabolismo del Fe en el hígado, que posibilitaron ampliar nuestro conocimiento sobre

proteínas importadoras y exportadoras que conforman la ruta del Fe. Uno de los principales tipos celulares del hígado son las células de Kupffer pertenecientes al Sistema Retículo Endotelial. Estas células son el principal sitio de almacenamiento del Fe (Graham RM et al., 2007), por lo que el hígado es sin duda un órgano clave que permite evaluar estados asociados a la disfunción del balance de Fe, tanto en su déficit como en la sobrecarga de este metal.

Se han descrito diversas proteínas asociadas al transporte y regulación del Fe en hígado, siendo el Transportador de Metales Divalentes 1 una proteína clave en las vías de ingreso de Fe (Trinder D et al., 2000). Si bien DMT1 ha sido estudiada en el tejido hepático, no están totalmente aclarados los cambios en la expresión hepática de DMT1 en estados de alta demanda de Fe como la Anemia Aguda.

En este sentido, la identificación hepática de DMT1 y la marcada expresión en hepatocitos observada por nosotros en animales sin tratar, confirma la participación del este órgano en el mantenimiento de la homeostasis de Fe del organismo (Graham RM et al., 2007).

Es sabido que existen dos isoformas del ARNm de DMT1 originadas a partir del corte alternativo en el extremo 3' del ARNm: la Isoforma I, que posee un Elemento de Respuesta al Hierro (IRE), y la Isoforma II carente de dicho elemento (Lee PL et al., 1998). La presencia de la secuencia IRE favorece la interacción del ARNm con una proteína citoplasmática llamada Proteína Reguladora de Hierro (IRP). Se ha postulado que en deficiencia de Fe, la secuencia IRE se uniría a IRP, favoreciendo la estabilización del transcripto y la transcripción de la proteína (Gunshin H et al., 1997; Oates PS et al., 2000).

La localización intracelular de DMT1, y su asociación con la membrana plasmática observada en algunos hepatocitos en condiciones basales, pueden explicarse teniendo en cuenta las isoformas de DMT1. Estudios comparativos de las isoformas de DMT1 indican la localización diferencial del transportador. Se postuló que la isoforma IRE estaría localizada principalmente en la membrana plasmática y presentaría baja cinética de internalización (Lam-Yuk-Tseung S 2006). En cambio, se ha descrito que la isoforma no-IRE, asociada a compartimentos endosomales y lisosomales, participaría en la liberación de Fe al citoplasma para satisfacer las actividades metabólicas de la célula y/o para su almacenamiento en forma de Ferritina (Lam-Yuk-Tseung S 2006). Esta descripción sobre la localización de DMT1 dependiente de la isoforma, explicaría la

distribución subcelular hallada en nuestro estudio donde no solo observamos localización intracelular sino también expresión en membrana. Este patrón de expresión de DMT1 podría deberse a las características del anticuerpo primario utilizado, dado que reconoce ambas isoformas del transportador.

Respecto a la distribución de DMT1 en el parénquima hepático en condiciones basales, la evidente localización de DMT1 asociada a las grandes venas observada en condiciones basales, revela la estrecha relación entre estructura y función de los sistemas orgánicos. La estructura del hígado presenta características hemodinámicas con un flujo arterial y portal en contracorriente respecto a la vena central. Debido a esta estructura, la vena central posiblemente reciba sangre con menos contenido de Fe y oxígeno, ya que estos nutrientes han sido captados en su trayectoria por los sinusoides para satisfacer la actividad metabólica de las células hepáticas (Graham RM et al., 2007). Los bajos niveles de Fe sentidos en hepatocitos cercanos a grandes venas como la vena central, podrían ser un estímulo para la expresión de DMT1 en estas células.

Otra hipótesis respecto a la distribución de DMT1 en el hígado, está relacionada con la existencia de mecanismos regulatorios dependientes de los niveles de oxígeno. En este sentido, es sabido que uno de los elementos más importantes en respuesta a la hipoxia es el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) (Semenza GL et al., 2001). Se ha descrito que en condiciones de hipoxia se evita la degradación de las subunidades HIF- α y HIF- β , favoreciendo la formación del complejo HIF- α /HIF- β , quien se une a elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) presentes en el gen de algunas proteínas. Se ha determinado que el promotor de DMT1 posee dos potenciales sitios de unión para HIF-1, lo que podría sugerir un aumento en la expresión de DMT1 cuando los niveles de oxígeno son bajos (Lee PL et al., 1998). Los bajos niveles de oxígeno sentidos en hepatocitos cercanos a grandes venas como la vena central, podrían ser un estímulo para la expresión de DMT1, lo que contribuiría a explicar la localización de DMT1 asociada a las grandes venas observada por nosotros. Las diferencias en la intensidad de marcación de DMT1 entre hepatocitos que identificamos en nuestros estudios, podrían reflejar diferencias intracelulares en los niveles de la proteína.

Un aporte interesante de nuestro estudio de DMT1 en hígado, fue lo observado en condiciones de Anemia Hemolítica. Bajo severa Anemia hemos observado una disminución en la inmunomarcación hepática de DMT1, que coincide con lo reportado por Trinder D et al (2000) en ratas deficientes en Fe. La menor expresión de DMT1

observada por nosotros en la anemia, podría deberse al aumento en la actividad eritropoyética observado en nuestro modelo de inducción de Anemia Hemolítica (Roque M et al., 2008), en el que el Fe podría ser utilizado para la formación de precursores eritroides a expensas de una menor captación hepática del metal para el mantenimiento del metabolismo celular.

Debido a la existencia de una secuencia IRE en el extremo 3' del transcrito de DMT1, bajos niveles de Fe favorecerían la unión IRE-IRP, resultando en la estabilidad del ARNm y el posterior aumento en la expresión de la proteína (Canonne-Hergaux F et al., 1999). Si bien este mecanismo regulatorio no explicaría los cambios en la expresión hepática de DMT1 observada por nosotros en la anemia aguda, la regulación de DMT1 parecería ser más compleja. En este sentido, es posible que el extremo 5' del transcrito de DMT1 o el dominio N-terminal de la proteína modifiquen el efecto regulatorio de IRE en forma tejida específica (Hubert N et al., 2002), como así también que la forma predominante de DMT1 en tejido hepático sea la isoforma no-IRE (Trinder D et al., 2000).

En la evaluación del Fe³⁺ en hígado se deduce que la ausencia de pigmentos de Fe³⁺ de depósito en condiciones basales es un resultado esperable en un estado de balance normal del Fe. Sin embargo, la presencia de algunos pigmentos de Fe³⁺ asociados a células de Kupffer el día 4 de la anemia podría deberse al elevado catabolismo del Hemo realizado por estas células fagocíticas como parte del mecanismo de remoción de eritrocitos dañados, actividad celular asociada a la masiva destrucción eritrocitaria inducida por FHZ (Latunde-Dada GO et al. 2006; Roque M et al., 2008).

Finalmente, el patrón de expresión hepática de DMT1 hallado en la etapa de recuperación de la Anemia (día 5), similar al observado en tejido de animales sin tratar, podría estar asociado a la menor demanda de Fe para la eritropoyesis, conduciendo al restablecimiento de las condiciones basales. Por otro lado, la localización del transportador en cercanías de grandes venas podría sugerir nuevamente la carencia de Fe que posee esta zona con respecto al resto del tejido hepático.

Tejido Esplénico

El tejido esplénico ha sido tradicionalmente asociado al balance de Fe por la presencia de células del Sistema Retículo Endotelial, que participan en los procesos de

catabolismo, almacenamiento y reciclaje del Fe a partir de eritrocitos senescentes o dañados (Delaby C et al., 2005). La presencia de pigmentos de Fe³⁺ localizados selectivamente en la pulpa roja esplénica en condiciones basales observada por nosotros, coincide con la descrita por otros autores, y estaría asociada con la conocida capacidad de las células del Sistema Mononuclear Fagocítico para captar y almacenar el Fe como mecanismo para mantener la homeostasis de este nutriente (Nicolas G et al., 2002).

A partir de estas evidencias nos hemos planteado estudiar el compromiso de DMT1 en el manejo esplénico del Fe en una situación fisiopatológica como la Anemia Hemolítica inducida por FHZ.

La identificación de DMT1 en tejido esplénico en condiciones basales realizada en nuestro estudio coincide con lo reportado por Hubert N et al (2002), quienes observaron expresión esplénica de ambas isoformas de DMT1 como así también una de las variantes originadas por el corte alternativo en el extremo 5' del ARNm.

Aunque se ha descrito la expresión esplénica de DMT1 en condiciones basales, los cambios en DMT1 esplénico asociados a la Anemia han sido poco estudiados (Latunde-Dada GO et al., 2006; Tchernitchko D et al., 2002). En este sentido, nuestros estudios constituyen un gran aporte al conocimiento de los cambios en la expresión esplénica de DMT1 bajo anemia severa.

La ausencia de cambios en la expresión de DMT1 observada por nosotros luego de la inducción de Anemia Hemolítica, muestra similitud con trabajos previos que no han detectado diferencias en la proteína y tampoco en el ARNm de DMT1 en bazo de roedores alimentados con dietas deficientes en Fe (Cannone-Hergaux F et al., 1999; Kim D et al., 2007). Sin embargo, Tchernitchko D et al (2002) han reportado un aumento en la isoforma no-IRE de DMT1 en tejido esplénico de animales tratados con FHZ, resultados difíciles de comparar con los nuestros debido a la especificidad del anticuerpo primario que hemos utilizado.

Respecto a los cambios estructurales esplénicos y similar a lo observado por Canonne-Hergaux F et al (2006), durante la Anemia detectamos una expansión en el compartimento eritroide en tejido esplénico, y pérdida de la típica organización del bazo. Esta expansión eritroide está íntimamente relacionada con las altas demandas eritropoyéticas inducidas en la Anemia aguda, donde es necesario disponer de Fe para satisfacer las demandas eritroides. Coincidiendo con esta demanda, en nuestro estudio

observamos una disminución en los depósitos esplénicos de Fe^{3+} durante la crisis hemolítica. La marcada actividad eritroide podría sugerir la liberación de Fe proveniente de células eritrofagocitadas, con el objetivo de satisfacer las demandas del metal.

Podemos concluir que nuestros resultados podrían estar indicando que DMT1 no desempeña un rol relevante en el bazo murino frente al estímulo hemolítico. Esto podría deberse a que los macrófagos esplénicos no actuarían como sitio de almacenamiento frente a la Anemia, sino que su principal función sería el reciclamiento de Fe proveniente de células dañadas y senescentes (Delaby C et al. 2005; Knutson MD et al. 2005). Por este motivo, DMT1 podría no ser necesario, ya que el ingreso de Fe a las células se produciría por mecanismos de fagocitosis.

Conclusión

En nuestros estudios hemos evaluado el compromiso hepático, duodenal y esplénico de DMT1 y su relación regulatoria con Prohepcidina, en un estado de alta demanda eritropoyética como la Anemia Hemolítica.

En el Diagrama 1 se integran las relaciones funcionales entre la eritropoyesis y proteínas del metabolismo del Fe en la Anemia Hemolítica.

La hemólisis severa inducida por FHZ descripta previamente se asociaría a un aumento en las demandas de Fe para satisfacer la actividad eritroide (Roque M et al., 2008). En respuesta a la demanda de Fe, DMT1 duodenal se traslocará a la membrana apical celular como mecanismo compensatorio para favorecer la absorción de Fe. La expresión apical de DMT1 en la anemia aguda parecería responder al nuevo modelo propuesto para absorción de Fe, en el que el transporte de Fe a través de la superficie duodenal apical sería modulado por el estado del Fe más que por señales sistémicas.

Prohepcidina, el regulador negativo de la absorción de Fe, disminuirá su expresión en respuesta a las elevadas demandas de Fe. Es sabido que frente a elevados niveles de Hepsidina se produce la interacción Hepsidina-FPN, con la consecuente internalización de FPN y el bloqueo de la transferencia de Fe al plasma. La baja expresión de Prohepcidina en la Anemia sugiere la activa exportación basolateral de Fe aumentando el Fe biodisponible para la actividad eritropoyética.

Para satisfacer las necesidades del Fe biodisponible también disminuirá la expresión hepática de DMT1. De esta forma disminuiría la captación y el almacenamiento hepático de Fe para aumentar la disponibilidad de Fe y satisfacer la demanda eritroide.

La conocida actividad eritrofagocítica esplénica es clave en la remoción de los eritrocitos dañados y la recuperación del Fe proveniente de los eritrocitos, lo que podría sugerir escaso compromiso del importador de DMT1 en la captación esplénica de Fe.

Podemos concluir que nuestros estudios nos permitieron profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en la homeostasis del Fe, indicando que frente a la Anemia Hemolítica inducida por FHZ, el balance del Fe y la recuperación de la anemia serían regulados mediante la acción coordinada de Prohepcidina y DMT1 en diversos sistemas orgánicos.

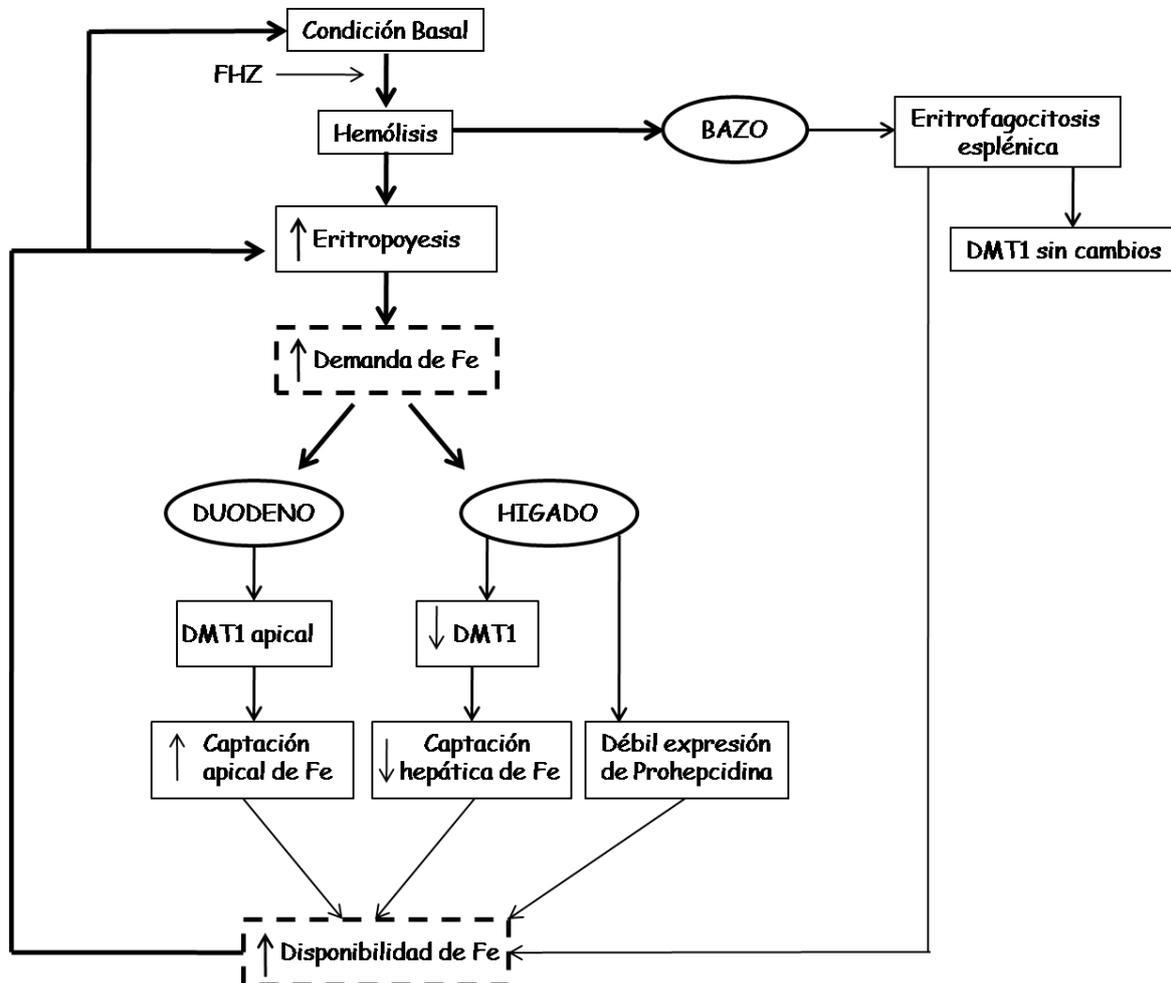


Diagrama 1. Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Anemia Hemolítica. En respuesta a la Anemia Hemolítica, DMT1 duodenal se trasloca a membrana apical para favorecer la absorción de Fe, mientras que en hígado disminuye la expresión de DMT1 para disminuir la captación hepática de Fe. La débil expresión de Prohepcidina hepática favorece la disponibilidad de Fe para la eritropoyesis.

La Sobrecarga de Fe es una condición clínica de gran importancia que se asocia con la acumulación progresiva de Fe en células del Sistema Retículo Endotelial (Hershko C et al., 1998). Debido a la conocida capacidad del Fe para catalizar la formación de radicales libres, la acumulación tisular de Fe conduce al daño del tejido e incluso a la falla del órgano (Halliwell B et al., 1992).

A partir de lo expuesto, consideramos de gran relevancia determinar el patrón de expresión de proteínas del metabolismo del Fe como Prohepcidina y DMT1 en Sobrecarga de Fe, estudiando tejidos relacionados con el balance de este nutriente. De esta manera, nuestros estudios contribuirán al esclarecimiento de algunos interrogantes sobre la regulación del balance del Fe en estados de exceso del metal.

Prohepcidina en Sobrecarga de Fe

Pigeon C et al (2001) demostró por primera vez la expresión del gen de Hecpcidina (HAMP) en tejido hepático de ratón, evidenciando además que su síntesis era estimulada por exceso de Fe. Desde entonces, Hecpcidina ha sido considerada un regulador negativo de la absorción de Fe y una molécula clave en diversas alteraciones del metabolismo del Fe de importancia médica como la deficiencia y la sobrecarga de Fe.

En este sentido, en los últimos años ha habido profundos avances en el estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de Hecpcidina dependiendo del estado de Fe del organismo. Recientemente Nemeth E et al. (2004) ha determinado que la Hecpcidina liberada desde el hígado se uniría a Ferroportina duodenal induciendo la internalización y degradación lisosomal del exportador de Fe, bloqueando así la vía de transferencia de Fe desde el enterocito al plasma.

La marcada expresión hepática de Prohepcidina hallada por nosotros en Sobrecarga de Fe coincide con lo reportado inicialmente por Pigeon C et al (2001), quienes demostraron elevados niveles hepáticos del ARNm de Hecpcidina en un modelo murino de Sobrecarga de Fe. En este sentido, nuestros resultados también son similares a los reportados en ratones knock-out para la proteína $\beta 2$ -microglobulina, un modelo animal similar a la hemocromatosis, donde se hallaron elevados niveles del ARNm de Hecpcidina hepática (Pigeon C et al., 2001). Estos resultados reflejan claramente el patrón de expresión esperado para una molécula conocida por su capacidad de regular

negativamente la absorción de Fe (Nicolas G et al., 2001; Ganz T et al., 2006; Nicolas G et al., 2002c).

Por otro lado, si bien existen diversos estudios que muestran al hígado como principal sitio de síntesis de Hefpidina (Park CH et al., 2001; Nicolas G et al., 2002a), poca información existe sobre la localización celular de este péptido frente a la Sobrecarga de Fe. En este sentido, nuestro trabajo aporta novedosos resultados mediante el uso de una técnica inmunohistoquímica, ya que la identificación de la proteína en el interior celular observada por nosotros podría indicar su tránsito y participación en el manejo del Fe intracelular.

Si bien nuestros resultados sobre la expresión intracelular de Prohepcidina no coinciden con lo reportado por Kulaksiz H et al (2004), son consistentes con lo descrito por Wallace et al (2006), quienes identificaron Prohepcidina en organelas de los hepatocitos, principalmente en el aparato de Golgi, sugiriendo que la proteína sería acumulada previamente a recibir la señal para su liberación. Por otro lado, las diferencias en la densidad de la inmunomarcación que hemos observado en diferentes células hepáticas podrían reflejar diferencias en los niveles de expresión de la proteína (Kulaksiz H et al., 2004).

La regulación de la expresión hepática de Hefpidina ha sido profundamente estudiada en la última década. Si bien se han identificado vías directas e indirectas que regulan la expresión de Hefpidina, aún no se conocen totalmente los mecanismos que modulan la comunicación celular en estados de Sobrecarga de Fe.

En este sentido, Nemeth E et al (2008) han propuesto que en exceso de Fe, cuando la concentración de Tf-diférrica es alta, el complejo Fe-Tf se uniría al RTf1 y al RTf2. Como resultado, el RTF2 sería estabilizado y HFE se disociaría del RTf1 para unirse al RTf2. De esta manera, el complejo HFE-RTf2 interaccionaría con la HJV, evitando el desprendimiento de HJV y disminuyendo los niveles de HJV soluble (HJVs), quien ha sido descrita como antagonista de la vía de señalización mediada por la proteína morfogenética ósea (BMP) (Lin L et al., 2005; Zhang AS et al., 2005). De esta manera, bajos niveles de HJVs resultarían en la activación de la cascada de señalización mediada por BMP. En este sentido, se postula que BMP se uniría a receptores serina-treonina kinasa, lo que conduciría a la fosforilación de RSmad. Esto favorecería la unión de RSmad con Smad4 formando un complejo que traslocaría al núcleo y activaría la

transcripción del gen de Hepsidina (Massague J et al, 2005; De Domenico I et al., 2007; Babitt JL et al., 2007).

Sin embargo, aunque la mayoría de las hipótesis planteadas consideran que la regulación del gen HAMP se produce principalmente a nivel transcripcional, se han realizado pocos estudios sobre la influencia del promotor del gen. En este contexto, se ha determinado que C/EBP α , un factor de transcripción altamente expresado en hígado, tiene la capacidad de unirse al promotor de HAMP río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los aumentos de C/EBP α hallados en Sobrecarga de Fe modularían los niveles del ARNm de Hepsidina (Courselaud B et al., 2002).

Si bien es conocida la relación entre Hepsidina y Sobrecarga de Fe, hasta el momento se han podido establecer pocas relaciones entre la proteína e índices claves de la Sobrecarga de Fe. En este contexto, nuestro trabajo muestra una fuerte relación directa entre la abundante expresión de Prohepsidina y los elevados niveles de Fe plasmático y de Fe hepático total. Sin embargo, la falta de relaciones contundentes entre Hepsidina y otros parámetros alterados en Sobrecarga de Fe dificultan aún más la comprensión de los complejos mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de Hepsidina.

Podemos concluir que nuestros resultados no sólo muestran elevada expresión de Prohepsidina en Sobrecarga de Fe, sino que además muestran el patrón de distribución intracelular de la proteína mediante una técnica inmunohistoquímica, resultados novedosos en un modelo con elevados depósitos de Fe. De esta forma, nuestro trabajo contribuye al estudio de la relevancia que posee la Hepsidina como mediador en la regulación del Fe en patologías que cursan con excesos del metal.

Transportador de Metales Divalentes 1 en Sobrecarga de Fe

Como se describió anteriormente, el Transportador de Metales Divalentes 1 es un importador de Fe, conocido por su participación en la captación de Fe en la membrana celular como así también por su participación en el manejo intracitoplasmático del Fe (Gunshin H et al., 1997; Gruenheid S et al., 1999).

En este sentido, en las últimas décadas ha crecido el interés por el conocimiento del rol que DMT1 desempeña en patologías con alteraciones en el balance del Fe. Por este

motivo nos propusimos determinar el patrón de expresión de DMT1 y su regulación en tejidos con compromiso en el balance del Fe frente a la Sobrecarga de Fe.

Tejido Duodenal

Aunque algunos trabajos han descripto la expresión duodenal de DMT1 en animales alimentados con dietas suplementadas en Fe (Dupic F et al., 2002; Frazer DM et al., 2003), nuestros resultados aportan información sobre la expresión del transportador luego de la inducción de sobrecarga de Fe por administración parenteral de Fe-Dextrán.

Dado que hasta el presente no se ha descripto el patrón de expresión de DMT1 en vellosidades duodenales en Sobrecarga de Fe por técnica inmunohistoquímica, nuestros resultados resultan interesantes ya que evidencian el transportador en el interior celular. La localización intracelular de DMT1 hallada en los enterocitos en Sobrecarga de Fe podría explicarse por el modelo de absorción de Fe, según el cual el transporte de Fe a través de la superficie duodenal apical sería modulado por el estado del Fe del enterocito (Frazer DM et al., 2004). En este sentido, los elevados niveles de Fe asociados a la Sobrecarga serían detectados por los enterocitos duodenales y constituirían una señal para evitar la absorción de Fe, por lo que DMT1 se localizaría en el citoplasma celular.

La expresión intracelular de DMT1 podría explicar la ausencia de Fe³⁺ en el interior de los enterocitos que hemos observado en Sobrecarga de Fe, lo que refuerza la hipótesis de una baja tasa de absorción intestinal de Fe debido a los elevados depósitos existentes. Por otro lado, los abundantes depósitos de Fe³⁺ observados en tejido conectivo duodenal coinciden con lo reportado por otros autores; y podrían sugerir que células de la lámina propia actuarían como células fagocíticas, almacenando el exceso de Fe para su liberación frente a aumentos en las demandas del metal (Makoto A et al., 1984; Conte D et al., 1987).

Por otro lado, la ausencia de cambios en la expresión duodenal de DMT1 observada por nosotros en Sobrecarga de Fe respecto a las condiciones basales, muestra diferencias con lo reportado por otros autores, quienes han observado una disminución en la expresión duodenal de DMT1 en ratones alimentados con dietas suplementadas en Fe (Canonne-Hergaux F et al., 1999). Se ha descripto además una disminución en la expresión génica de la isoforma +IRE de DMT1 en ratas con dosis intragástricas de Fe

(Frazer DM et al., 2003). Las diferencias halladas en la expresión duodenal de DMT1 respecto a otros estudios, podrían deberse a diferencias metodológicas y la especificidad del anticuerpo primario utilizado, dado que en nuestro caso hemos trabajado con un anticuerpo que reconoce la isoforma +IRE y -IRE.

A partir de los resultados sobre la expresión duodenal de DMT1 en Sobrecarga de Fe, podemos concluir que nuestros estudios contribuyen al conocimiento de las relaciones regulatorias existentes entre DMT1 y el balance del Fe.

Tejido Hepático

Debido a la respuesta regulatoria de la expresión hepática de DMT1 en balance normal de Fe y en intensa demanda (Anemia Hemolítica), decidimos profundizar el estudio de la expresión hepática de DMT1 en un modelo de exceso de Fe.

Es sabido que en condiciones fisiológicas el Fe es transportado en el plasma por la Tf, mientras que en sobrecarga de Fe la capacidad de unión de Fe a Tf puede estar totalmente saturada, de manera que existe exceso de Fe circulante en forma de Fe no unido a Transferrina (NTBI) (Kohgo Y et al., 2008). Debido a la alta toxicidad que posee el NTBI el hígado sería un órgano clave en la captación del metal (Britton RS et al., 2002). Esto se produciría mediante el aumento en la tasa de captación hepática de Fe, que excedería la tasa de liberación (Randell EW et al., 1994; Trinder D et al., 2002). En este sentido, se ha propuesto que una de las principales proteínas encargadas de incorporar el NTBI al interior de los hepatocitos sería DMT1 (Shindo M et al., 2006).

Los mecanismos descritos anteriormente podrían explicar la elevada expresión hepática de DMT1 que determinamos en la Sobrecarga de Fe, coincidente con la reportada en estudios de otros autores (Trinder D et al., 2000). De esta manera confirmamos la actividad importadora de DMT1, cuya función sería captar Fe como mecanismo protector para evitar el daño oxidativo que podría generar el exceso de Fe libre.

Por otro lado, los abundantes pigmentos hepáticos de Fe³⁺ identificados en Sobrecarga de Fe coinciden con lo reportado por Theurl I et al (2005) y ponen en evidencia nuevamente la captación hepática de Fe. Los pigmentos de Fe³⁺ en el hígado sugieren la saturación de Fe unido a Ferritina, incrementándose así los depósitos de Fe

no asociados a proteína, conocidos como Hemosiderina. Debido a la abundante Hemosiderina hallada y a los elevados niveles de Fe circulantes asociados a la Sobrecarga de Fe, los pigmentos de Fe³⁺ hepáticos podrían provenir no sólo del Fe unido a Transferrina sino además de la captación de Fe no unido a Transferrina, que es abundante en estados de Sobrecarga del metal (Luizzi J et al., 2006).

La localización intracelular de DMT1 en los hepatocitos podría sugerir el tráfico de DMT1 entre el citosol y la superficie celular, favoreciendo la captación de Fe en una primera etapa y su posterior liberación al interior celular para su almacenamiento. Esta hipótesis coincidiría con las distintas vías de manejo del Fe en los hepatocitos en las que DMT1 ha sido involucrado (Graham RM et al., 2007).

La asociación de DMT1 con hepatocitos cercanos a grandes venas como la vena central, podría indicar un mecanismo regulatorio de DMT1 dependiente de Fe. En este sentido, como se mencionó anteriormente, debido a la organización estructural del hígado se ha sugerido que el Fe es distribuido en los hepatocitos en un gradiente que disminuye desde la tríada portal a la zona centrolobulillar. De esta forma, aun en estado de Sobrecarga de Fe, la vena central recibiría sangre con menos contenido de Fe y oxígeno, ya que la mayoría de los nutrientes habrían sido captados en su trayectoria por los sinusoides (Graham RM et al., 2007). Por este motivo, las demandas de Fe requeridas para satisfacer las necesidades metabólicas de los hepatocitos probablemente sean mayores en cercanías a las grandes venas, lo que explicaría la marcada expresión de DMT1 observada por nosotros en esas zonas, aún en estado de sobrecarga de Fe.

Tejido Esplénico

Aunque en nuestros estudios sobre la participación de DMT1 en el manejo esplénico del Fe no evidenciamos cambios frente a la Anemia Hemolítica, nos propusimos estudiar la expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe debido a la conocida capacidad de captación y almacenamiento de Fe que poseen las células del Sistema Retículo Endotelial (Hershko C et al., 1998).

Nuestros estudios sobre el patrón de expresión de DMT1 en bazo con Sobrecarga de Fe resultan novedosos por ser los primeros en evidenciar la expresión esplénica de

DMT1 mediante un técnica inmunohistoquímica, identificando con precisión las células que expresan DMT1. En este sentido, previamente sólo se ha reportado la presencia de DMT1 en bazo por una técnica cuantitativa (Hubert N et al., 2002).

La ausencia de cambios que hemos determinado en la expresión esplénica de DMT1 en Sobrecarga de Fe respecto a la condición basal no coincide con la disminución en los niveles esplénicos del ARNm de DMT1 en sobrecarga de Fe reportada por Theurl I et al (2005). En este sentido, las diferencias en la expresión de DMT1 halladas con respecto a lo reportado por Theurl I et al (2005) podrían deberse a cuestiones metodológicas, ya que en nuestros estudios hemos detectado la expresión de la proteína y no el ARNm.

La ausencia de cambios en la expresión esplénica de DMT1 observada por nosotros en Sobrecarga de Fe con respecto a la condición basal, podría sugerir poca actividad del transportador frente a elevados niveles de Fe. En este sentido, la conocida capacidad de los macrófagos esplénicos para captar el Fe por mecanismos de fagocitosis, podría ser la causa del poco compromiso del importador de Fe en el bazo.

El aumento en los pigmentos de Fe³⁺ hallado en el tejido esplénico de animales con Sobrecarga de Fe respecto al tejido de animales sin tratar coincide con lo reportado por Theurl I et al (2005) y confirma el rol fundamental que desempeña el bazo en la regulación del balance del Fe. En este sentido es sabido que el bazo posee elevados niveles de Ferritina, cuya síntesis es regulada post-transcripcionalmente (Kohgo Y et al., 2008). Frente a una sobrecarga de Fe se produce la interacción de IRE con IRP, promoviendo la estabilidad del ARNm de Ferritina y la activación de la síntesis de la proteína, como mecanismo adaptativo para almacenar el Fe libre y evitar el daño celular que causaría éste (Harrison PM et al., 1996). Sin embargo, cuando el exceso de Fe es aún mayor, el metal no sólo se halla unido a Ferritina sino que además se deposita como hemosiderina. Esto podría explicar los abundantes pigmentos esplénicos de hemosiderina observado por nosotros en Sobrecarga de Fe respecto a lo observado en condiciones basales.

Conclusión

En coincidencia con lo que hemos hallado en el modelo de Anemia Hemolítica, a partir de nuestros resultados podemos sugerir que en la Sobrecarga de Fe también se

evidencian mecanismos regulatorios que modulan la expresión de DMT1 y Prohepcidina en tejidos claves del balance del Fe.

En el Diagrama 2 se detallan las relaciones regulatorias entre DMT1 y Prohepcidina en Sobrecarga de Fe.

La inducción de Sobrecarga de Fe produce elevados niveles de Fe circulante y de depósito. En respuesta al exceso de Fe, DMT1 duodenal mantendría expresión intracelular, lo que limitaría la absorción intestinal de Fe. Los elevados niveles de Fe también podrían ser detectados en el hígado, donde aumentará la expresión de DMT1, lo que sugiere una elevada tasa de captación de Fe para disminuir la toxicidad que podría causar el exceso de metal libre. El rol de DMT1 en hígado sería confirmado por los abundantes pigmentos hepáticos de Fe³⁺ observados.

En el hígado también aumentará la expresión de Prohepcidina. Es posible que en Sobrecarga de Fe, Hepsidina se una a Ferroportina duodenal produciendo la internalización y degradación lisosomal del exportador de Fe. De esta forma, disminuirá la salida de Fe hacia la circulación sistémica, con la consecuentemente menor captación de Fe desde la cara apical.

El bazo también será clave en la captación y el almacenamiento de Fe mediante procesos de fagocitosis, lo que podría sugerir escasa participación de DMT1 en la captación esplénica de Fe.

Podemos concluir que el efecto regulatorio de Prohepcidina, y la acción coordinada de DMT1 en hígado, duodeno y bazo, disminuirán la absorción de Fe y aumentarán la captación y el almacenamiento hepático del metal, como una respuesta fisiológica para disminuir el exceso de Fe, intentando restablecer las condiciones basales.

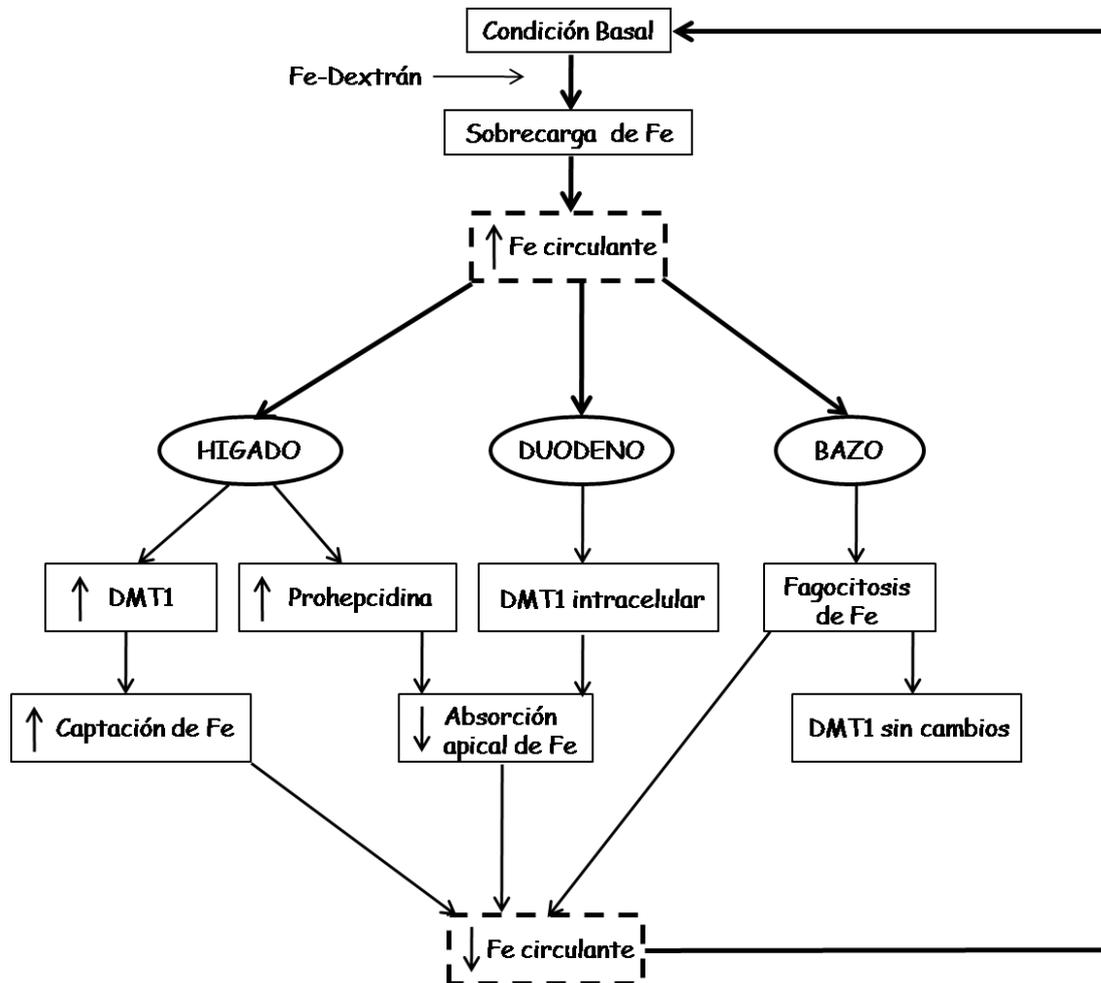


Diagrama 2. Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Sobrecarga de Fe. En respuesta al exceso de Fe DMT1 duodenal mantiene expresión intracelular y DMT1 hepático aumenta su expresión. Esto produce baja absorción duodenal de Fe y elevada captación hepática del metal. El aumento en la expresión hepática de Prohepcidina contribuye la regulación negativa de la absorción de Fe.

Modelo de Acople: Inducción de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica

En los estudios descriptos sobre la identificación y regulación de la expresión de proteínas del metabolismo del Fe, hemos evidenciado DMT1 y Prohepcidina en la regulación del Fe en hígado y duodeno. En este sentido, estímulos bien caracterizados como la Anemia Hemolítica y la Sobrecarga de Fe han modulado la expresión de DMT1 y Prohepcidina, como mecanismo regulatorio para compensar el desbalance de Fe.

En esta etapa, nos propusimos avanzar en el conocimiento de los mecanismos regulatorios y funcionales entre Prohepcidina y DMT1 en una condición de alta demanda (Anemia Hemolítica), con exceso de Fe previo. Por otro lado, debido a la conocida asociación entre el balance del Fe y la actividad eritropoyética, también nos propusimos establecer relaciones entre Eritropoyetina y Hepcidina, a fin de determinar su compromiso en la regulación del balance del Fe.

Para poder abordar este estudio, fue de gran utilidad el uso de nuestro modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia Hemolítica. Este modelo nos permitió interrelacionar las proteínas, reproduciendo un estado patológico en el que coexisten elevados niveles de Fe con alta demanda del metal.

Nuestros estudios se focalizaron en la identificación DMT1 y Prohepcidina cuando existen en forma simultánea dos estímulos antagónicos para la expresión de Hepcidina: Sobrecarga de Fe y Anemia. De esta manera, intentamos establecer relaciones regulatorias entre Prohepcidina, DMT1 y el estado del Fe del organismo.

Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe

Antes de iniciar la discusión del modelo acoplado, introduciremos brevemente aspectos claves del diseño experimental de este modelo de disfunción. La identificación y localización de Prohepcidina en este apartado, y de DMT1 en el siguiente, se estudió en dos estados de disfunción: 1) Sobrecarga de Fe; 2) Sobrecarga de Fe más Anemia. El primer estado, Sobrecarga de Fe, se analizó en previamente en este capítulo. El segundo estado, no analizado hasta el presente, se introduce a continuación.

A partir de los cambios de expresión de Prohepcidina observados en situaciones de Sobrecarga de Fe y de Anemia Hemolítica, nos planteamos determinar su patrón regulatorio en condiciones fisiopatológicas definidas por la coexistencia de balance normal de Fe, con alta demanda, y de exceso de Fe.

La expresión hepática de Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe avala el rol clave que desempeña Prohepcidina en la homeostasis del Fe descrito en otros estudios previos (Nicolas G et al., 2001; Ganz T et al., 2006). La respuesta regulatoria de Prohepcidina se refleja claramente en los cambios de su expresión hepática en Anemia Hemolítica (moderada) y en Sobrecarga de Fe (intensa).

A partir de estos resultados, se podría postular que el Fe en exceso sería la señal predominante que regula a Prohepcidina por un mecanismo a nivel transcripcional. En este sentido, de acuerdo a lo descrito por Nemeth E et al (2008), la elevada concentración de Tf-diférrica favorecería la unión Fe-Tf al RTf1 y RTf2. Como consecuencia, RTF2 sería estabilizado y HFE se disociaría del RTf1 para unirse al RTf2. De esta manera, el complejo HFE-RTf2 interaccionaría con la HJV, evitando el desprendimiento de HJV y disminuyendo los niveles de HJVs. Esto sería el paso inicial para la activación de vía intracelular mediada por BMP y la transcripción de Hpcidina (Lin L et al., 2005; Zhang AS et al., 2005).

De la expresión de Prohepcidina hepática en el modelo acoplado surgirían aspectos funcionales de importancia por su relación regulatoria con Eritropoyetina. El diseño del modelo de acople fue innovador porque creó condiciones fisiopatológicas adecuadas para inducir el aumento simultáneo de Prohepcidina y Epo, definiendo la siguiente interrelación funcional y regulatoria: en respuesta a la señal “exceso de Fe” aumentó la expresión de Prohepcidina y en respuesta a la señal “alta demanda” de la anemia, aumentó la expresión de Epo.

Nuestros estudios permitieron identificar selectivamente los hepatocitos que sintetizan Hpcidina, y mostraron que Prohepcidina no colocaliza con hemosiderina en células de Kupffer. Por otro lado, la expresión intracelular Prohepcidina en hepatocitos, en Anemia con Sobrecarga de Fe, fue similar a la reportada en condiciones basales. Otros autores la identificaron principalmente en el aparato de Golgi (Wallace et al., 2006). En este sentido, la localización de Prohepcidina intracelular que hemos observado es consistente con lo esperado para una molécula que es sintetizada y procesada en el interior de los hepatocitos, previo a su liberación al torrente sanguíneo.

Es importante destacar, que nuestros estudios reportan por primera vez una situación fisiopatología donde coexisten elevados niveles de Epo y marcada expresión hepática de Prohepcidina.

Hasta el presente no se ha determinado con precisión la relación funcional entre Prohepcidina y Hepsidina, su péptido activo. En la actualidad no hay evidencias que indiquen que los niveles séricos de Hepsidina, el péptido activo, no se relacionen en forma directa con la Prohepcidina tisular.

Las publicaciones de los grupos de investigación pioneros en este campo disciplinar avalan la existencia de una relación funcional estrecha entre Prohepcidina tisular y Hepsidina sérica (Kulaksiz H et al., 2004; Kulaksiz H et al., 2005; Wallace DF et al. 2005).

Transportador de Metales Divalentes 1 –DMT1- en Anemia con Sobrecarga de Fe

Tejido Duodenal

La expresión de DMT1 en duodeno en hemólisis aguda con Sobrecarga de Fe mostró localización intracelular del transportador, reflejando sus funciones específicas en el movimiento citoplasmático de Fe. El perfil de distribución de DMT1 en enterocitos duodenales en la Anemia con exceso de Fe, se conservó en la etapa de recuperación. Mientras que en Anemia sin Sobrecarga, DMT1 se traslocó a la membrana apical de enterocitos. De la relación entre los cambios en la distribución intracelular y la funcionalidad de la proteína, se podría postular que el exceso de Fe fue la señal que moduló la expresión de DMT1 en Anemia con Sobrecarga. En cambio, en Anemia sin Sobrecarga, la señal que genera el estímulo de intensa demanda eritropoyética de Fe, modularía la expresión duodenal de DMT1.

Esta hipótesis sería avalada por la abundante hemosiderina observada en duodeno en Anemia con Sobrecarga de Fe, aún los días de severa hemolisis, lo que sugiere un marcado exceso tisular de Fe aún cuando la demanda de Fe eritropoyético es intensa. La

localización del Fe^{3+} en el tejido conectivo duodenal sugiere nuevamente la capacidad de dichas células de fagocitar y almacenar el Fe (Conte D et al., 1987).

Debido a que la señal predominante sería el Fe en exceso, nuestros resultados podrían indicar que los enterocitos sensarían los niveles locales de Fe, y de esta forma regularían el transporte apical de Fe, similar a lo reportado por Frazer DM et al (2004). En este sentido, frente al exceso de Fe se limitaría la absorción duodenal del metal mediante la localización intracelular del importador de Fe DMT1.

También se ha propuesto que señales sistémicas como Hefcidina controlarían la absorción duodenal de Fe, mediante la regulación de la transferencia basolateral del metal. Se ha planteado que la Hefcidina hepática, cuando hay Fe en exceso, regularía negativamente la absorción intestinal de Fe mediante su unión a Ferroportina, causando la degradación del exportador de Fe y disminuyendo el egreso del Fe (Nemeth E et al., 2004).

La recuperación tardía de la Anemia con Sobrecarga podría estar relacionada con la ausencia de DMT1 en cara apical de enterocitos, que se interpreta como un mecanismo que limita y retarda la absorción duodenal de Fe. Como el Fe^{3+} del tejido conectivo proveniente de la inducción de Sobrecarga, tiene limitada biodisponibilidad por ser Fe no unido a proteínas, la recuperación de la Anemia con Sobrecarga de Fe dependerá de la utilización del Fe de compartimientos funcionales.

Tejido Hepático

La marcada expresión de DMT1 en tejido hepático de animales con Anemia y Sobrecarga de Fe pone de manifiesto una vez más la relevancia de este tejido en el balance del Fe.

Diversos estudios han demostrado que el exceso de Fe satura la capacidad de unión de Fe a Tf y aumenta la forma de NTBI, altamente tóxica (Kohgo Y et al., 2008).

De nuestros modelos de Sobrecarga y de Anemia, surgen cambios regulatorios y funcionales mediados por DMT1 en hígado. El aumento de la expresión de DMT1 con Sobrecarga se puede interpretar como un mecanismo regulatorio para aumentar la tasa de captación hepática de Fe. Mientras que en Anemia sin Sobrecarga, la baja expresión hepática de DMT1 respondería a un mecanismo de regulación que limitaría la captación

hepática de Fe. Por lo expuesto se desprende un rol funcional antagónico de DMT1 en Anemia y en Sobrecarga de Fe.

El perfil de distribución similar de DMT1 hepático en Sobrecarga y en Anemia Hemolítica con Sobrecarga, sugiere que el exceso de Fe es la señal que modula la expresión de este importador de Fe en hígado, aun en estado de intensa demanda eritropoyética. Nuestra interpretación funcional y regulatoria sería avalada por los depósitos de Fe³⁺ observados en anemia con Anemia con Sobrecarga. Estos pigmentos hepáticos de Fe³⁺ podrían provenir de la captación de Fe unido a Tf y del NTBI, una forma circulante de Fe conocida por aumentar frente a excesos del metal (Luizzi J 2006).

Nuestras evidencias experimentales mostraron que DMT1 no se expresa en la membrana basal; en todas las condiciones estudiadas su localización citoplasmática fue evidente. Sin embargo, a partir de estudios sobre la localización diferencial de las isoformas +IRE y -IRE de DMT1 en la membrana y en citoplasma, respectivamente, no descartamos el mismo comportamiento (Lam-Yuk-Tseung S et al., 2006, Gruenheid S et al., 1999). En base a lo descrito podríamos atribuirle un rol funcional en la movilidad subcelular.

Otro aspecto a destacar es la identificación de DMT1 en los hepatocitos cercanos a grandes vasos sanguíneos, que sugiere una estrecha relación estructural y funcional en la actividad importadora de Fe DMT1. Se conoce que las grandes venas del hígado reciben sangre con menor contenido de Fe, a pesar del exceso de este metal (Graham RM et al., 2007). Por este motivo, las demandas de Fe serían mayores, favoreciendo la expresión de DMT1 para la captación del Fe necesario para la actividad metabólica celular.

Tejido esplénico

De nuestros estudios sobre la expresión de DMT1 en el bazo surge que este órgano no cumple funciones relevantes en el proceso de captación de Fe en Anemia con Sobrecarga de Fe. Los abundantes depósitos de Fe³⁺ identificados provienen de la función hemocaterética de macrófagos esplénicos, mecanismo principal de captación eritrofagocítica para la reutilización o almacenamiento del Fe (Delaby C et al. 2005;

Knutson MD et al. 2005). De esta manera, el importador de Fe DMT1 no tendría un rol relevante en la incorporación de Fe en células esplénicas.

Conclusión

Nuestros estudios realizan un importante aporte sobre las relaciones regulatorias entre la eritropoyesis y el metabolismo del Fe en un modelo de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia.

En el Diagrama 3 se integran los mecanismos regulatorios que permiten la compensación del cuadro hemolítico, estableciendo relaciones entre Epo, Prohepcidina y DMT1.

En la Anemia con Sobrecarga de Fe, como mecanismo de compensación a la baja PO_2 generada por la intensa hemólisis, se producirá un aumento en la síntesis de Epo, una hormona clave para la producción eritroide. Además se generarán dos situaciones opuestas y bien definidas de desbalance de Fe en forma simultánea: por un lado exceso de Fe y por otro lado alta demanda de Fe para la eritropoyesis.

En respuesta al exceso de Fe, DMT1 duodenal mantendrá expresión intracelular, lo que limitará la absorción intestinal de Fe. El exceso de Fe también será detectado en el hígado, donde aumentará la expresión hepática de Prohepcidina, evidenciando un comportamiento similar al hallado en Sobrecarga de Fe sin Anemia, lo que podría indicar que el exceso de Fe sería un estímulo más potente que la demanda eritroide. De esta forma se ponen en evidencia dos puntos importantes: en primer término, la coexistencia de marcada expresión de Prohepcidina con elevados niveles de Epo; y en segundo término, que Prohepcidina hepática sería una señal capaz de regular negativamente la absorción duodenal de Fe, aún en un estado de Anemia. Se podría postular que Hepsidina se uniría a FPN, el exportador basolateral de Fe, favoreciendo su internalización y degradación. De esta forma se limitaría la salida de Fe desde el enterocito, y en forma indirecta se regularía el ingreso de Fe por la cara apical celular.

Como mecanismo adaptativo para la captación y almacenamiento hepático del exceso de Fe, se producirá un aumento en la expresión hepática de DMT1, que contribuirá con la disminución de los niveles circulantes del metal, altamente tóxicos

para el organismo. Estos cambios regulatorios evidencian nuevamente el predominio del estímulo inducido por la Sobrecarga de Fe.

Se producirá además, la acumulación de Fe Hemosiderina en el tejido conectivo duodenal, en bazo e hígado. Sin embargo, el Fe hemosiderina es Fe no unido a proteínas y por ello presenta baja biodisponibilidad. Por este motivo, aunque existe Sobrecarga de Fe, la carencia de Fe disponible para la eritropoyesis explicaría la recuperación tardía de la Anemia observada en Anemia con Sobrecarga, respecto a Anemia sin Sobrecarga de Fe.

Podemos concluir que los cambios regulatorios en la expresión de DMT1 en hígado y duodeno, y en la expresión hepática de Prohepcidina, responden principalmente al exceso de Fe y no a la señal Anemia. Se pone en evidencia además, que la participación coordinada de ambas proteínas es clave para la recuperación de la eritropoyesis y el mantenimiento de la homeostasis del Fe.

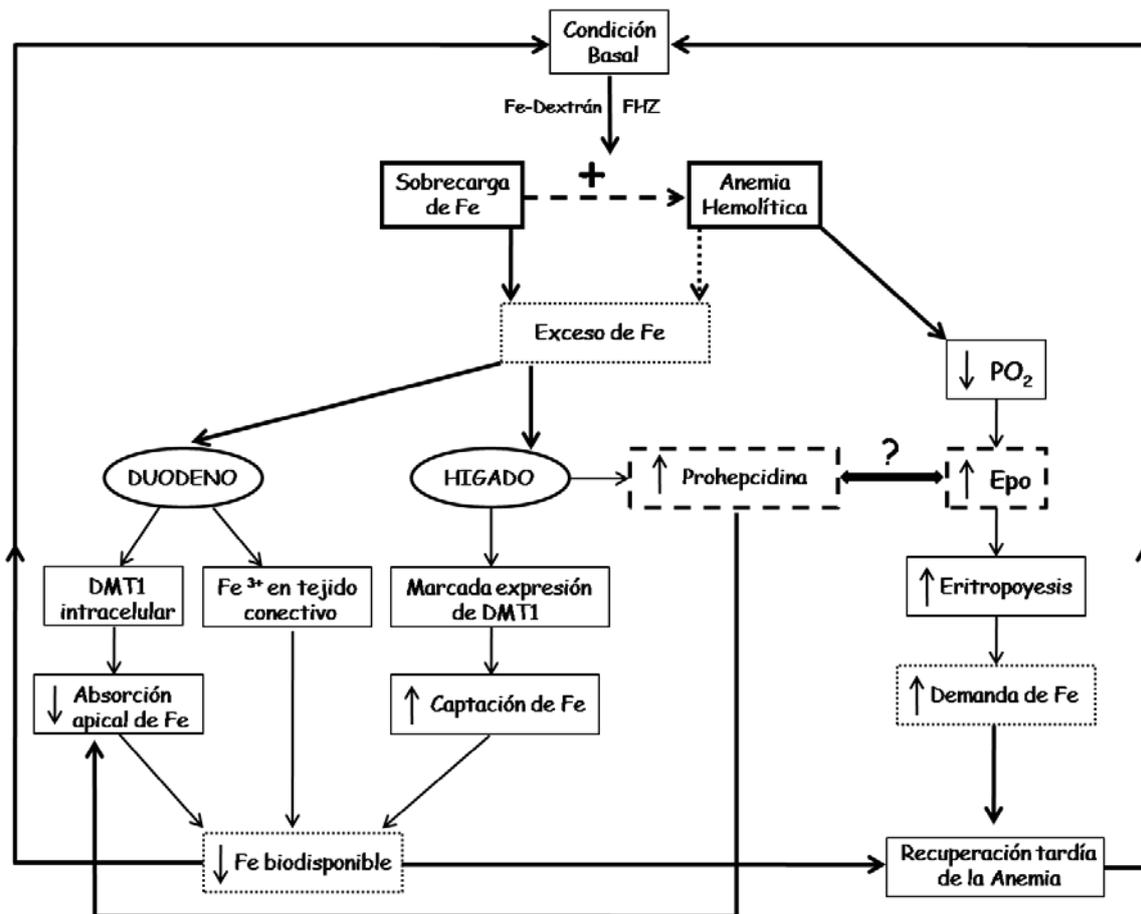


Diagrama 3. Regulación de Prohepcidina y DMT1 en Anemia con Sobrecarga de Fe. En respuesta al exceso de Fe, DMT1 duodenal mantiene expresión intracelular y DMT1 hepático aumenta su expresión, reduciendo la absorción duodenal de Fe y aumentando la captación hepática del metal. Coexisten Prohepcidina y Epo elevadas en respuesta al Fe y a la anemia, respectivamente.

CAPÍTULO III:

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RIÑÓN

El balance del Fe depende fundamentalmente de los procesos de ingestión, captación gastrointestinal y excreción renal. En este sentido, es sabido que en humanos sólo un 10 % del Fe consumido en la dieta es absorbido, aproximadamente 2 mg Fe/día, y que 0,08 mg Fe/día son excretados por vía renal (Smith LH et al., 1983). La función del riñón como órgano excretor de cationes ha sido ampliamente descrita por distintos estudios. Entre ellos, se conoce que el transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+2\text{Cl}^-$ interviene en la eliminación de K^+ y el intercambiador Na^+/Ca^+ y la bomba Ca^+ -ATPasa participan en la excreción de calcio (Smith LH et al., 1983). En relación al Fe aun no se han aclarado totalmente las bases moleculares que participan en su excreción renal (Wareing M et al., 2000).

De una revisión exhaustiva de la literatura, surge también que hasta el presente no ha sido totalmente aclarada la función del riñón como órgano que regula el metabolismo del Fe. Como antecedente podemos citar estudios realizados en mamíferos que reportaron la localización de Prohepcidina en riñón (Kulaksiz H et al., 2005; Veuthey T et al., 2008).

Dentro del marco del conocimiento sobre la estrecha relación entre la eritropoyesis y la función endocrina del riñón como tejido productor de Eritropoyetina, nos planteamos abordar el estudio de proteínas reguladoras del Fe como Prohepcidina y DMT1 en este órgano.

Nuestros estudios sobre Prohepcidina y el transportador de Metales Divalentes 1 en riñón fueron realizados en condiciones basales y en los modelos de disfunción desarrollados en nuestro grupo, que ya fueron presentados y analizados.

Por lo tanto, en este capítulo se discutirán situaciones fisiopatológicas que comprometen a la eritropoyesis y al metabolismo del Fe. Ellas son, en primer término, estado de alta demanda de Fe con suficiencia de Fe, Anemia Hemolítica, y en segundo término, estado de exceso de Fe.

Prohepcidina en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica

En relación a nuestros estudios que muestran claramente la expresión renal de Prohepcidina en condición basal, existe como antecedente un estudio realizado por Kulaksiz H et al (2005), que comparte similitudes y diferencias con nuestros resultados.

En nuestras condiciones experimentales descritas, donde se especificaron los criterios de inclusión que definen la “condición basal” (control) de los animales, identificamos Prohepcidina en el epitelio de túbulo corticales y medulares.

En nuestro estudio sobre la expresión de Prohepcidina en la médula renal interna pudimos comprobar una amplia distribución en el Asa de Henle (descendente y ascendente gruesa) y en los colectores. Sin embargo, no se identificó Prohepcidina en la médula externa. Este perfil de distribución medular de Prohepcidina, fue similar a otros estudios en lo que se refiere a la zona interna; mientras que no existen coincidencias en la identificación de Hecpidina la zona externa de la médula, donde se ha reportado su expresión (Kulaksiz H et al., 2005).

La localización intracelular de Prohepcidina en el epitelio de segmentos tubulares de la médula interna podría tener relevancia funcional, dado que presenta la misma ubicación descrita en los hepatocitos, principal sitio de síntesis de la proteína (Wallace DF et al., 2006). De este modo podemos sugerir que el hígado no sería el único órgano productor del péptido.

El patrón de expresión cortical de Prohepcidina en nuestras condiciones basales, identificada principalmente en el segmento S2 de túbulo proximal, presenta diferencias con estudios que la identifican principalmente en el túbulo contorneado distal cortical de roedores (Kulaksiz H et al., 2005). En este sentido, las diferencias halladas con estos estudios podrían deberse a diferencias entre especies estudiadas, y/o a la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Para la identificación de estructuras tubulares corticales renales utilizamos un criterio morfológico basado en las características del epitelio tubular. En este sentido, el túbulo proximal se identificó por su epitelio de células cúbicas y su distribución mayoritaria en la corteza. La diferenciación de los 3 segmentos de túbulo proximal se basó en su localización y su epitelio. Los segmentos S1 y S2 se localizaron principalmente en la corteza, muy cercanos a los glomérulos; mientras que los segmentos S3 se hallaron en el límite entre la corteza y la cara externa de la médula externa. Además, los segmentos S1 y S3 se caracterizaron por poseer lumen más angosto que los segmentos S2.

Los estudios sobre la expresión de Prohepcidina en riñón en Anemia Hemolítica fueron reportados por primera vez por nuestro grupo (Veuthey T et al., 2008). En Anemia, la expresión de Prohepcidina en el segmento S2 de túbulo proximales evidenció el mismo patrón de distribución que en condición basal. La disminución de la

expresión de Prohepcidina en la crisis hemolítica revela una correlación funcional y regulatoria inversa: a mayor demanda de Fe, menor expresión de Hepcidina.

Es importante destacar que en Anemia, Prohepcidina se asoció con la membrana basolateral. Esta localización de Prohepcidina en riñón podría ser la requerida para interaccionar con Ferroportina, molécula exportadora de Fe, tal como se describió en duodeno en balance normal de Fe (Nemeth E et al., 2004). De esta forma, luego de la interacción entre Hepcidina con FPN se produciría la internalización y degradación de FPN, regulando así la captación apical de Fe mediada por DMT1 (Nemeth E et al., 2004).

Extrapolando este mecanismo al tejido renal y a la condición Anemia, la expresión moderada de Prohepcidina en la membrana basolateral de túbulos proximales disminuiría el grado de interacción con FPN. En estas condiciones FPN no se degradaría, lo que favorecería la liberación celular de Fe, y por lo tanto, el aumento de captación renal de Fe mediada por DMT1, como mecanismo fisiológico de compensación de la Anemia.

Sin bien otros autores proponen la liberación luminal de Prohepcidina, la identificación de esta proteína en cercanías de la membrana basolateral en nuestras condiciones experimentales, sugiere que esta localización facilitaría la liberación de Prohepcidina a la circulación sanguínea (Kulaksiz H et al., 2005).

En nuestro estudio sobre la expresión de Prohepcidina en la médula renal interna en la Anemia aguda, la disminución en la inmunomarcación respecto a la condición basal podría sugerir baja expresión renal del regulador negativo de la absorción del Fe, para favorecer la captación de Fe.

A partir de la disminución de la expresión de Prohepcidina en médula interna y en corteza en Anemia severa, se puede sugerir que estaríamos frente a la respuesta fisiológica que favorece la captación renal de Fe para satisfacer su demanda.

De la revisión bibliográfica realizada para conocer los mecanismos moleculares regulatorios de Hepcidina renal en Anemia, surge claramente que aún no han sido suficientemente estudiados.

El riñón es un órgano que recibe un flujo sanguíneo adecuado (25% del gasto cardiaco). Los fibroblastos peritubulares de la corteza renal producen Eritropoyetina en respuesta a la hipoxia (baja PO_2) (Lacombe C et al., 1988). Se ha reportado que la baja PO_2 presente en la Anemia Hemolítica induce aumentos en HIF-1, que tienen un

importante rol en la expansión y diferenciación eritroide (Roque ME et al., 2001). En este sentido, la asociación entre hipoxia y la expresión de Hecpídina en hígado ha sido demostrada por otros autores (Nicolas G et al., 2002b). A partir de estos resultados, podríamos postular que la expresión de Prohepcídina en riñón también podría explicarse por un mecanismo dependiente de oxígeno. Considerando la condición hipóxica presente en la anemia severa en nuestros estudios *in vivo*, queda por dilucidar si el estímulo para regular la Hecpídina renal es realmente la PO_2 o alguna otra vía dependiente de Epo.

En este sentido, diversos estudios han reportado la disminución de la expresión hepática de Hecpídina por efecto de Epo (Nicolas G et al., 2002c). Basándonos en estos resultados, la regulación mediada por Epo podría ser el mecanismo que disminuya la expresión renal de Hecpídina en Anemia Hemolítica.

A partir de la expresión de Hecpídina en riñón identificada en condiciones basales, y de la reducción en su expresión en condiciones de alta demanda de Fe, podríamos aportar conclusiones relevantes. En primer término, que el regulador negativo central del metabolismo del Fe es una proteína intrínseca de riñón. En segundo término, que Prohepcídina renal tiene un rol regulatorio en el metabolismo del Fe. Asimismo, los cambios de Prohepcídina renal en anemia significan un aporte innovador para el estudio de la relación funcional y regulatoria entre eritropoyesis y metabolismo del Fe. Queda aún por profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión renal de Prohepcídina.

Transportador de Metales Divalentes 1 -DMT1- en Condiciones Basales y en Anemia Hemolítica

Nuestros estudios sobre el transportador de Metales Divalentes 1 fueron realizados en condiciones basales y de alta demanda de Fe, como ocurre en la Anemia Hemolítica.

En el primer caso, la identificación cortical de marcada expresión de DMT1, principalmente en el segmento S2 de túbulo proximales, determinó un potencial rol del

riñón en la importación de Fe. Similares resultados han sido reportados en ratones por Canonne-Hergaux F et al (2002), quienes identificaron la isoforma +IRE de DMT1 en túbulos con morfología de túbulo proximal en riñón de ratones sanos. Asimismo, nuestros resultados también coinciden con estudios en corteza de riñón de ratas en condiciones basales, donde se ha identificado expresión de DMT1 en túbulos proximales (Ferguson CJ et al., 2001; Wareing M et al., 2003).

El perfil de distribución cortical de DMT1 en condición basal mostró localización intracelular de DMT1 asociado a la membrana apical celular. A partir de la localización celular de DMT1 podríamos postular la captación apical de Fe, evidenciando la participación del riñón en el manejo del Fe en condiciones de balance normal de Fe sin demanda del metal, actuando en forma conjunta con el duodeno y el hígado (Graham RM et al., 2007; Mackenzie B et al., 2005).

El perfil de distribución de DMT1 en médula interna y externa en condiciones basales, identificada especialmente en el Asa de Henle y el conducto colector, es apoyado por estudios de otros autores realizados en ratas normales (Ferguson CJ et al., 2001; Gunshin H et al., 1997). Con referencia a la localización de DMT1, no asociada a la membrana plasmática y su colocalización con Transferrina en compartimientos intracelulares descrita por otros autores, podríamos sugerir que su principal función estaría asociada al transporte intracelular más que a la captación de Fe (Abouhamed M et al., 2006).

Podemos concluir que en condición basal, la localización apical de DMT1 en el segmento S2 de túbulos proximales corticales evidenciaría su rol como importador de Fe, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis del Fe. Por otro lado, la localización intracelular de DMT1 en la médula renal podría sugerir su participación en el manejo intracelular de Fe para satisfacer la actividad metabólica de las células tubulares medulares.

Los estudios en Anemia Hemolítica de la expresión renal de DMT1 constituyen un aporte novedoso en este campo del conocimiento dado que hasta el presente no fueron reportados. Los estudios en corteza renal de ratones anémicos, mostraron que la expresión de DMT1 asociada a membrana apical es intensa en el segmento S2 del túbulo proximal respecto a la condición basal y que existe abundante hemosiderina. A partir de estos resultados podemos sugerir por un lado, que DMT1 es una proteína

intrínseca de riñón; y por otro lado, que el riñón asume un rol metabólico importante en la regulación del balance del Fe en la Anemia, mediado por el importador DMT1.

La localización intracelular de DMT1 asociado a la membrana apical observada en túbulo proximales corticales en la Anemia Hemolítica, fue coincidente con la hallada en condiciones basales. Similar a lo descrito previamente, este perfil de distribución de DMT1 podría sugerir por un lado, su participación en el transporte intracelular de Fe, similar a lo reportado por Abouhamed M et al (2006); y por otro lado, la actividad de DMT1 en la captación de Fe desde el ultrafiltrado glomerular. En este sentido, el Fe³⁺ observado en túbulo proximal confirmaría la actividad importadora de Fe de DMT1.

A partir de nuestros estudios de identificación de DMT1 y de los cambios en su expresión determinados en la Anemia Hemolítica, se pueden establecer respuestas regulatorias asociadas a su función en el transporte del Fe. La respuesta fisiológica renal frente a estímulos hipóxicos y de alta demanda, como ocurre en la Anemia Hemolítica, es análoga a la descrita por nuestro grupo y por otros autores en tejidos como hígado y duodeno (Frazer DM et al., 2004; Kong W et al., 2008).

Nuestros resultados sobre el aumento de expresión de DMT1 en anemia serían apoyados por estudios moleculares realizados en enterocitos, que sugieren que en presencia de bajos niveles de Fe se favorecería la asociación de IRE-IRP en el ARNm de DMT1, estabilizando el transcripto de DMT1 y aumentando así la expresión de la proteína (Canonne-Hergaux F et al., 1999).

Otro estímulo importante para la expresión renal de DMT1 podría ser el nivel de oxígeno, similar a lo descrito en hígado. En este sentido, si el gen de DMT1 expresado en riñón tuviera sitios de unión para HIF-1, como ocurre en otros tejidos, la hipoxia favorecería la transcripción de DMT1, aumentando así la expresión renal de la proteína (Lee PL et al., 1998),

En el análisis de los estudios en médula renal, la débil inmunolocalización de DMT1 observada durante la crisis hemolítica es coincidente con la descrita en animales alimentados con una dieta deficiente en Fe, una condición con alta demanda del metal (Wareing M et al., 2003). Similar a lo observado en condiciones basales, la localización intracelular de DMT1 hallada en túbulo medulares en la Anemia sugiere poca actividad de DMT1 en la importación de Fe en esta zona tubular renal.

En cuanto a la funcionalidad de DMT1, es ampliamente conocido que su actividad es pH dependiente, siendo más activo a pH ácido (Gunshin H et al., 1997). En este sentido,

el pH ácido del filtrado glomerular podría explicar la presencia y la actividad de DMT1 en túbulo proximal renal (Koeppen BM et al., 1983). A nivel medular, el pH luminal de conductos colectores posiblemente sea acidificado por la presencia de un transporte acoplado a H^+ mediado por una H^+ -ATPasa (Brown D et al, 1988; Ferguson CJ et al., 2001). De esta forma se generaría el medio ácido necesario para la actividad de DMT1 en la médula.

A partir de los cambios en la expresión cortical y medular de DMT1 en la Anemia, podemos concluir que la marcada expresión de DMT1 en el segmento S2 del túbulo proximal en Anemia respecto a la condiciones basal, evidenciaría un mecanismo fisiológico para la adquisición de Fe cuando las demandas del metal son intensas.

Conclusión

Nuestros estudios fueron los primeros en evaluar al riñón como órgano metabólicamente activo en el balance del Fe en condiciones basales y en Anemia (Veuthey T et al., 2008).

Entre las conclusiones más relevantes podemos mencionar, en primer lugar, que Prohepcidina y DMT1 son proteínas intrínsecas del riñón. En segundo lugar, que el riñón asume un rol metabólico importante mediado por el principal regulador del Fe, la Hecpidina, y por el importador DMT1.

En el Diagrama 4 se integran las relaciones funcionales de la respuesta eritropoyética y de las proteínas del metabolismo del Fe en la Anemia Hemolítica.

Cuando se induce Anemia Hemolítica con FHZ, como mecanismo de compensación ante la disminución de la masa eritrocitaria se produce un aumento de la actividad eritropoyética mediada por Epo, que causa gran demanda de Fe (Roque M et al., 2008). En respuesta a la demanda de Fe la expresión renal de Prohepcidina disminuirá en los túbulos proximales corticales.

Para satisfacer las necesidades del Fe biodisponible, aumentará la expresión de DMT1 en túbulos proximales corticales. Podemos postular dos hipótesis para explicar el aumento de DMT1. La primera, que la gran demanda de Fe sería sensada por las células proximales estimulando la expresión renal de DMT1, para aumentar la captación de Fe

desde el ultrafiltrado glomerular. La segunda hipótesis postula que el aumento de la expresión de DMT1 estaría mediado por la baja PO_2 , basada en la existencia de dos potenciales sitios de unión para HIF-1 en el promotor de DMT1.

La función relevante del segmento S2 de túbulo proximal en la regulación del Fe en la eritropoyesis activa se basa principalmente en que fue la estructura tubular donde identificamos los principales cambios en DMT1 y Prohepcidina. La presencia de abundantes pigmentos de Fe identificados en el S2 proximal confirma la importancia de este segmento tubular y sugiere que tendría implicancias funcionales, dado que estudios previos han reportado activa síntesis de Hemo en esta estructura tubular (Ponka P, 1990).

Podemos concluir que la acción coordinada de DMT1 y Prohepcidina podría favorecer la reabsorción de Fe desde el ultrafiltrado glomerular para satisfacer las demandas intrínsecas del riñón y para contribuir a la homeostasis del Fe del organismo.

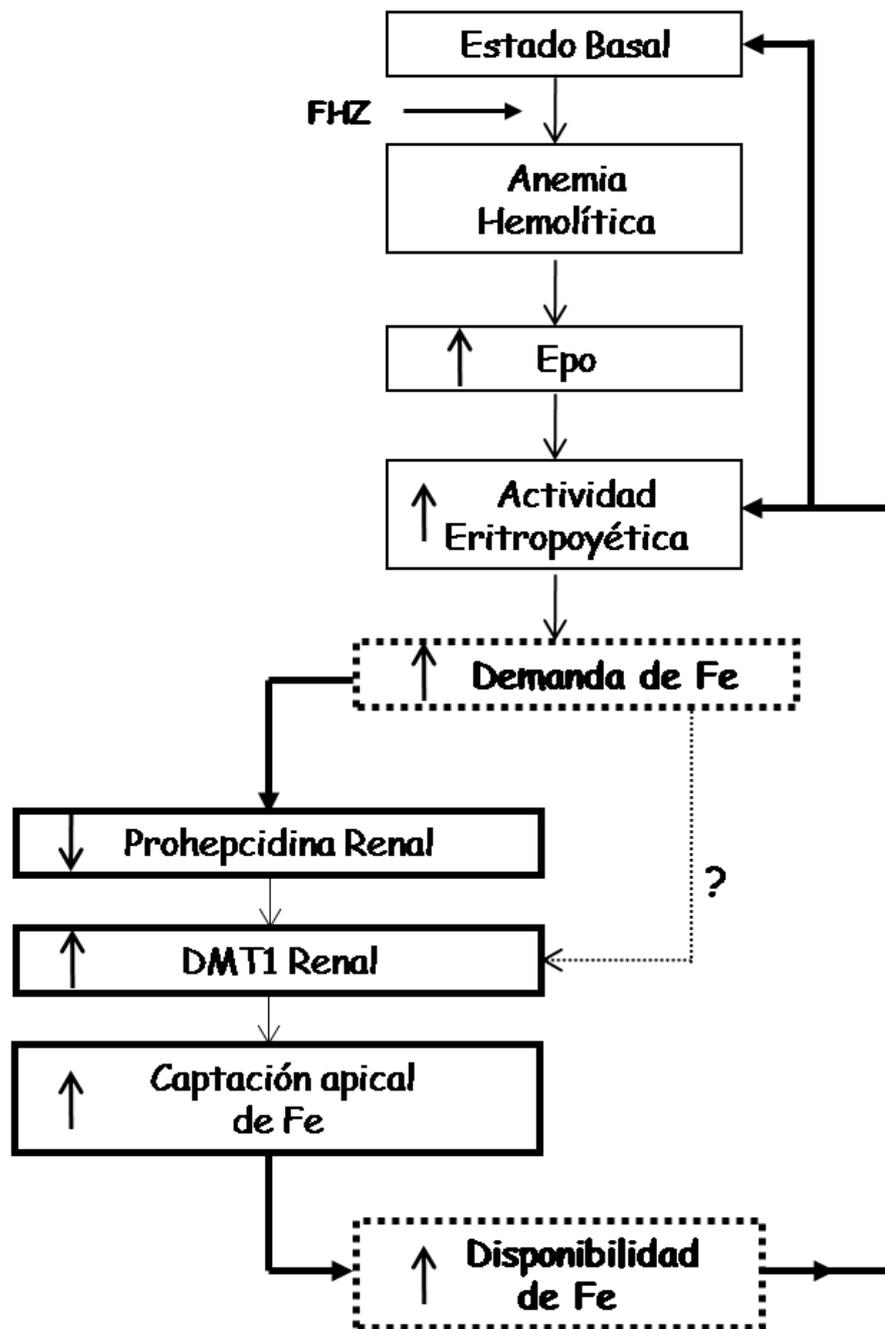


Diagrama 4. Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Anemia Hemolítica. En respuesta a la Anemia Hemolítica disminuye Prohepcidina y aumenta DMT1. Esto favorece la captación apical de Fe y contribuye a restablecer la eritropoyesis y el estado del Fe.

Nuestros estudios aportan nuevos conocimientos sobre las relaciones entre proteínas del metabolismo del Fe, como DMT1 y Prohepcidina, en tejidos tradicionalmente asociados al balance del Fe como hígado y duodeno. En este sentido, los cambios en la expresión de DMT1 y Prohepcidina en Sobrecarga de Fe evidenciaron la existencia de precisos mecanismos de regulación del balance de Fe en estos órganos.

Asimismo, a partir de la determinación de la expresión de Prohepcidina y DMT1 en riñón y de su regulación en la Anemia, este órgano mostró un compromiso con el balance del Fe regulando mecanismos de captación y movilización.

Para continuar con el estudio de la participación renal en el metabolismo del Fe, nos propusimos evaluar los cambios en la expresión renal de DMT1 y Prohepcidina en una condición clínica como la Sobrecarga de Fe, donde el exceso del metal puede ser altamente tóxico para el organismo.

Prohepcidina en Sobrecarga de Fe

Nuestros estudios sobre la expresión de Prohepcidina en tejido renal en exceso de Fe son los primeros reportados en este campo del metabolismo del Fe. Por lo tanto, constituyen un avance en el conocimiento de la respuesta de Prohepcidina renal en estados de disfunción de la ruta del Fe como es la Sobrecarga.

La marcada expresión de Prohepcidina observada en la corteza en Sobrecarga de Fe es un importante hallazgo ya que confirma que es una proteína intrínseca del riñón.

El patrón de distribución celular de Prohepcidina asociado a la membrana basolateral, similar al observado en condiciones basales y en Anemia, sugiere la liberación de Prohepcidina a la circulación sanguínea. Además, la identificación de Prohepcidina cercana a la cara basolateral evidenciaría su localización en un sitio clave para la interacción con Ferroportina, su receptor específico (Nemeth E et al., 2004).

La mayor expresión de Prohepcidina observada en el segmento S2 de túbulo proximal en Sobrecarga de Fe es otro aspecto importante destacar. Este perfil de expresión destaca nuevamente la importancia del segmento S2 de túbulo proximal renal como estructura involucrada en la regulación del Fe del organismo, como ya fue descrito condiciones basales y en Anemia (Veuthey T et al., 2008).

En cuanto a la intensidad de expresión de Prohepcidina, la mayor inmunomarcación observada en túbulo proximal en Sobrecarga de Fe respecto a condiciones basales, podría sugerir la existencia de un mecanismo que module la expresión de Prohepcidina. Dado que Hepsidina es la proteína que regula negativamente la absorción de Fe, la regulación de su expresión sería un mecanismo fisiológico para mantener la homeostasis de este nutriente (Nicolas G et al., 2002b; Ganz T et al., 2005).

Si bien en las últimas décadas diversos estudios han intentado identificar las vías que regularían la expresión hepática de Hepsidina en Sobrecarga de Fe, no se han aclarado totalmente los mecanismos que regulan la expresión renal de Hepsidina en exceso de Fe (Nemeth et al., 2008; Viatte L et al., 2009).

Debido a la relación directa que hemos hallado entre la marcada expresión renal de Prohepcidina y el exceso de Fe, es posible que la regulación de la expresión hepática y renal de Prohepcidina dependa de mecanismos moleculares similares. En este sentido, similar a lo reportado en hígado, los elevados niveles de Fe circulantes existentes en la Sobrecarga de Fe, podrían favorecer la estabilización del complejo HFE-RTf2-HJV, activando la cascada de señalización intracelular dependiente de BMP. De esta manera se favorecería la transcripción del gen de Hepsidina, incrementándose los niveles renales de la proteína (Massague J et al., 2005; Babitt JL et al., 2007).

En el estudio de la médula renal, la intensa inmunomarcación de Prohepcidina observada en la médula interna en sobrecarga de Fe, sumada a la localización intracelular, podrían indicar nuevamente la síntesis intrínseca de la proteína. En este sentido, la identificación de Prohepcidina en el citoplasma celular podría sugerir su almacenamiento en el interior celular previo a su liberación.

Por otro lado, la ausencia de cambios en la intensidad de expresión de Prohepcidina en médula interna en Sobrecarga de Fe respecto a la condición basal, podría indicar poca actividad de esta zona renal en la regulación de los niveles de Fe. Asimismo, la débil expresión de Prohepcidina observada en la médula renal externa en Sobrecarga de Fe, similar a lo observado en condiciones basales, también podría sugerir poco compromiso de la médula renal en el mantenimiento de la homeostasis del Fe.

Podemos concluir que existe síntesis intrínseca de Prohepcidina en la corteza renal y que su expresión es regulada por Fe. De esta manera, podríamos sugerir la presencia de un mecanismo renal para mantener la homeostasis del Fe. Asimismo, nuestros resultados indicarían el destacado compromiso de los túbulos proximales corticales en

el balance del Fe, de acuerdo a lo reportado por otros autores (Ponka P, 1990; Wareing M et al., 2000; Veuthey T et al., 2008).

Transportador de Metales Divalentes 1 en Sobrecarga de Fe

Hasta el presente no había sido estudiada la respuesta regulatoria de la proteína importadora DMT1 en tejido renal de ratón en las condiciones fisiopatológicas inducidas por la administración parenteral de Fe en exceso. En este sentido, nuestros estudios constituyen un aporte innovador sobre este campo del conocimiento, dado que se han identificado las células del epitelio renal que expresan DMT1. Otros autores han reportado cambios en la expresión de DMT1 en ratas con exceso de Fe, que a diferencia de nuestros estudios, fue producido por dietas suplementadas en Fe (Wareing M et al., 2003).

La expresión cortical de DMT1 en Sobrecarga de Fe respecto a condiciones basales, fue homogénea en la mayoría de los túbulos corticales, evidenciándose expresión moderada respecto a la condición basal, similar a lo reportado por Wareing M et al (2003).

Si bien en la actualidad no está esclarecida la regulación de la expresión renal de DMT1 en Sobrecarga de Fe, es posible que exista algún mecanismo similar al reportado en tejido hepático y duodenal. En este sentido, de nuestros resultados se desprende que los elevados niveles de Fe sérico asociados a la Sobrecarga de Fe podrían regular negativamente la expresión renal de DMT1, en coincidencia con lo reportado por Wareing et al (2003). De esta forma, debido a que las células renales estarían repletas de Fe, la captación renal de Fe mediada por DMT1 sería baja, como mecanismo protector contra la citotoxicidad que podría causar el exceso de Fe.

Dado que se ha descrito que el ARNm de DMT1 posee secuencias IRE, también es posible que su regulación en Sobrecarga de Fe sea opuesta a la reportada en deficiencia de Fe (Gunshin H et al., 1997; Oates PS et al., 2000). En este sentido, los elevados niveles de Fe podrían impedir la unión de IRE-IRP, desestabilizando el transcripto de DMT1 y disminuyendo los niveles de la proteína.

De la observación cortical también se desprende que los principales cambios en la expresión de DMT1 en Sobrecarga de Fe respecto al tejido sin tratar ocurrieron en

túbulos proximales, similar a lo reportado en un estudio similar realizado en ratas (Wareing M et al., 2003). Estos resultados son de gran importancia ya que destacan el compromiso de este segmento tubular en el balance del Fe, en coincidencia con lo reportado por otros autores (Canonne-Hergaux F et al., 20002).

Por otro lado, la localización citoplasmática de DMT1 que hemos observado en tejido renal con Sobrecarga de Fe podría indicar su participación en el movimiento de Fe intracelular, en coincidencia con lo reportado por Abouhamed M et al (2006), quienes han evidenciado colocalización de DMT1 con la proteína lisosomal LAMP1 en túbulo proximal. De esta manera, la actividad de DMT1 se centraría en un mecanismo diferente a la captación apical de Fe como sería el manejo del Fe dentro de la célula, para satisfacer las necesidades metabólicas celulares.

En el estudio de la médula renal externa e interna, la ausencia de cambios en la expresión de DMT1 observada por nosotros en Sobrecarga de Fe respecto a la condición basal, coincide con lo reportado por Wareing M et al (2003), quienes no evidenciaron cambios en la inmunoreactividad de DMT1 en médula interna y externa de ratas frente a variaciones en el contenido de Fe de la dieta.

La presencia de abundantes depósitos de Fe³⁺ en tejido conectivo renal podría deberse a la captación del metal realizada por células de la lámina propia con características de células fagocíticas, confirmando la presencia de un estado de Sobrecarga de Fe. Por otro lado, la distribución heterogénea de los pigmentos de Fe observada a lo largo del tejido renal podría deberse a la cantidad de tejido conectivo presente en corteza y medula, ó a la capacidad de almacenamiento del mismo.

A partir de nuestros resultados podemos concluir que la expresión renal de DMT1 sería modulada en respuesta a elevados niveles de Fe. En este sentido, el riñón modularía negativamente la captación de Fe urinario cuando los niveles del metal son elevados, como mecanismo protector contra la toxicidad que podría causar el Fe. De esta manera se pone de manifiesto la importancia de la fisiología renal en el mantenimiento de la homeostasis del Fe.

Conclusión

Si bien ha sido descrita la expresión renal de Prohepcidina en condiciones basales y en la Anemia, hasta el presente no se ha reportado en la literatura su expresión renal en Sobrecarga de Fe, como así tampoco su relación con DMT1 renal (Kulaksiz H et al., 2005; Veuthey T et al., 2008). Por este motivo, nuestro trabajo realiza un importante aporte sobre los cambios en el patrón de distribución de Prohepcidina renal en una condición con exceso de Fe.

Entre las conclusiones más importantes de nuestro trabajo podemos mencionar la síntesis renal de Prohepcidina y DMT1, y la regulación de su expresión en exceso de Fe como mecanismo fisiológico para mantener el balance del Fe.

En el Diagrama 5 se detallan las relaciones regulatorias entre proteínas del metabolismo del Fe como DMT1 y Prohepcidina en Sobrecarga de Fe.

La inducción de Sobrecarga de Fe produce elevados niveles de Fe circulante y de depósito. En respuesta a esta situación, las células tubulares detectarían el exceso de Fe y aumentaría la síntesis de Prohepcidina en los túbulos proximales corticales. La marcada localización basolateral de Prohepcidina podría indicar su liberación como respuesta a la Sobrecarga de Fe y su localización en un sitio clave para su interacción con FPN

Para disminuir la captación apical de Fe, disminuirá la expresión de DMT1 en túbulos proximales corticales. Podemos postular que el exceso de Fe circulante asociado a la Sobrecarga de Fe podría regular la expresión renal de DMT1. Sería posible que los elevados niveles de Fe impidan la unión de IRP con secuencias IRE del ARNm de DMT1, evitando la estabilización del ARNm y disminuyendo la síntesis renal de DMT1.

La función relevante del túbulo proximal en la regulación del Fe se basa principalmente en que fue la estructura tubular donde identificamos los principales cambios en DMT1 y Prohepcidina, destacando nuevamente la implicancia funcional de esta estructura tubular.

Podemos concluir que frente a excesos de Fe, la acción coordinada de DMT1 y Prohepcidina renal disminuirían la captación de Fe desde el ultrafiltrado glomerular en el túbulo proximal, evidenciando una respuesta adaptativa del riñón frente a la Sobrecarga de Fe.

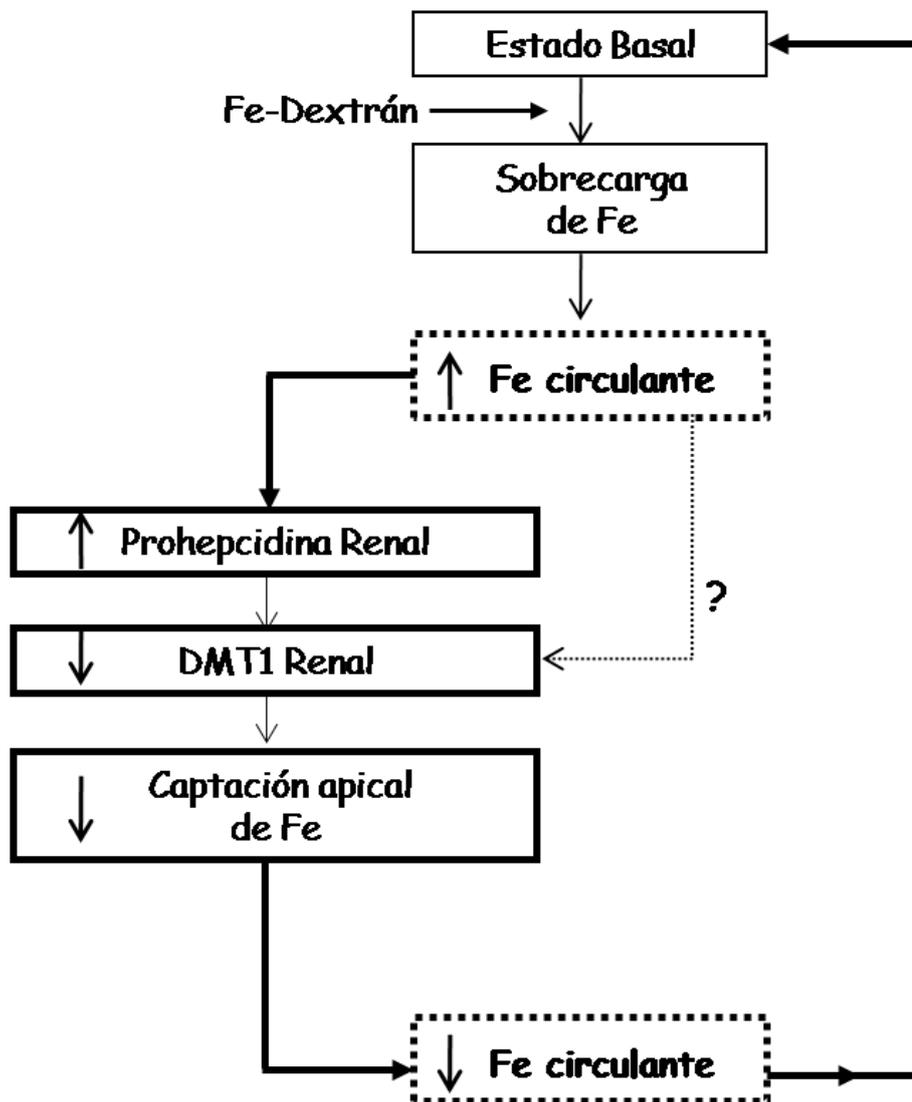


Diagrama 5. Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Sobrecarga de Fe. En respuesta al exceso de Fe aumenta Prohepcidina y disminuye DMT1. Esto disminuye la captación de Fe en los túbulos proximales y contribuye a restablecer el balance del Fe.

MODELO DE ACOUPLE: INDUCCIÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO SEGUIDA DE ANEMIA HEMOLÍTICA

En nuestros estudios previos hemos podido determinar un claro compromiso del tejido renal en situaciones con demanda de Fe y con exceso de Fe. En este sentido, hemos identificado proteínas claves del metabolismo del Fe como Prohepcidina y DMT1 en riñón, cuya regulación depende del estado del Fe. Asimismo, debemos destacar el rol preponderante del túbulo proximal renal en la movilización y captación del Fe, en balance de Fe y en la disfunción metabólica.

Por otro lado, nuestros estudios sobre DMT1 y Prohepcidina en el modelo acoplado de Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, aportaron novedosas conclusiones para comprender mejor la relación entre el metabolismo del Fe y la eritropoyesis, destacando el rol de órganos claves como hígado y duodeno.

Debido a que no existían evidencias previas sobre la participación de DMT1 renal cuando coexiste exceso de Fe con alta demanda del metal, decidimos aplicar al estudio del riñón el modelo de “Sobrecarga de Fe seguido de Anemia“. Nuestros estudios se focalizaron en la identificación DMT1 y Prohepcidina en riñón cuando coexisten dos estímulos antagónicos para la expresión de Hpcidina: Sobrecarga de Fe y Anemia. De esta manera, intentamos establecer relaciones regulatorias entre Prohepcidina, DMT1 y el estado del Fe del organismo.

Prohepcidina en Anemia con Sobrecarga de Fe

Antes de iniciar la discusión del modelo acoplado, introduciremos brevemente aspectos claves del diseño experimental de este modelo de disfunción.

La identificación y localización de Prohepcidina en este apartado, y de DMT1 en el siguiente, se estudió en dos estados de disfunción: 1) Sobrecarga de Fe; 2) Sobrecarga de Fe más Anemia. El primer estado, Sobrecarga de Fe, se analizó en previamente en este capítulo. El segundo estado, no analizado hasta el presente, se introduce a continuación.

La identificación de las células renales que expresaron Prohepcidina en Anemia con exceso de Fe constituye un aporte innovador al estudio del metabolismo del Fe, ya que hasta el presente no existen publicaciones relacionadas en la literatura.

La identificación cortical de Prohepcidina en la etapa que coexisten Anemia y exceso de Fe, localizada principalmente en segmento S2 del proximal, coincide con el perfil hallado en Sobrecarga de Fe (sin Anemia) ya descripto.

Respecto a la distribución de Prohepcidina asociada a la membrana basolateral del epitelio proximal en Anemia con Sobrecarga de Fe, observamos que presenta el mismo perfil de localización que en todas las condiciones experimentales estudiadas. La expresión de Prohepcidina en la membrana basolateral del epitelio proximal tendría implicancias funcionales dado que favorecería su liberación a la circulación sanguínea.

La identificación de Prohepcidina en la zona medular, en Anemia con Sobrecarga, sugeriría que es una proteína intrínseca del riñón. Respecto a la localización intracelular de Prohepcidina en la médula en Anemia con exceso de Fe, ésta podría estar sugiriendo que las células del Asa de Henle y del colector actuarían como sitio de reserva de Prohepcidina. Una hipótesis similar fue descripta en las células hepáticas en condiciones basales (Wallace DF et al., 2005). Quedan aún por dilucidar aspectos regulatorios y funcionales entre Prohepcidina y proteínas del Fe.

De lo expuesto podemos concluir que en riñón existe un perfil de expresión de Prohepcidina similar en los dos estados de disfunción estudiados: Anemia con y sin exceso de Fe.

Por lo expuesto podemos concluir que en riñón, al igual que en hígado, Prohepcidina responde principalmente al Fe como señal regulatoria, constituyendo uno de los mecanismos que contribuirían a la homeostasis del Fe, frente a estados suficiencia o exceso de Fe. Al igual que en hepatocitos, las bases moleculares que mediarían este mecanismo regulatorio dependerían del Fe como activador de mensajeros intracelulares vía Proteínas Morfogénicas Óseas, favoreciendo así la transcripción del gen de Hpcidina (Nemeth E et al., 2008).

Transportador de Metales Divalentes 1 en Anemia con Sobrecarga de Fe

La identificación cortical de DMT1 y su expresión en la etapa que coexisten exceso de Fe y Anemia, principalmente en el segmento S2 del proximal, coincide con el perfil hallado en la condición basal y en Anemia. Este perfil no se corresponde con lo hallado en Sobrecarga de Fe, donde DMT1 se distribuyó en forma homogénea en corteza y en

médula. Esto revelaría que para la relación estructural y funcional de DMT1, el estado de alta demanda fue preponderante frente al estado de exceso de Fe.

Respecto a la distribución intracelular de DMT1 en la médula renal en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia, este perfil también fue similar al observado en Anemia, lo que pone en evidencia su función en la movilización intracelular del Fe y sugiere su regulación independiente del estado del Fe.

Por lo expuesto podemos concluir que DMT1 en riñón responde principalmente al estímulo de la Anemia independientemente del estado de Fe, como mecanismo regulatorio para satisfacer las demandas de Fe para la producción eritroide.

Una hipótesis que explicaría el aumento de DMT1 en Anemia con exceso de Fe se basa en destacar que el riñón sería el órgano que asume un rol preponderante en captar Fe por transporte tubular. En cambio, la biodisponibilidad del Fe hepático estaría limitada, principalmente, por su reducida liberación generada por la degradación de FPN (principal exportador celular) mediada por Prohepcidina. Además, el Fe hepático no compensaría adecuadamente la intensa demanda porque está en forma de Hemosiderina. En el caso del duodeno, el proceso de absorción Fe mediado por DMT1 no muy sería eficiente para compensar la intensa demanda de Fe debido a la localización intracelular de la proteína.

Analizando la respuesta regulatoria de DMT1 frente al estímulo anémico, se podría postular que estaría mediada por la señal hipóxica. Si el gen de DMT1 tuviera sitios de unión para HIF-1, como se reportó para DMT1 hepático, la hipoxia favoreciera la transcripción y expresión renal de DMT1.

En nuestras condiciones experimentales, el Fe es una señal regulatoria para la expresión de DMT1 en hígado y duodeno. Mientras que en riñón, la señal preponderante sería el estímulo de la anemia, que puede involucrar a la PO_2 , la Epo, citoquinas y la demanda de Fe.

Una de las principales contribuciones que surgen del estudio del modelo acoplado fue inducir una condición fisiopatológica sin analogía en otros modelos animales como es la coexistencia de altos niveles de Epo, por el estímulo de la anemia, y altos niveles de Prohepcidina, por el estímulo del Fe en exceso.

Conclusión

Nuestros estudios fueron los primeros en evaluar al riñón como órgano metabólicamente activo en el balance del Fe y la eritropoyesis en un estado donde coexisten exceso de Fe y alta demanda de Fe.

Entre las conclusiones más relevantes obtenidas podemos mencionar: por un lado, la coexistencia de Epo y Prohepcidina renal; y por otro lado, el aumento en la expresión renal de DMT1, destacando el rol clave del riñón en el balance del Fe.

En el Diagrama 6 se integran las relaciones funcionales y regulatorias entre las proteínas del metabolismo del Fe y la respuesta eritropoyética en Sobrecarga de Fe seguida de Anemia Hemolítica.

En la Anemia con exceso de Fe, como mecanismo de compensación a la baja PO_2 generada por la intensa hemólisis, se producirá un aumento en la síntesis renal de Epo, una hormona clave para la producción eritroide. Además en la Anemia con exceso de Fe se generarán dos situaciones opuestas y bien definidas de desbalance de Fe: por un lado un marcado exceso de Fe y por otro lado alta demanda de Fe para la eritropoyesis.

Para satisfacer las demandas de Fe, aumentará la expresión renal de DMT1 principalmente en túbulo proximal, pese a la sobrecarga de Fe existente. Esto favorecerá la captación de Fe desde el ultrafiltrado glomerular para el mantenimiento de balance del Fe.

En respuesta al exceso de Fe aumentará la expresión renal de Prohepcidina, evidenciando un comportamiento similar al hallado en Sobrecarga de Fe sin Anemia, lo que podría indicar que el exceso de Fe sería un estímulo más potente que la demanda eritroide.

Similar a lo observado en otras condiciones experimentales, en Anemia con Sobrecarga de Fe evidenciamos la relevancia funcional del túbulo proximal en el balance del Fe, debido a que los principales cambios en Prohepcidina y DMT1 se evidenciaron en esa zona renal.

Es importante mencionar dos aspectos claves de la regulación funcional de Prohepcidina y DMT1 en Anemia con exceso de Fe. Por un lado, que Prohepcidina renal estaría modulada en forma similar a Prohepcidina hepática. Por otro lado, que la regulación de la expresión de DMT1 parecería ser tejido específica ya que el riñón respondió a la demanda de Fe, mientras que el hígado y duodeno respondieron al exceso de Fe.

Además se evidenció la coexistencia de marcada expresión de Prohepcidina renal con elevados niveles plasmáticos de Epo, lo que sugeriría que Epo no pudo modular la expresión de Prohepcidina. Este patrón regulatorio observado entre Epo y Prohepcidina renal estaría reforzado por la coexistencia de elevada Epo y Prohepcidina hepática que hemos descrito anteriormente (Capítulo II).

Podemos concluir que en Anemia con Sobrecarga de Fe, la captación renal de Fe mediada por DMT1 en túbulos proximales contribuiría a satisfacer las demandas de Fe para la recuperación de la Anemia. La marcada expresión de Prohepcidina renal podría sugerir su regulación dependiente del exceso de Fe y su participación en la regulación del Fe en otros tejidos como hígado y duodeno.

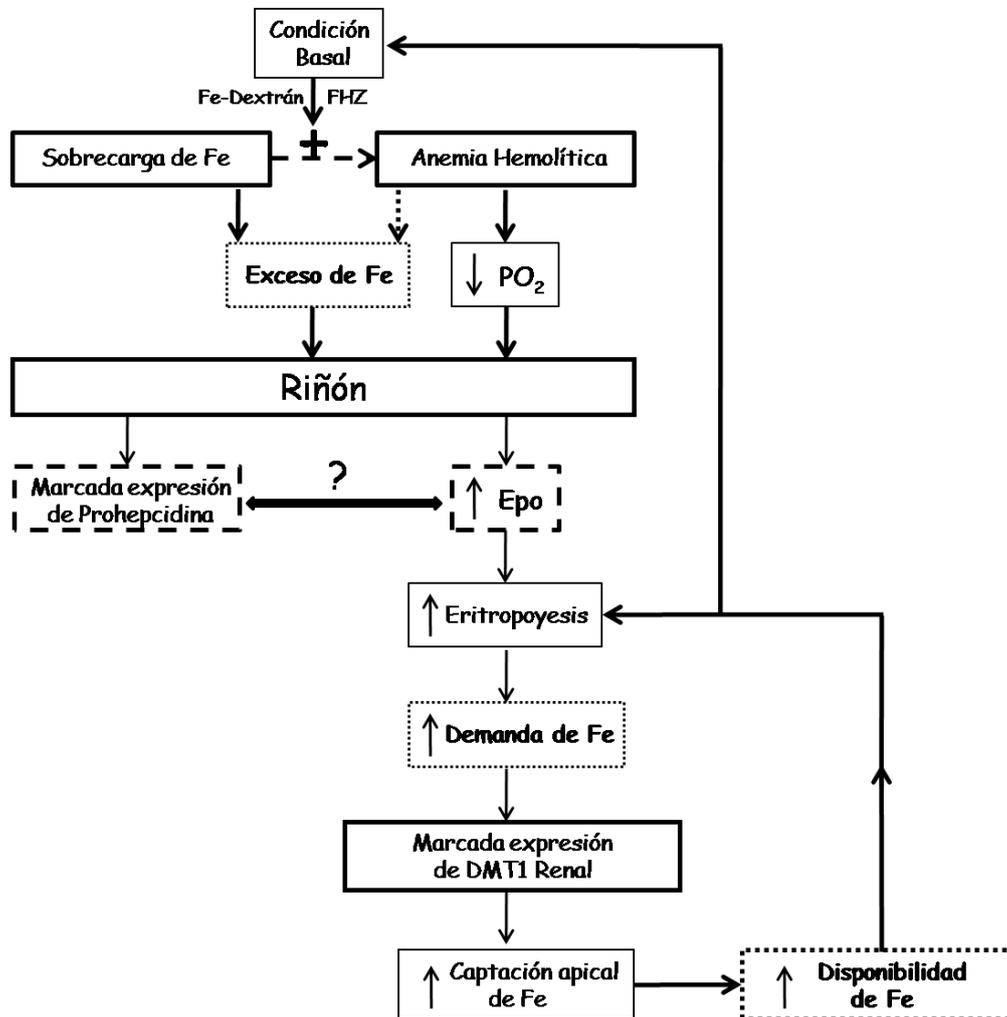


Diagrama 6. Regulación renal de Prohepcidina y DMT1 en Anemia con Sobrecarga de Fe. En la respuesta a la Anemia Hemolítica con exceso de Fe, coexisten Epo y Prohepcidina elevadas. El aumento de la expresión de DMT1 favorece la captación apical de Fe y contribuye a restablecer la eritropoyesis y el estado de Fe.

RATAS BELGRADE

La utilidad del modelo de ratas Belgrade para nuestros estudios del Metabolismo del Fe residió en la mutación genética, autosómica recesiva, de DMT1, originada por la substitución de Glicina por Arginina en el cuarto segmento transmembrana de la proteína (Fleming M et al., 1998).

Las bases etiopatológicas de las alteraciones genéticas son: fallas en la exportación del Fe endosomal durante el ciclo de la Transferrina, limitado transporte de Fe hacia células eritroides indiferenciadas y reducida absorción duodenal de Fe (Garrick MD et al., 1993; Ferguson C et al., 2003). Las manifestaciones clínicas asociadas a este genotipo son anemia microcítica e hipocrómica, elevada Ferremia y altos depósitos de Fe hepático (Thompson K et al., 2006).

El metabolismo del Fe en las ratas Belgrade ha sido ampliamente estudiado en distintos tejidos por el grupo de la Dra Wessling-Resnick. La caracterización funcional de DMT1, Epo y Hpcidina en el riñón de las ratas, se abordó en colaboración con el grupo de la Dra Wessling-Resnick.

Transportador de Metales Divalentes 1 en Ratas Belgrade

El modelo de ratas Belgrade nos permitió continuar profundizando el estudio de DMT1. El perfil de expresión de DMT1 en riñón de ratas Belgrade homocigotos y heterocigotas mostró moderada inmunomarcación en la zona cortical en túbulo con morfología de distal y proximal, y en la zona medular, en el túbulo colector.

La débil expresión renal de DMT1 que hemos evidenciado en ratas Belgrade homocigotas y la similar intensidad de expresión entre homocigotas y heterocigotas, no coincide con lo reportado por Ferguson C et al (2003), quienes evidenciaron una disminución en la expresión de DMT1 en ratas homocigotas respecto a las heterocigotas. En este sentido, es posible que las diferencias con nuestros estudios se deban a las distintas condiciones experimentales. Por otro lado, nuestros resultados podrían sugerir la existencia de una baja actividad residual de DMT1 en riñón.

Prohepcidina en Ratas Belgrade

La identificación de la expresión renal de Prohepcidina en ratas Belgrade constituye un aporte en el campo del metabolismo del Fe, debido a que no ha sido reportada hasta el momento. Estos estudios, realizados en Harvard School of Public Health, fueron las primeras investigaciones sobre Prohepcidina en tejido renal de ratas knock-out para DMT1.

En coincidencia con lo hallado en otros modelos animales, la identificación de Prohepcidina en los segmentos corticales y en segmentos medulares externos sugeriría que esta proteína es intrínseca del riñón de ratas Belgrade homocigotas y heterocigotas.

Las diferencias en Prohepcidina observadas en el riñón de ratas homocigotas y heterocigotas en la médula interna sugieren una expresión selectiva de esta proteína que responde a relación estructural y funcional de este órgano.

Debido a que Hepcidina impide la absorción de Fe, y dado que las ratas Belgrade homocigotas presentan una marcada anemia, la baja expresión medular de Prohepcidina hallada podría sugerir la existencia de una señal que comunica la necesidad de Fe a las células.

En todos los casos, la expresión renal de Prohepcidina fue intracelular, lo que podría indicar su acumulación en el citoplasma celular hasta recibir la señal para su secreción, similar a lo descrito en tejido hepático (Wallace DF et al., 2006).

De nuestros resultados surgen dos conclusiones. En primer termino, confirman que Prohepcidina es una proteína intrínseca del riñón de ratas Belgrade, en coincidencia con lo descrito en otros modelos animales (Kulaksiz H et al., 2005; Veuthey T et al., 2008). En segundo término, en anemia, Prohepcidina renal podría disminuir en respuesta a la señal de anemia.

A partir la ausencia de pigmentos de Fe³⁺ en corteza y médula renal de ratas heterocigotas y homocigotas, aun con la suplementación de Fe en la dieta, podemos concluir, que aún con baja expresión de Prohepcidina, no se capta Fe por la mutación de DMT1, proteína importadora de Fe.

Eritropoyetina Tisular en Ratas Belgrade

Un aporte inédito de nuestros estudios ratas Belgrade fue la identificación de la expresión de Epo en riñón, dado que en la literatura no existen antecedentes previos. Por primera vez se identificó el sitio de expresión de Epo por estudios inmunohistoquímicos.

La expresión renal de Epo en ratas Belgrade se localizó en la zona córtico-medular en ratas homocigotas y heterocigotas. Este patrón de distribución fue similar al descrito en ratas anémicas por Koury ST et al (1988) y en ratas hipóxicas por Lacombe C et al (1988).

De la identificación de Epo en los espacios intertubulares de la zona córtico-medular se puede deducir una relación estructural y funcional estrecha dado que es el sitio donde se identifican abundantes fibroblastos intersticiales, células productoras de Epo (Bachmann S et al., 1993). Asimismo, es importante destacar que la expresión de Epo mostro especificidad de tejido, dado que no fue detectada en la estructura glomerular y en el epitelio del sistema tubular.

Eritropoyetina Sérica en Ratas Belgrade

De nuestros resultados sobre los niveles de Epo sérica en ratas heterocigotas y homocigotas se puede concluir que fueron apropiados para el grado de anemia. En efecto, las homocigotas que tienen mayor grado anemia presentaron niveles de Epo mas elevados que las heterocigotas.

Conclusión

Nuestros estudios fueron los primeros en evaluar al riñón como órgano metabólicamente activo en el balance del Fe en ratas Belgrade homocigotas.

En el Diagrama 7 se integran los mecanismos regulatorios que modulan la expresión de Hpcidina y Epo en respuesta a la mutación de DMT1 en riñón, con estudios similares realizados en hígado y duodeno por otros autores (Ferguson C et al., 2003; Thompson K et al., 2006).

En respuesta a las alteraciones genéticas de DMT1, la exportación de Fe endosomal esta limitada y la absorción duodenal disminuida, lo que produce en las ratas Belgrade manifestaciones clínicas como anemia microcítica e hipocrómica, elevada Ferremia, altos depósitos de Fe hepático y elevada Hepsidina hepática.

Como mecanismo de compensación a la anemia presentan niveles aumentados de Epo sérica. Respeto a la baja expresión de Prohepcidina la respuesta sería paradójica, dado que se favorecería la captación de Fe para la eritropoyesis pero este mecanismo regulatorio no sería efectivo por la mutación de DMT1.

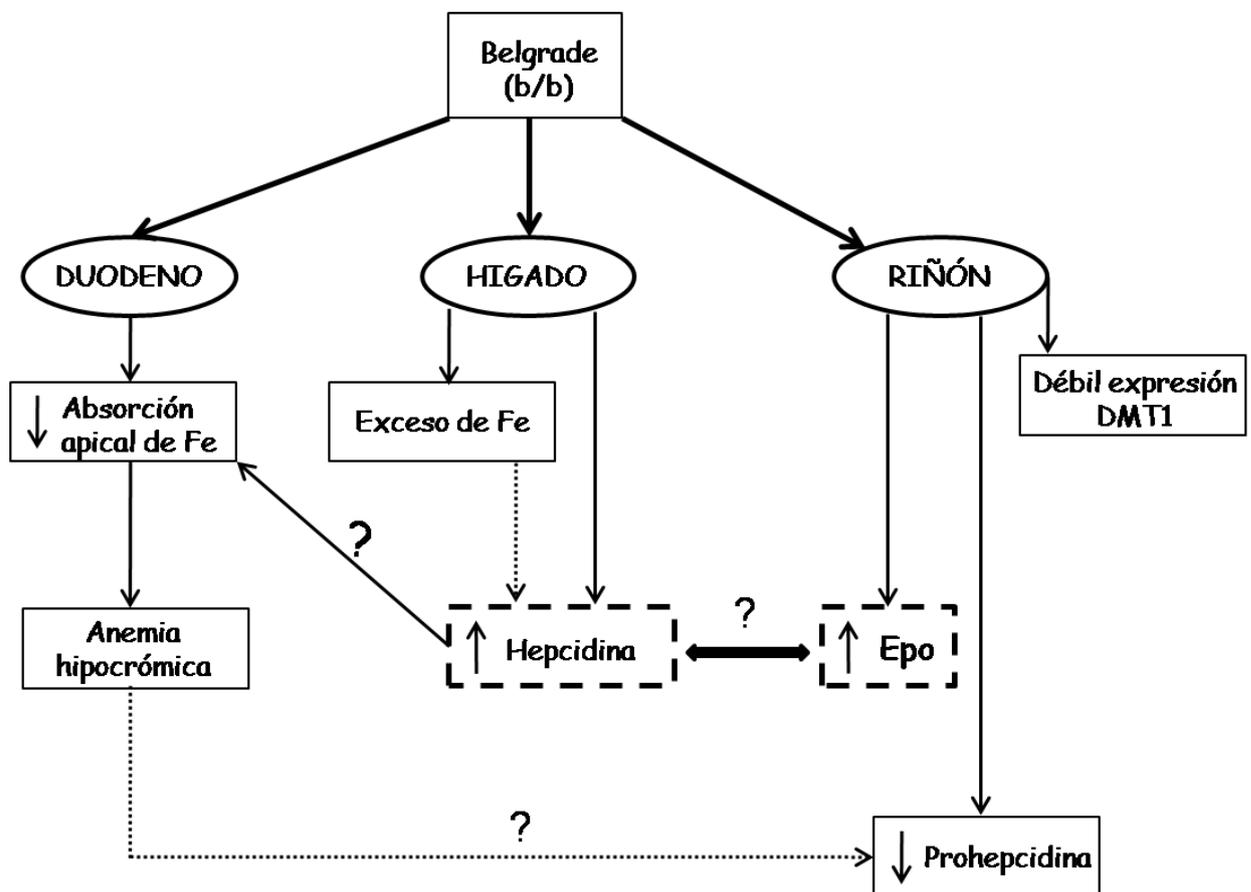


Diagrama 7. Regulación de la expresión renal de DMT1, Hepsidina y Epo en ratas Belgrade homocigotas. Prohepcidina renal, como regulador negativo de la absorción de Fe, disminuye su expresión. Aumentan los niveles de Epo en respuesta a la Anemia, evidenciando coexistencia de Epo con Hepsidina hepática.

CONCLUSIONES

- 1- Se profundizó el estudio de la respuesta regenerativa eritropoyética murina luego de la inducción de Anemia Hemolítica, identificando eritropoyesis extramedular en bazo, hígado y riñón. Los cambios observados sugieren que la recuperación de la Anemia depende de la acción coordinada de tejidos extramedulares.

- 2- Se profundizó el estudio de la regulación de la expresión de proteínas claves del Metabolismo del Fe como Hepsidina y DMT1, en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas con alteraciones en el balance del Fe.
 - En balance normal de Fe con alta demanda del metal:
 - DMT1 duodenal se traslocó a la membrana apical para favorecer la absorción de Fe, destacado su rol importador de Fe.
 - DMT1 disminuyó su expresión en hepatocitos, para disminuir la captación hepática de Fe y aumentar el Fe disponible para la eritropoyesis.
 - Prohepcidina mostró débil expresión hepática, un patrón esperado para un regulador negativo de la absorción de Fe.

 - En exceso de Fe:
 - Enterocitos duodenales mostraron expresión intracelular de DMT1, sugiriendo baja absorción de Fe.
 - Hepatocitos mostraron marcada expresión de DMT1, sugiriendo activa participación en la captación de Fe. Esto sugiere la presencia de un mecanismo para disminuir la citotoxicidad causada por los excesos del metal.
 - Prohepcidina mostró marcada expresión hepática, evidenciando su rol como regulador negativo de la absorción de Fe.

- 3- Se establecieron relaciones funcionales y regulatorias entre proteínas del Metabolismo del Fe y la Eritropoyesis.
 - En Anemia con exceso de Fe identificamos marcada expresión hepática de Prohepcidina y elevados niveles de Epo, evidenciando la coexistencia de ambas proteínas. Podríamos sugerir que Prohepcidina hepática estaría regulada por el exceso de Fe.

- 4- Se identificó la síntesis renal intrínseca de Prohepcidina, sugiriendo la producción extra-hepática de la proteína. Los cambios en la expresión renal de Prohepcidina observados en situaciones con alteraciones en el balance del Fe, sugieren su participación en la comunicación celular de las demandas de Fe, ya sea actuando como una señal autócrina o parácrina.

- 5- Se identificó al riñón como órgano metabólicamente activo en el balance del Fe, sugiriendo un mecanismo regulatorio mediante el cual Hepsidina y DMT1 renal podrían modular la captación tubular de Fe.

APÉNDICE

SOLUCIONES DE TRABAJO

- **SERIE LEUCOCITRIA Y ERITROCITARIA**

Tinción MayGrunwald-Giemsa

Agua destilada estabilizada

Estabilizador de pH.....1 ml

Agua destilada.....50 ml

Giemsa diluído

Giemsa.....200 µl de Giemsa

Agua destilada estabilizada.....1 ml

- **RECUENTO DE RETICULOCITOS y CÉLULAS CON CUERPOS DE HEINZ**

Azul Brillante de Cresilo 1%

Azul brillante Cresilo.....1.0 g

Citrato de sodio..... 0.4 g

Cloruro de sodio..... 0.85 g

Agua destilada.....100 ml

Formol 40 % (conservante).....0.2 ml

- **TINCIÓN DE PERLS**

Solución Ferrocianuro Potásico al 10%

Ferrocianuro Potásico.....10 g

Agua destilada.....100 ml

Acido Clorhídrico 2%

HCl concentrado.....2 ml
 Agua Destilada.....98 ml

Solución de trabajo

Partes iguales de Solución Ferrocianuro Potásico al 10% y Acido Clorhídrico 2%.
 Preparar inmediatamente antes de su uso.

Solución Rojo Nuclear 0,1 %

Rojo Nuclear Sólido.....0,1 g
 Sulfato Aluminico.....5 g
 Agua Destilada.....100 ml

- **EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL HIERRO TISULAR**

Standard stock (100 mM)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,27030 g
 Agua desionizada.....10 ml
 Acido Nítrico 35 %.....100 μL

Standard de trabajo

Standard stock.....5 ml
 Agua desionizada.....5 ml
 Acido Nítrico 35 %.....100 μL

Acido Nítrico 35 %

Partes iguales de Acido Nítrico 69 % y agua desionizada

Buffer Acetato de Sodio 0,2 M

Acetato de sodio.....8,2 g
Agua desionizada.....500 ml

NaOH 10 N

NaOH.....400 g
Agua desionizada.....1000 ml

- **FIJACIÓN**

Solución Formol tamponado

Formol puro.....100 ml
Fosfato sódico monobásico.....4,0 g
Fosfato sódico dibásico.....6,5 g
Agua destilada.....900 ml
pH: 7,0-7,2

- **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Silane

Silane.....4 ml
Acetona.....196 ml

Buffer Citrato

Acido cítrico.....2,1 g
Agua destilada.....1000 ml
El pH deberá ser ajustado a 6,0 con NaOH 1N

PBS (Buffer fosfato salino)

NaCl.....7 g

KCl.....0.2 g

KH₂PO₄.....0.43 gNa₂HPO₄

Puro.....1.48 g

2 H₂O.....1.67 g7 H₂O.....2.77 g14 H₂O.....11.2 g

Agua destilada.....c.s.p. 1000 ml

El pH deberá ser ajustado a 7.0-7.2, con NaOH 1N o con HCl 1N.

Solución de revelador

Buffer.....1 ml

DAB cromógeno.....50 µl

REFERENCIAS

1. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000; 275: 19906–12.
2. Abouhamed M, Gburek J, Liu W, et al. Divalent metal transporter 1 in the kidney proximal tubule is expressed in late endosomes/lysosomal membranes: implications for renal handling of protein-metal complexes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F1525–F1533.
3. Albitar S, Genin R, Fen-chong M, et al. High-dose enalapril impairs the response to erythropoietin treatment in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1206–10.
4. American Veterinary Medical Association (AVMA). Guidelines on Euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007.
5. Anderson GJ, Frazer DM, Wilkins SJ, et al. Relationship between intestinal iron transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 724–6.
6. Andrews N. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 75-98.
7. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, et al. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007; 117: 1933–9.
8. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt K. Co-localization of Erythropoietin mRNA and Ecto-5'-Nucleotidase Immunoreactivity in Peritubular Cells of Rat Renal Cortex Indicates That Fibroblasts Produce. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 331-41.
9. Barton JC, Acton RT, Richarson AK, et al. Stainable hepatic iron in 341 African Americans adults at coroner/medical examiner autopsy. *BMC Clinical Pathology* 2005; 5: 2.
10. Barton JC, Edwards CQ, BErtoli LF, et al. Iron overload in African Americans. *Am J Med* 1995; 99: 616-23.
11. Beilby JP, Prins AW, Swanson NR. Determination of Hepatic Iron Concentration in Fresh and Paraffin-embedded Tissue. *Clin Chem* 1999; 45: 573-4.
12. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* 2007; 5: 125–30.
13. Bligh J. Temperature regulation in mammals and other vertebrates. *Frontiers of biology* 30. New York: Editorial American Elsevier, 1973.
14. Boenisch T. Manual Métodos inmunohistoquímicos de coloración, 3^{era} edición. DAKO corporation, 2002.
15. Bowen BJ, Morgan EH. Anemia of the Belgrade Rat: Evidence for Defective Membrane Transport of Iron. *Blood* 1987; 70: 38-44.
16. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol* 2002; 76: 219–28.
17. Brown D, Hirsch S, Gluck S. Localization of a Proton-Pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 1988; 82: 2114–26.

18. Brown MB, Forsythe B. Robust test for equality of variances. *J.A.S.A.* 1974; 69: 364-7.
19. Canonne-Hergaux F, Gruenheid, Ponka P, et al. Cellular and subcellular localization of the Nramp 2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 1999; 93: 4406-17.
20. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, et al. Comparative studies of duodenal and macrophage Ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: 156–163.
21. Canonne-Hergaux F, Gros P. Expression of the iron transporter DMT1 in kidney from normal and anemic mice. *Kidney Int* 2002; 62: 147–56.
22. Carole Peyssonnaud AS, Zinkernagel RA, Schuepbach ER, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007; 117: 1926-32.
23. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 83-98.
24. Cole J, Ertoy D, Lin H, et al. Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 1391-8.
25. Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, et al. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G964-G971.
26. Conrad ME, Crosby WH. Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. *Blood* 1963; 22: 406-15.
27. Conrad ME, Umbreit JN, Peterson RD, et al. Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood* 1993; 81: 517-21.
28. Conte D, Velio P, Brunelli L, et al. Stainable iron in gastric and duodenal mucosa of primary hemochromatosis patients and alcoholics. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 237-40.
29. Cooper DM, Jagus R. Impaired Adeylate Cyclase activity of Phenylhydrazine-induced reticulocytes. *J Biol Chem* 1982; 257: 4684-7.
30. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, et al. C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem* 2002; 277: 41163-70.
31. Criswell KA, Sulkanen AP, Hochbaum AF, et al. Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *J Appl. Toxicol* 2000; 20: 25-34.
32. D'Andrea AD, Lodich HF, Wong GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989; 57: 277-85.
33. D'Anna MC, Veuthey TV, Roque ME. Immunolocalization of Ferroportin in Healthy and Anemic Mice. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 9-16.
34. Dallalio G, Law E, Means RT. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* 2006; 107: 2702–4.

35. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Heparin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007; 117: 1755-8.
36. Delaby C, Pilard N, Hetet G et al. A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Exp Cell Res* 2005; 310: 45-53.
37. Détiavaud L, Nemeth E, Boudjema K, et al. Heparin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood* 2005; 106: 746-8.
38. Deugnier Y, Margules S, Brissot P, et al. Comparative study between biochemical and histological methods and image analysis in liver iron overload. *J Clin Pathol* 1982; 35: 45-51.
39. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403:776–81.
40. Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The Ins and Outs of Iron Homeostasis. *Physiol* 2006; 21:115-23.
41. Dor F, Ramirez ML, Parmar K, et al. Primitive hematopoietic cell populations reside in the spleen: studies in the pig, baboon and human. *Exp hematol* 2006; 34: 1573-82.
42. Du X, She E, Gelbart T et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008; 320: 1088-92.
43. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, et al. Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut* 2002; 51: 648–53.
44. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999; 95: 1864-77.
45. Edwards JA, Hoke JE. Defects of intestinal mucosal iron uptake in mice with hereditary microcytic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 141: 81-4.
46. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 333-9.
47. Ferguson C, Wareing M, Delannoy M, et al. Iron handling and gene expression of the divalent metal transporter, DMT1, in the kidney of the anemic Belgrade (b) rat. *Kidney Int* 2003; 64: 1755–64.
48. Ferguson CJ, Wareing M, Ward DT, et al. Cellular localization of divalent metal transporter 1 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F803–F814.
49. Festing MF, Overend P, Gaines Das R, et al. The design of animal experiments. *Laboratory animal handbooks* 2004; 14.
50. Fleming MD, Romano MA, Su MA, et al. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1148-53.
51. Fleming MD, Trenor CC, Su MA, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997; 16: 383-6
52. Fleming MD. The Regulation of Heparin and Its Effects on Systemic and Cellular Iron Metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 151-8.

53. Fleming RE, Britton RS. Iron imports VI. HFE and regulation of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G590-G594.
54. Foley RN. Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 405–14.
55. Folgueras AR, De Lara FM, Pendas AM, et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* 2008; 112: 2539-45.
56. Fraga CG, Oteiza PI. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002; 180: 23-32.
57. Frazer D M, Wilkins S J, Becker E M, et al. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 2003; 52: 340–6.
58. Frazer DM, Anderson GJ, The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes received their cues? *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 288-97.
59. Frazer DM, Inglis HR, Wilkins SJ, et al. Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut* 2004; 53: 1509–15.
60. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 835-44.
61. Fried W. The Liver as a Source of Extrarenal Erythropoietin Production. *Blood* 1972; 40: 671-7.
62. Ganz T, Nemeth E. Iron imports IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 290: 199-203.
63. Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim et Biophys Acta* 2006; 1763: 690-9.
64. Ganz T. Hepcidin and Its Role in Regulating Systemic Iron Metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 507: 29-35.
65. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102: 783-8.
66. García del Moral R. *Laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid. 1993.
67. Garrick MD, Gniecko K, Liu Y, et al: Transferrin and the transferrin cycle in Belgrade rat reticulocytes. *J Biol Chem* 1993; 268:14867–74.
68. Gartner LP, Hiatt JL. *Atlas color de Histología*. 4ta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2007. 456p. ISBN: 950-06-0810-3.
69. Giannetti AM, Bjorkman PJ. HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface. *J Biol Chem* 2004; 279: 25866-75.
70. Glezerman I, Patel H, Glicklich D, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition induces death receptor apoptotic pathways in erythroid precursors following renal transplantation. *Am J Nephrol* 2003; 23: 195-201.

71. Gonzalez de la puente MA, Calderon E, Espinosa R, et al. Fatal hepatotoxicity associated with enalapril. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 1492.
72. Gosswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem* 2006; 281: 28494-8.
73. Graafland AD, Doorenbos CJ, Van Saase JC. Enalapril-induced anemia in two kidney transplant recipients. *Transpl Int* 1992; 5: 51-3.
74. Graham RM, Chua ACG, Herbison CE, et al. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4725-36.
75. Gruenheid S, Cannone-Hergaux F, Gauthier S, et al. The iron transport protein Nramp2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 1999; 189: 831-41.
76. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998; 7: 205-13.
77. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council. 6^{ta} edición, Washington DC: National Academy Press. 125p. ISBN 0-309-05377-3.
78. Gunshin H, Jin J, Fujiwara Y, et al. Analysis of the E399D mutation in SLC11A2. *Blood* 2005; 15: 2221-2.
79. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482-8.
80. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS* 1992; 307: 108-11.
81. Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp Hematol* 1977; 5:141-8.
82. Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol.* 1976; 1: 453-8.
83. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275: 161-203.
84. Hasegawa S, Rodgers JP, Shio H, et al. Impaired deformability of Heinz body-forming red cell. *Biorheology* 1993; 30: 275-86.
85. Hastings JW, Menaker M. Physiological and biochemical aspects of circadian rhythms. *Federation Proc* 1976; 35: 2325-57.
86. Haznedaroglu IC, Ozturk MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 867-80.
87. Hershko C, Link G, Cabantchik I. Pathophysiology of iron overload. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 191-201.
88. Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: Implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 12345-50.

89. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The Solution Structure of Human Hepcidin, a Peptide Hormone with Antimicrobial Activity That Is Involved in Iron Uptake and Hereditary Hemochromatosis. *JBC* 2002; 277: 37597–603.
90. Imbert-Bismut F, Charlotte F, Turlin B, et al. Low hepatic iron concentration: evaluation of two complementary methods, colorimetric assay and iron histological scoring. *J Clin Pathol* 1999; 52: 430-4.
91. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH standard EP 6/3: 1977). *J Clin Pathol* 1978; 31: 139-43.
92. Jacobs K, Shomaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of Human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-810.
93. Jain SK, Hochstein P. Membrane alterations in phenylhydrazine-induced reticulocytes. *Arch Biochem Biophys* 1980; 201: 683-7.
94. Jiménez R, Martos E, Díaz M. Desde el laboratorio a la clínica. *Metabolismo del hierro. An Pediatr Contin* 2005; 3: 352-6.
95. Kamper AL, Nielsen OJ. Effect of enalapril on haemoglobin and serum erythropoietin in patients with chronic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 611-8.
96. Kartikasari AE, Roelofs R, Schaeps RM et al. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 2029-37.
97. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 20826-32.
98. Kim D, Kim K, Choi B, et al. Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch Toxicol* 2007; 81: 327-34.
99. Kinuta M, Ji Matteson, HA Itano. Difference in rates of the reaction of various mammalian oxyhemoglobins with phenylhydrazine. *Arch Toxicol* 1995; 69: 212-4.
100. Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2003; 38: 61–88.
101. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1324-8.
102. Koeppen BM, Steinmetz PR. Basic mechanisms of urinary acidification. *Med Clin North Am* 1983; 67: 753-70.
103. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008; 88: 7-15.
104. Kong W, Chang Y, Wang S, Zhai X, Shang J, Li L, Duan X. Effect of erythropoietin on hepcidin, DMT1 with IRE, and hephastin gene expression in duodenum of rats. *J Gastroenterol* 2008; 43: 136-43
105. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988; 71: 524-7.

106. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, et al. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 1989; 74: 645-51.
107. Kozlov VA, Zhuravkin IN, Coleman RM, et al. Splenic plaque-forming cells (PFC) and stem cells (CFU-s) during acute phenylhydrazine-induced enhanced erythropoiesis. *J Exp Zool* 1980; 213: 199-203.
108. Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 2004; 53: 735-43.
109. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 2005; 184: 361-70.
110. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload hematology. *Am Soc Hematol Educ program* 2001; 47-61.
111. Lacombe C, DaSilva JL, Bruneval P, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988; 81: 620-3.
112. Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, et al. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood* 2004; 103: 2940-4.
113. Lam-Yuk-Tseung S, Gros P. Distinct targeting and recycling properties of two isoforms of the iron transporter DMT1 (NRAMP2, Slc11A2). *Biochemistry* 2006; 45: 2294-2301.
114. Latunde-Dada GO, McKie AT, Simpson RJ. Animal models with enhanced erythropoiesis and iron absorption. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 414-23.
115. Lee P, Peng H, Gelbart T, et al. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9263-5.
116. Lee PL, Gelbart T, West C, et al. The Human Nramp2 Gene: Characterization of the Gene Structure, Alternative Splicing, Promoter Region and Polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 199-215.
117. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, et al. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 1996; 10: 154-64.
118. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 2005; 106: 2884-9.
119. Linder MC, Munro HN. The mechanism of iron absorption and its regulation. *Fed Proc* 1977; 36: 2017-23.
120. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, et al. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *PNAS* 2006; 103: 13612-7.
121. Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:151-72.

122. Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, et al. Functional differences between hepcidina 1 and 2 in transgenic mice. *Blood* 2004; 103: 2816-21.
123. Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, et al. The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol* 2003; 39: 710-5.
124. Ma Y, Yeh M, Yeh K, et al. Iron imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiology* 2006; 290: G417-G422.
125. Macdougall IC. The role of ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers in the response to epoetin. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1836-41.
126. Mackenzie B, Garrick MD. Iron imports II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G981-G986.
127. Magnani M, Stocchi V, Cucchiari L, et al. Red blood cell phagocytosis and lysis following oxidative damage by phenylhydrazine. *Cell Biochem Funct* 1986; 4: 263-9.
128. Makoto A, Munemoto I, Mehdi T. Cellular and subcellular distribution of iron in the lamina propria of rat duodenum. *Cell Tissue Res* 1984; 236: 685-92.
129. Malyszko J, Mysliwiec M. Hepcidin in anemia and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30: 15-30.
130. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-810.
131. Matsuno T, Mori M. Distribution of ferritin and hemosiderin in the liver, spleen and bone marrow of normal, phlebotomized and iron overloaded rats. *Acta Med Okayama* 1985; 39: 347-60.
132. Maxwell P, Ferguson DJP, Nicholls LG, et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1977; 51: 393-401.
133. Maxwell P, Osmond M, Pugh C, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993; 44: 1149-62.
134. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron regulated ferric reductasa associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291: 1755-9.
135. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5: 299-309.
136. Mcmillan DC, Jensen CB, Jollow DJ. Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia. *J. Pharmacol Exp Ther* 1998; 28: 868-76.
137. Mead R. *The design of experiments*. Cambridge, New York: Cambridge University Press. 1988. 620 p. ISBN 0-521-24512-5
138. Mena NP, Eaparza AL, Núñez MT. Regulation of transepithelial transport of iron by hepcidin. *Biol Res* 2006; 39: 191-3.
139. Mena NP, Esparza A, Tapia V, et al. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G192-G198.

140. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 1998; 92: 345.
141. Montosi G, Corradini E, Garuti C, et al. A. Kupffer Cells and Macrophages Are Not Required for Hepatic Heparin Activation During Iron Overload. *Hepatology* 2005: 545-52.
142. Mrug M, Stopka T, Julian BA, et al. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest* 1997; 100: 2310-4.
143. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu Rev Nutr* 2008; 28:197-213.
144. Murro H, Caviglia DA, Griguoli RE, López Garcés JP. *Fisiología de la sangre*. Buenos Aires: CMT Servicios Bibliográficos, 1989. ISBN: 950-655-013-1.
145. Naughton BA, BS Dornfest, ME Bush, et al. Immune activation is associated with phenylhydrazine-induced anemia in the rat. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 498-507.
146. Nemeth E, Ganz T. Heparin and iron-loading anemias. *Haematologica* 2006a; 91: 727-32
147. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, et al. The N-terminus of heparin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 2006b; 107: 328-33.
148. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090-3.
149. Nemeth E, Valore EV, Territo M, et al. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-3.
150. Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* 2008; 15:169-75.
151. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of heparin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 98: 8780-5.
152. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver heparin. *Proc Natl Acad Sci* 2002a; 99: 4596-601.
153. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide heparin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 2002b; 110: 1037-44.
154. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, et al. Heparin, A New Iron Regulatory Peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002c; 29: 327-35.
155. Oates PS, Ahmed U. Molecular regulation of hepatic expression of iron regulatory hormone heparin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1378-87.
156. Oates PS, Trinder D, Morgan EH. Gastrointestinal uncton, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Eur J Physiol* 2000; 440: 496-502.

157. Ouyang Q, Bommakanti M, Miskimins WK. A mitogenresponsive promoter region that is synergistically activated through multiple signalling pathways. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1796-1804.
158. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, et al. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006; 108: 3730-5.
159. Panyutich A, Ganz T. Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:101-6.
160. Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 7806–10.
161. Pérez G, Vittori D, Pregi N, et al. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39: 301-14.
162. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to β -2-macroglobulin in blood. *Blood* 2009; 113: 6225-36.
163. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 294-300.
164. Pigeon C, Iiyin G, Courselaud B et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidine, is over expressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811-9.
165. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997; 183: 116-23.
166. Pinto JS, Ribeiro S, Pontes H, et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP α . *Blood* 2008; 111: 5727-33.
167. Ploemacher RE, Van Soest PL. Morphological investigation of phenylhydrazine-induced erythropoiesis in the adult mouse liver. *Cell Tissue Res* 1977; 178: 435-61.
168. Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney Int* 1990; 55: S2–S11.
169. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:10919-24.
170. Quilez C, Palazon JM, Chulia T, et al. Hepatotoxicity by enalapril. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 113-4.
171. Ramsay AJ, Reid JC, Velasco G, et al. The type II transmembrane serine protease matriptase-2--identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. *Front Biosci.* 2008; 13: 569-79.
172. Randell EW, Parkes JG, Olivieri NF, et al. Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *J Biol Chem* 1994; 269: 16046-53.
173. Redondo PA, Alvarez AI, Diez C, et al. Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. *Lab Anim Sci* 1995; 45: 578-83.

174. Rencricca NJ, Rizzoli V, Howard D, et al. Stem Cell Migration and Proliferation During Severe Anemia. *Blood* 1970; 36: 764-71.
175. Rifkind RA, Danon D. Heinz Body anemia-An ultrastructural study. I. Heinz Body formation. *Blood* 1965; 25: 885-95.
176. Rifkind RA. Heinz body anemia: an ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. *Blood* 1965; 26: 433-47.
177. Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004; 104: 4294-9.
178. Rodgers KE, Xiong S, Dizerega GS. Accelerated recovery from irradiation injury by Angiotensin peptides. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49: 403-11.
179. Rodgers KE, Xiong S, Steer R, et al. Effect of Angiotensin II on hematopoietic progenitors cell proliferation. *Stem Cells* 2000; 18: 287-94.
180. Roque ME, Sandoval MJ, Aggio MC. Serum erythropoietin and its relation with soluble transferrin receptor in patients with different types of anaemia in a locally defined reference population. *Clin Lab Haematol* 2001; 23: 291-5.
181. Roque M, D'Anna C, Gatti C, et al. "Hematological and Morphological Analysis of the Erythropoietic Regenerative Response in Phenylhydrazine-induced Hemolytic Anemia in Mice". *Scand J Lab Anim Sci* 2008, 35: 181-190.
182. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histología: texto y atlas color*. 3era edición. Mexico: Editorial Médica Panamericana, 1997. ISBN: 950-06-1857-5.
183. Rouvière H, Delmas A, Delmas V. *Anatomía humana: Descriptiva, topográfica y funcional*. Edición: 11. España: Editorial Elsevier, 2005. ISBN 8445813145, 9788445813140.
184. Sadahira Y, Yasuda T, Yoshino T, et al. Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome: an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 464-70.
185. Safran M, Kaelin WG Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 2003; 111: 779-83.
186. Sawyer ST, Penta K. Erythropoietin cell biology. *Hematol Oncol Clin N Am* 1994; 8: 895-911.
187. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:167-71.
188. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005; 122: 789-801.
189. Shi Z, Afzal V, Coller B, et al. Protein 4.1R-deficient mice are viable but have erythroid membrane skeleton abnormalities. *J Clin Invest*. 1999; 103:331-40.
190. Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C, Bulet P, Burns JC. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 2002; 269:2232-7.

191. Shindo M, Torimoto Y, Saito H, et al. Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res* 2006; 35: 152-62.
192. Silvestri L, Pagani A, Nai A, et al. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008; 8: 502-11.
193. Smith LH, Thier SO. *Fisiopatología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1983. ISBN: 950-06-1959-8.
194. Spivak JL. The clinical physiology of erythropoietin. *Seminar in hematology* 1993; 30: 2-11.
195. Steel RGD, Torrie JH. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2^{da} edición. México: Editorial McGRAW-HILL, 1993. 622 p. ISBN: 968-451-495-6.
196. Subramaniam N. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4737-45.
197. Suzuki T, Sasaki R. Immunocytochemical demonstration of erythropoietin immunoreactivity in peritubular endothelial cells of the anemic mouse kidney. *Arch Histol Cytol* 1990; 53: 121-4.
198. Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, et al. Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 22220-8.
199. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI. Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, Zip14. *FEBS Lett* 2005; 579: 427-32.
200. Tchernitchko D, Bourgeois M, Martin M, et al. Expression of the two mRNA isoformas of the iron transporter Nramp2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element. *Biochem J* 2002; 363: 449-55.
201. Theil EC. The iron responsive element (IRE) family of mRNA regulators. Regulation of iron transport and uptake compared in animals, plants, and microorganisms. *Met Ions Biol Syst* 1998; 35: 403-34.
202. Theurl I, Ludwiczek S, Eller P, et al. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload. *J Hepatol* 2005; 43: 711-9.
203. Thompson K, Molina RM, Brain JD, et al. Belgrade Rats Display Liver Iron Loading. *J Nutr* 2006; 136: 3010-4.
204. Tolosano E, Hirsch E, Patrucco E, et al. Defective Recovery and Severe Renal Damage after Acute Hemolysis in Hemopexin-Deficient Mice. *Blood* 1999; 94: 3906-14.
205. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 7ma edición. Madrid: Editorial Harcourt, 1996. ISBN: 0-06-0446702-9.
206. Touret N, Furuya W, Forbes J, Gros P, Grinstein S. Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the Transferrin receptor. *JBC* 2003; 278: 25548-57.

207. Trinder D, Fox C, Vautier G, et al. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002; 51: 290-5.
208. Trinder D, Oates PS, Thomas C, et al. Localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat in duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut* 2000; 46: 270-6.
209. UFAW / Royal Society, U.K. Guidelines for the care of laboratory animals and their use for scientific purposes I. housing and Care. London, 1987.
210. Umbreit JN, Conrad ME, Moore EG, et al. Paraferitin: a protein complex with ferrireductase activity I associated with iron absorption in rats. *Biochemistry* 1996; 35: 6460-9.
211. Uzel C, Conrad ME. Absorption of heme iron. *Semin Hematol* 1998; 35: 27-34.
212. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 132-8.
213. Van Krieken JH, Te Velde J. Spleen. *Histology for pathologists*. Second edition Chapter 29, pag 675-85.
214. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of Laboratory animal science. Editorial Elsevier Science Publishers, 1993.
215. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, et al. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 2007; 109: 353-8.
216. Veuthey T, D'Anna MC, Roque ME. Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin, and DMT1 in anemic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1213-F1221.
217. Veuthey TV, D'Anna MC, Sánchez M, Gatti CJ, Roque ME. Effect of Enalapril on erythropoiesis recovery in murine anemia. *Ars Pharm* 2008; 49: 25-40.
218. Viatte L, Lesbordes-Brion J, Lou D, et al. Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood* 2005; 105: 4861-4.
219. Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009; 91: 1223-8.
220. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, et al. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006; 55: 667-74.
221. Wallace DF, Summerville L, Lusby PE et al. Prohepcidin localises to the Golgi compartment and secretory pathway in hepatocytes. *J Hepatol* 2005; 43: 720-8.
222. Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763:668-89.
223. Wareing M, Ferguson CJ, Delannoy M, et al. Altered dietary iron intake is a strong modulator of renal DMT1 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F1050-F1059.
224. Wareing M, Ferguson CJ, Green R, et al. In vivo characterization of renal iron transport in the anaesthetized rat. *J Physiol* 2000; 524: 581-6.

225. Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, et al. Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2140-4.
226. Weintraub LR, Conrad ME, Crosby WH. The significance of iron turnover in the control of iron absorption. *Blood* 1964; 24: 19-24.
227. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 70-8.
228. Wessling-Resnick M. Iron Imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1-G6.
229. West AP, Bennett MJ, Sellers VM, et al. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 2000; 275: 38135-8.
230. West AP, Giannetti AM, Herr AB, et al. Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J Mol Biol* 2001; 313: 385-97.
231. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1992; 74: 227-36.
232. Wolber FM, Leonard E, Michael S, et al. Role of spleen and liver in development of murine hematopoietic system. *Exp Hematol* 2002; 30: 1010-9.
233. Worthington MT, Cohn SM, Miller SK, et al. Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 1172-7.
234. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin- 6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006; 108: 3204-9.
235. Wu H, Lee SH, Gao J, et al. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999; 126: 3597-605.
236. Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, et al. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood* 2004; 104: 2178-80.
237. Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, et al. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Med Sci* 2003; 65: 449-52.
238. Zhang AS, West AP Jr, Wyman AE, et al. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 2005; 280:33885-94.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ORIGINADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- D'Anna C, Gatti C, Veuthey T, Sánchez M, Roque M. "Eritropoyesis y esplenectomía en un modelo murino". Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca 2006; 16(4):88-96.
- Veuthey T, D'Anna C, Sánchez M, Gatti C, Roque M. "Effect of Enalapril on erythropoiesis recovery in murine anemia". ARS Pharmaceutica 2008; 49 (1): 25-40.
- Roque M, D'Anna C, Gatti C, Veuthey T. "Hematological and Morphological Analysis of the Erythropoietic Regenerative Response in Phenylhydrazine-induced Hemolytic Anemia in Mice". Scandinavian Journal of Laboratory of Animal Science 2008, vol 35 (3): 181-190.
- Veuthey Tania V, D'Anna Maria C, Roque Marta E. "Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin and DMT1 in anemic mice". American Journal of Physiology-Renal Physiology 2008; 295: F1213-1221.
- D'Anna Maria C, Veuthey Tania V, Roque Marta E. "Immunolocalization of ferroportin in healthy and anemic mice". Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2009; 56: 9-16.

PUBLICACIONES EN ACTAS DE CONGRESOS, CON PUBLICACIÓN DE RESUMEN

- Veuthey TV; Gatti CJ; Giambelluca MS; D'Anna MC; Sanchez M; Roque ME. "Estrés oxidativo en un modelo de ratón". X Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. 15 al 17 de Marzo de 2006. Biocell 2006; 30 (3):526
- Veuthey TV.; Gatti CJ.; D'Anna MC.; García B.; Pennacchiotti G.; Roque ME. "Eritropoyesis en un modelo mamífero". X Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. 15 al 17 de Marzo de 2006. Biocell 2006; 30 (3):527
- D'Anna MC.; Veuthey TV.; Gatti CJ.; Giambelluca MS.; Elía MA, López G.; Roque. ME. "Modulación eritropoyética por Renina-Angiotensina-Aldosterona". X Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Del 15 al 17 de Marzo de 2006. Biocell 2006; 30 (3):509.
- Veuthey T; Sánchez M; D'Anna MC; Gatti C; Roque M. "Respuesta Hematológica a la Anemia Hemolítica en ratones esplenectomizados". LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 8 al 11 de Noviembre de 2006. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2006; 66(2):98.
- Veuthey T; Pennacchiotti G; D'Anna MC; Sánchez M; Gatti C; Roque M. "Sobrecarga de Hierro en un Modelo Murino". LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 8 al 11 de Noviembre de 2006. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2006; 66(2):99
- D'Anna MC; Veuthey T; Sánchez M; Gatti C; Roque M. "Modelo Murino de Hipoxia Normobárica". LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina

de Inmunología (SAI). Del 8 al 11 de Noviembre de 2006. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2006; 66(2):187.

- Veuthey T, D'Anna C, Pennacchiotti G, Roque M. "Cambios en la expresión del Transportador de Cationes Divalentes 1 en ratón anémico". LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 21 al 24 de Noviembre de 2007. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2007; 67(2):70.

- D'Anna C, Veuthey T, Lopez G, Roque M. "Localización inmunohistoquímica de Ferroportina en tejidos murinos". LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 21 al 24 de noviembre de 2007. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2007; 67(2):72.

- Veuthey Tania V, D'Anna M Cecilia, Roque Marta E. Expresión de Prohepcidina renal en ratones sanos y anémicos. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas y I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. Del 14 al 16 de Mayo de 2008. Córdoba. Argentina. International Journal of Morphology, pag 752.

- Veuthey Tania V, Roque Marta E. Modulación de la Expresión del Transportador de Cationes Divalentes 1 en Sobrecarga de Hierro. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas y I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. Del 14 al 16 de Mayo de 2008. Córdoba. Argentina. International Journal of Morphology, pag 764.

- Veuthey T, Roque M. Modulación de Prohepcidina y DMT1 renal en sobrecarga de Hierro. LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología. Del 19 al 22 de Noviembre de 2008. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2008; 68 (2): 109.

- Veuthey TV, Wessling-Resnick M, Roque M.E. “Prohepcidina y Eritropoyetina en Riñon de Ratas Belgrade”. Aceptado para su presentación LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 18 al 21 de Noviembre. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2009; 69 (1): 194.

- Veuthey TV, D’Anna MC, Giorgi G, Roque ME. “Modulación dual de Hecpidina Por Hierro y Anemia”. Aceptado para su presentación LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Del 18 al 21 de Noviembre. Mar del Plata. Argentina. Medicina 2009; 69 (1): 195

- Veuthey TV; D’anna MC; Pennacchiotti G; Rodriguez S; Roque ME. “Movilización del Hierro Tisular: Función del Transportador de Metales Divalentes 1 y de Ferroportina”. Primeras Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense. 4 y 5 de Diciembre. Bahía Blanca. Argentina. Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca 2009; 19 (1): 24

- D’Anna MC; Veuthey TV; Giorgi G; Garcia B; Roque ME. “Regulación del Hierro por Hecpidina en Inflamación y Sobrecarga de Hierro” Primeras Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense. 4 y 5 de Diciembre. Bahía Blanca. Argentina. Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca 2009; 19 (1): 26

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

a- INTERNACIONALES

- D’Anna C, Gatti C, Giambelluca M, Calvo N, Veuthey T, Roque M. “Murine splenic ultrastructure in animal models with hemolytic anemia”. Internacional/ICLAS Regional Scientific Meeting: Advances in the Care and Use of Laboratory Animals. Del 9 al 12 de Noviembre del 2004. Buenos Aires, Argentina.

- Veuthey T, Gatti C, Giambelluca M, Calvo N, D'Anna C, Comerón M, Roque M. "Erythropoiesis in normal and anemic mice". Internacional/ICLAS Regional Scientific Meeting: Advances in the Care and Use of Laboratory Animals. Del 9 al 12 de Noviembre del 2004. Buenos aires.

b- NACIONALES

- Veuthey T, Gatti C, Giambelluca M, D'Anna C, Garcia B, Roque M. "Modulación de la eritropoyesis extramedular por el sistema renina angiotensina: un estudio morfológico" V Congreso de Bioquímicos de la Ciudad de Buenos Aires. Del 23 al 25 de Junio de 2005. Buenos Aires, Argentina.

- D'Anna C, Gatti C, Giambelluca M, Veuthey T, García B, Roque M. "Efecto del enalaprilato en la recuperación de la anemia hemolítica murina." V Congreso de Bioquímicos de la Ciudad de Buenos Aires. Del 23 al 25 de Junio de 2005. Buenos Aires, Argentina.

- Veuthey T, D'Anna MC, Gatti C, Roque M. "Intestinal expression of Divalent Metal Transporter 1 in a mouse model of hemolytic anemia". II Reunión Científica Regional, I Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de animales de laboratorio. Del 29 al 31 de agosto de 2007. Buenos Aires, Argentina.

- Veuthey T, D'Anna MC, Gatti C, Roque M. "Divalent Metal Transporter 1 expression in renal mouse tissue". II Reunión Científica Regional, I Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de animales de laboratorio. Del 29 al 31 de agosto de 2007. Buenos Aires, Argentina

- D'Anna MC, Veuthey T, Gatti C, Roque M. "Ferroportin expression in anemic mice". II Reunión Científica Regional, I Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de animales de laboratorio. Del 29 al 31 de agosto de 2007. Buenos Aires, Argentina.

- Gatti Christian, D'Anna M. Cecilia, Veuthey Tania V, Roque Marta E. “Combinación de técnicas histológicas para la identificación de proteínas del metabolismo del Hierro”. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas y I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. Del 14 al 16 de Mayo de 2008. Córdoba. Argentina.

- D'Anna MC, Veuthey TV, Roque ME. “Respuesta a la hipoxia mediada por hepcidina de ferroportina duodenal y renal”. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. 15 y 16 de Octubre de 2009. La Plata. Argentina