



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO Y SU
INTEGRACIÓN REGULATORIA**

Fernández Delias María Florencia

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

Año 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO Y SU
INTEGRACIÓN REGULATORIA**

Fernández Delias María Florencia

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

Año 2024

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 año 2016 y el año 2021, bajo la dirección de la Dra. Prof. Marta E. Roque.

María Florencia Fernández Delias

Bahía Blanca,

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p>
<p>La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la calificación de(.....)</p>	

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Marta Roque, quien me guió con gran dedicación por el camino de la investigación desde mis inicios como becaria alumna de Fisiología Humana hasta el día de hoy. Por su apoyo y confianza en mi trabajo y su participación activa para el desarrollo de esta tesis.

En segundo lugar, agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) por haberme otorgado la beca doctoral que me permitió desarrollar este trabajo de tesis. Agradezco también al departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS por su apoyo. También a la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA por las pasantías realizadas en el Laboratorio de Eritropoyetina en la Fisiología Celular de las Dras. Alcira Nesse, Daniela Vittori y María Eugenia Chamorro.

A todos mis compañeros del laboratorio y de la cátedra de Fisiología Humana, con los cuales compartí hermosos momentos, a Alejandra Elía por colaborar desinteresadamente en el desarrollo del modelo animal y especialmente a mi compañera y amiga Gisela Giorgi, por su ayuda incondicional desde lo laboral y experimental como así también su apoyo y aliento personal durante todos estos años. A todos mis compañeros actuales, a todo el INIBIBB, gracias por escucharme y alentarme en el último tramo de este camino.

A mi compañero de vida Joaquín quien estuvo a mi lado día a día y apoyó siempre para lograr mis metas. A nuestro pequeño sol Jonás que ilumina nuestros días, dándonos siempre una razón para sonreír y a nuestra pequeña Malvina a quien conoceremos pronto. Agradezco el amparo de mis padres que me apoyan incondicionalmente, a mis hermanas que me acompañan siempre y a toda mi familia, quienes siempre creyeron en mí. A mis abuelos Tata y Yaya que sé que desde el cielo están orgullosos de mis logros. Gracias a todos por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar.

Flor

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la coordinación regulatoria de proteínas que participan en la movilización y depósito de hierro a través de las membranas celulares, en condiciones experimentales de balance y desbalance del ciclo del biometal.

Los objetivos planteados se analizaron con un concepto fisiológico y fisiopatológico integrativo en un Modelo *in vivo* de ratón, desarrollando un Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro, combinándolo con eritropoyesis activa inducida por eritropoyetina, y en un Modelo *in vitro* de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y de Sobrecarga de Hierro con citrato amónico férrico (FAC) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂), previamente tratadas con eritropoyetina o N acetyl cisteína (NAC).

Los modelos de Sobrecarga de Hierro con las estrategias experimentales diseñadas nos posibilitaron estudiar la respuesta de las proteínas del Ciclo de Hierro frente a los cambios inducidos, evaluando la expresión de las siguientes proteínas: importador de metales divalentes 1 (DMT1); importador ZIP14 (SLC39A14); receptor de Transferrina 1 (RTf1); receptor de Transferrina 2 (RTf2); proteínas regulatorias como la proteína de la hemocromatosis (HFE) y Prohepcidina; proteínas de depósito de hierro como L y H Ferritina; Hemosiderina.

Para la identificación de proteínas y la evaluación de su expresión y localización se utilizaron métodos inmunohistoquímicos, inmunocitoquímicos y de inmunofluorescencia.

La optimización del Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro con inducción de eritropoyesis activa se evaluó mediante la determinación de parámetros hematológicos y estudios morfológicos del bazo como el principal órgano eritropoyético extramedular murino en el ratón adulto.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro en el bazo se observó un significativo aumento de la expresión citoplasmática de proteínas responsables de la captación de hierro celular (DMT1 y ZIP14) y de las proteínas de depósito Ferritina y Hemosiderina y de la proteína reguladora Prohepcidina.

Estos cambios ponen en evidencia la inducción de un mecanismo inhibitorio de liberación del hierro celular, que estaría mediado por el eje hepcidina-ferroportina. En estas condiciones experimentales, el exceso de hierro induce el aumento en la expresión de Prohepcidina que, como principal hormona regulatoria, degrada la Ferroportina, única proteína que induce la liberación del hierro celular vía proteosomal previa ubiquitinización, originando, como consecuencia, la retención celular de hierro.

Por el contrario, en el modelo de Sobrecarga de Hierro combinado con eritropoyesis activada por EPO se redujo la expresión de estas proteínas sugiriendo que la activación de la eritropoyesis induce

la liberación de hierro, lo que indicaría que EPO es la señal predominante, sobre la señal de hierro, que preponderó en el modelo combinado.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro duodenal la marcada localización perinuclear de DMT1 y la disminución de la expresión citoplasmática de ZIP14, inducen la reducción de la absorción de hierro dietario, como un mecanismo protector para limitar la captación del biometal ya que el mismo se encuentra en exceso, en este sentido DMT1 sigue la señal de EPO y ZIP14 sigue la señal de hierro.

En el tejido duodenal la administración de EPO reveló la evidente localización apical de DMT1 y la marcada expresión citoplasmática de ZIP14, que indicarían que la eritropoyesis activó la captación del hierro de la dieta para cubrir las necesidades de la síntesis de eritrocitos.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro en hígado se observó un evidente aumento de la expresión citoplasmática de ZIP14, responsable de la captación de hierro celular y de la expresión de las proteínas de depósito, L ferritina y hemosiderina, y de prohepcidina indicando aumento de la captación celular de hierro, de los depósitos del mismo y la inhibición de la liberación del hierro celular por el eje hepcidina-ferroportina en estas condiciones experimentales. Por el mecanismo descrito se le puede adjudicar al hígado la función de órgano de depósito de hierro.

El hígado desarrollaría un efecto regulador o protector de la captación del hierro en exceso que se deduce de la disminución de la expresión de DMT1 que podría ser mediada por hepcidina, inhibiendo así la captación de hierro en exceso.

En el Modelo de Eritropoyesis la presencia de eritropoyetina depleciona los depósitos hepáticos de hierro para utilizarlo en la eritropoyesis activa estimulando la liberación del biometal desde los hepatocitos via el eje hepcidina-FPN.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro la corteza renal mostró aumento de su captación y elevados depósitos en forma de L ferritina y Hemosiderina mediados por el importador ZIP14. Asimismo, se observó aumento de la expresión de prohepcidina. Al igual que en hígado la disminución de la expresión de DMT1 que podría ser regulada por hepcidina no logró contrarrestar el exceso de la captación de hierro por el aumento de la expresión de ZIP14.

Entre los órganos particularmente susceptibles al exceso de hierro se pueden mencionar, corazón, pulmón y páncreas. Nuestros estudios muestran que el importador ZIP14 cardíaco no tuvo cambios de expresión y localización por el efecto de hierro y EPO mientras que DMT1 disminuyó su expresión como en otros tejidos frente al estímulo del exceso del biometal.

Podemos concluir que en corazón el exceso de hierro no estaría mediado por los importadores ZIP14 y DMT1. Asimismo, en el Modelo de Eritropoyesis activa, la eritropoyetina tendría un rol

protector en corazón disminuyendo los niveles de los depósitos de hierro independientemente de DMT1 y ZIP14 aumentando la liberación de hierro.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro en pulmón, el aumento en la captación celular de hierro estaría mediado por la localización apical de DMT1 y el aumento de la expresión citoplasmática de ZIP14. En presencia de EPO se observó redistribución de DMT1 al citoplasma celular y disminución de la expresión de ZIP14, disminuyendo la captación de hierro cuando coexisten sobrecarga y EPO.

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro en el páncreas endócrino se observó la disminución de la expresión de DMT1 y del Receptor de Transferrina 1 (Rtf1) lo que indicaría la existencia de un mecanismo protector en islotes de Langerhans para disminuir la captación de hierro en exceso. Mientras que en páncreas exócrino los acinos incorporan el hierro vía el aumento de la expresión de ZIP14 depositando el hierro en exceso en las proteínas de depósito L-ferritina y hemosiderina.

En presencia de EPO en islotes de Langerhans se podría estimular la captación celular de hierro mediada por el evidente aumento de la expresión de DMT1. En presencia de EPO en acinos pancreáticos la marcada disminución de la expresión de ZIP14 podría explicar la disminución de la captación de hierro.

Podemos concluir que, en presencia de hierro y EPO, el páncreas endócrino es regulado por el mecanismo que responde a la señal hierro mientras que el páncreas exócrino es regulado por la señal EPO y de esta forma disminuye los depósitos de hierro ante la gran demanda de la eritropoyesis activa.

En los estudios del Modelo de Sobrecarga de Hierro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y realizados en ausencia de NAC, se vio que el exceso de hierro induce la muerte neuronal mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) mientras que en presencia de NAC se revierte el efecto sobre la viabilidad celular inducido por FAC y la expresión de las proteínas clave del ciclo de hierro.

En exceso de hierro si bien se observó la disminución de la expresión de DMT1 que podría ser mediada por hepcidina, el cambio observado no logró proteger a las células neuronales del exceso debido a la incorporación del biometal mediada por el aumento de la expresión de ZIP14 y la endocitosis de RTf1.

Una hipótesis posible que explicaría el exceso de hierro neuronal es el aumento de la expresión de prohepcidina en Sobrecarga de Hierro que inhibe su liberación celular mediante el eje hepcidina-FPN.

Un hallazgo a destacar de nuestros estudios fue demostrar por primera vez por inmunofluorescencia la vía de señalización neuronal que induce el aumento de la síntesis de hepcidina mediada por la colocalización de HFE y RTf2.

En presencia de eritropoyetina se observó un aumento significativo de la viabilidad celular, sin embargo, ese mecanismo no sería mediado por las proteínas clave del ciclo del hierro, pero podría involucrar otras vías de señalización como las proteínas antiapoptóticas.

Los estudios en sistema nervioso permitieron demostrar que este tejido posee los mecanismos necesarios para almacenar hierro en exceso.

Los estudios realizados en las regiones como estriado, hipocampo, sustancia negra y cerebelo mostraron la disminución de la expresión de DMT1 y el aumento de la expresión de ZIP14 en concordancia con lo observado en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios para comprender la homeostasis del hierro y su regulación en el sistema nervioso.

Finalmente, la relación entre el hierro y las proteínas que regulan el ciclo del hierro en las células de los modelos estudiados contribuirán a la mejor comprensión de los mecanismos que participan en la fisiología y fisiopatología del ciclo del hierro.

La acción protectora de EPO en células neuronales y en los diferentes tejidos estudiados abre un futuro prometedor para adjudicarle a esta hormona un posible rol en el tratamiento de enfermedades asociadas con desordenes de exceso de hierro.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the regulatory coordination of the proteins involved in mobilization and deposition of iron across the cell membranes, in balance and imbalance of the biometal cycle states.

The proposed objectives were analysed with physiological and physio pathological integrative concept in an in vivo mouse model developing an Animal Model of Iron Overload, combined with active erythropoiesis induced by erythropoietin (EPO) and in an in vitro model of human neuroblastoma cells SH-SY5Y of Iron Overload with ferric ammonium citrate (FAC) or hydrogen peroxide (H₂O₂), previously treated with N acetyl cysteine (NAC) or EPO.

The Iron Overload models with the experimental strategies designed allow us to study the response to Iron cycle to the induced changes, evaluating the expression of the following proteins: divalent metals transporter 1 (DMT1), importer ZIP14 (SLC39A14), Transferrin Receptor 1 (TRf1), Transferrin Receptor 2 (TRf2), regulatory proteins that the hemochromatosis protein (HFE) and prohepcidin, deposit proteins that L and H Ferritin and Hemosiderin.

Immunohistochemistry, immucytochemistry and immunofluoresce were used in the identification of proteins and in the evaluation of their expression and location.

The efficiency of the animal model of Iron Overload with induction of active erythropoiesis was evaluated by determining haematological parameters and morphological studies of the spleen as the main murine extramedullary erythropoietic organ in the adult mouse.

In the Iron Overload model in the spleen, we observed a significative increase in the cytoplasmic expression of importer proteins DMT1 and ZIP14, and in the deposit proteins Ferritin and Hemosiderin and in the regulatory protein Prohepcidin.

These changes reflect the induction of the inhibitory iron cellular depletion mechanism mediated by the hepcidin-ferroportin axis. In these experimental conditions, the Iron Overload induce the increased Prohepcidin expression that degrade the unique Iron exporter Ferroportin by proteosome previous ubiquitination consequently the Iron is retained in the cell.

In the opposite side, in the Iron Overload combined with active erythropoiesis by EPO the protein expression was lower than the Iron Overload condition suggesting that the erythropoiesis induce iron release indicating that EPO is the predominant signal.

In the duodenal Iron Overload model, the marked DMT1 perinuclear location and the decrease in cytoplasmic ZIP14 expression induce the reduction of the dietary iron absorption, as a protective mechanism to limit the biometal uptake since it is in excess.

When erythropoiesis by EPO was activated in duodenal tissue the DMT1 apical location was evident and the marked cytoplasmic ZIP14 expression was observed, suggesting that the erythropoiesis activated the iron dietary uptake to cover the needs in the erythrocytes synthesis.

In the liver of Iron Overload model we observed an evident increase in the cytoplasmic ZIP14 expression, the protein responsible for the iron uptake and the increase in the deposit proteins L ferritin and hemosiderin expression and the increase in the expression of the regulatory protein prohepcidin, suggesting the increment in the iron uptake, store and the release inhibition by the hepcidin-ferroportin axis in these experimental conditions. By the describe mechanism, the liver can be assigned the function of iron deposition organ.

The liver would develop a regulatory or protective effect of iron excess uptake that is deduce from the lower DMT1 expression that could be mediated by hepcidin, thus inhibiting iron excess uptake.

In the Erythropoiesis model the EPO presence deplets the hepatic iron store for use in the active erythropoiesis by stimulating the hepatocyte biometal release by the hepcidin-ferroportin axis. In the Iron Overload model the renal cortex showed a significative increase in iron uptake and deposits as L-ferritin and hemosiderin mediated by the ZIP14 iron importer. Increased expression of prohepcidin was also observed. As in the liver, the decreased DMT1 expression that could be regulated by hepcidin failed to counteract the iron excess uptake mediated by the increase in the ZIP14 expression.

The heart, lung and pancreas are organs particularly susceptible to iron excess. We demonstrate that cardiac ZIP14 importer showed no changes of the expression or location induced by iron excess or EPO while DMT1 expression decreased as in others tissues against the Iron Overload stimulus. We can conclude that the heart iron excess would not be mediated by the iron importers ZIP14 and DMT1.

Likewise, in the erythropoiesis active model, EPO would have a protective role in the heart decreasing the levels of iron stores independently of DMT1 and ZIP14.

In the Iron Overload model in lung the iron uptake increase would be mediated by the apical location of the iron importer DMT1 and the cytoplasmic ZIP14 expression increased.

In the EPO condition we observed the DMT1 redistribution to cellular cytoplasm and decrease ZIP14 expression suggesting a lower iron uptake when iron and EPO stimulus coexist.

In the Iron Overload model in endocrine pancreas the lower expression of DMT1 and the transferrin receptor 1 (TRf1) was observed, which would indicate the existence of a protective mechanism in the Langerhans islets to decrease iron excess uptake.

While in exocrine pancreas the acini uptake the iron excess by the increased ZIP14 expression depositing the iron excess by the storage proteins L-ferritin and hemosiderin.

We can conclude that in Iron and EPO presence the endocrine pancreas zone is regulated by the iron mechanism while the exocrine pancreas zone is regulated by the EPO signal and in this way it decreases the iron stores due to the great demand of active erythropoiesis.

In the Iron Overload studies in neuroblastoma cells SH-SY5Y in NAC absence we observed that the iron excess induces neuronal death mediated by reactive oxygen species (ROS) while this effect and the iron key proteins expression change induced by ferric ammonium citrate (FAC) was reversed in NAC presence.

In Iron Overload the decreased DMT1 expression observed could be mediated by the hepcidin increase, nevertheless this change failed to protect neuronal cells to the iron excess because the iron uptake mediated by ZIP14 and the TRf1 endocytosis.

A possible hypothesis to explain the neuronal iron excess is the increase in prohepcidin expression in Iron Overload condition that inhibits the iron cellular release by hepcidin-FPN axis.

A noteworthy finding of our studies was to demonstrate for the first time by immunofluorescence the signaling pathway that induces the hepcidin synthesis by the coexpression of HFE and TRf2.

In EPO presence a significant increase in cellular viability was observed, however, this mechanism didn't be mediated by iron key proteins but could be mediated by another pathway signals that antiapoptotic proteins.

The brain studies allow us to demonstrate that this tissue has the necessary mechanisms to store iron in excess.

Studies performed in the nervous system regions such as the striatum, hippocampus, substantia nigra and cerebellum showed DMT1 decreased expression and ZIP14 increased expression in concordance that we observed in the human neuroblastoma cellular model.

However, future studies will be necessary to understand iron homeostasis and its regulation in the brain.

Finally, the relationship between iron and the cellular proteins in the studied models will contribute to the major comprehension of the mechanism involved in the iron cycle physiology and pathophysiology.

The protective EPO action observed in neuronal cells and in different tissues in the present tesis work open a new window to use it that a possible treatment in diseases related to iron disorders.

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN

1. CICLO DEL HIERRO	1
1.2 ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO.....	3
1.3 CAPTACIÓN, TRANSPORTE Y DEPÓSITOS DE HIERRO.....	7
2. REGULACIÓN DEL CICLO DEL HIERRO	13
2.1 ROL CENTRAL DE HEPCIDINA.....	13
2.2 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR INFLAMACIÓN.....	23
2.3 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR ERITROPOYESIS.....	24
2.4 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR HIPOXIA.....	29
2.5 REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	31
3. ERITROPOYETINA	35
3.1 ESTRUCTURA MOLECULAR.....	35
3.2 ORIGEN Y FUNCIÓN.....	36
3.3 MECANISMO DE ACCIÓN.....	38
3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ERITROPOYETINA.....	41

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO ANIMAL	43
1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION	43
1.1.1 CEPA ANIMAL.....	43
1.1.2 PRINCIPIO DE LAS TRES R: NÚMERO DE ANIMALES A UTILIZAR.....	43
1.1.3 CONDICIONES DE BIENESTAR ANIMAL.....	44
1.1.4 APROBACIÓN ÉTICA.....	44
1.2 DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL	45
1.2.1 TRATAMIENTO.....	45
1.2.2 VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO.....	46
1.2.3 SEGUIMIENTO Y CONTROL.....	47
1.2.4 VÍA DE EXTRACCIÓN SANGUÍNEA.....	47

Índice de contenidos

1.3 ENSAYOS HEMATOLOGICOS	48
1.3.1 FÓRMULA LEUCOCITARIA.....	48
1.3.2 HEMOGLOBINA.....	48
1.3.3 HEMATOCRITO.....	49
1.3.4 HIERRO PLASMÁTICO.....	49
1.3.5 RECUENTO DE RETICULOCITOS.....	50
1.4 SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS	50
1.4.1 MÉTODO DE SACRIFICIO.....	50
1.4.2 EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS.....	51
1.4.2.1 OBTENCIÓN DE REGIONES CEREBRALES.....	51
1.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	52
1.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	53
1.5.2 CORTE EN MICRÓTOMO.....	53
1.5.3 IDENTIFICACIÓN DE ÁREAS CEREBRALES.....	53
1.5.4 IDENTIFICACIÓN DE SEGMENTOS RENALES.....	54
1.5.5 TINCIÓN DE HEMOTOXILINA Y EOSINA.....	54
1.5.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	55
1.5.6 TINCIÓN DE PERLS- ANÁLISIS CUALITATIVO DEL NIVEL DE HIERRO TISULAR	55
1.5.6.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	55
1.5.6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	56
1.5.7 TINCIÓN DE PERLS MODIFICADA.....	56
1.5.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	56
1.5.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	56
1.6 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TISULAR	57
1.7 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	57
1.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	58
1.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	58

Índice de contenidos

1.7.3 ESPECIFICIDAD TISULAR DE LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS ANTICUERPOS: TIEMPO DE REVELADO.....	59
1.8 IMÁGENES TISULARES.....	61
1.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
2.MODELO CELULAR.....	61
2.1 LÍNEA CELULAR.....	61
2.2 CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO CELULAR.....	62
2.3 CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR.....	62
2.4 TRATAMIENTOS Y PRETRATAMIENTOS CELULARES.....	62
2.4.1 TRATAMIENTO CON CITRATO AMÓNICO FÉRRICO (FAC).....	62
2.4.2 PRETRATAMIENTO CON N-ACETIL CISTEINA.....	63
2.4.3 TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	63
2.4.4 PRETRATAMIENTO CON ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE.....	63
2.4.5 PRETRATAMIENTO CON ALBÚMINA.....	63
2.5 VIABILIDAD CELULAR.....	64
2.5.1 TÉCNICA DE EXCLUSIÓN CELULAR CON AZUL TRIPÁN.....	64
2.5.2 ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRAL PARA ESTIMAR VIABILIDAD CELULAR.....	64
2.5.2.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	64
2.5.2.2 PROTOCOLO.....	65
2.6 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	65
2.7 INMUNOCITOQUÍMICA.....	65
2.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	65
2.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	66
2.7.3 ANTICUERPOS Y TIEMPOS DE REVELADO.....	67
2.8 INMUNOFLUORESCENCIA.....	67
2.8.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.....	67
2.8.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	68
2.8.3 ANTICUERPOS Y DILUCIONES UTILIZADAS.....	69

Índice de contenidos

2.9 OBTENCIÓN DE IMÁGENES FOTOGRÁFICAS CELULARES.....	69
2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69

CAPÍTULO 1: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

El bazo murino: órgano eritropoyético extramedular.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS EN UN MODELO ANIMAL DE SOBRECARGA DE HIERRO

1.INTRODUCCIÓN.....	71
2.DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL.....	72
3.1 Expresión del Transportador de Metales Divalentes 1.....	72
3.2 Expresión del Transportador ZIP14.....	74
3.3 Expresión de L-ferritina.....	76
3.4 Expresión de Prohepcidina.....	78
3.5 Control negativo.....	79
4.DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS.....	80
4.1 Nivel de Hemoglobina.....	80
4.2 Hematocrito.....	80
4.3 Fórmula Leucocitaria Relativa.....	81
4.4 Recuento de Reticulocitos.....	82
5.CUANTIFICACIÓN DE HIERRO SISTÉMICO.....	83
6.EVALUACIÓN DEL BAZO COMO ÓRGANO ERITROPOYÉTICO MURINO.....	84
6.1 Análisis del tamaño del Bazo.....	84
6.2 Observación microscópica de la histología esplénica.....	84
6.3 Cuantificación de Hierro Tisular.....	85
6.4 Semicuantificación de Hierro Tisular.....	86

DISCUSIÓN

1.ERITROPOYESIS.....	88
----------------------	----

Índice de contenidos

2. NIVEL DE HIERRO.....	88
3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	88
4. ERITROPOYESIS ESPLÉNICA.....	89
5. PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	90
5.1 PROTEÍNAS IMPORTADORAS Y DE DEPÓSITO DE HIERRO.....	90
5.2 PROTEÍNA REGULATORIA HEPCIDINA.....	90
5.3 RESPUESTA DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO A EPO.....	91
6. CONCLUSIONES.....	91

CAPÍTULO 2: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Duodeno, Hígado, Riñón Absorción y movilización de hierro

RESULTADOS

1. INTRODUCCIÓN.....	95
2. TEJIDO DUODENAL.....	96
2.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA INTESTINAL.....	96
2.2 EVALUACIÓN DEL HIERRO TISULAR.....	98
Semicuantificación de Hemosiderina.....	98
2.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO DUODENALES.....	99
2.3.1 Transportador de Metales Divalentes 1.....	99
2.3.2 Transportador ZIP14.....	100
2.3.3. Control negativo de inmunomarcación.....	101
3. HÍGADO.....	101
3.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA HEPÁTICA.....	101
3.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO HEPÁTICO.....	103
3.2.1 Cuantificación de hierro tisular.....	103
3.2.2 Semicuantificación de Hemosiderina.....	104
3.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO HEPÁTICAS.....	105

Índice de contenidos

3.3.1 Transportador de Metales Divalentes 1.....	105
3.3.2 Expresión del transportador ZIP14.....	107
3.3.3 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina.....	107
3.3.4 Expresión de prohepcidina.....	108
3.3.5 Control negativo de inmunomarcación.....	109
4. RIÑÓN.....	110
4.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA RENAL.....	110
4.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO RENAL.....	113
4.2.1 Cuantificación de hierro tisular.....	113
4.2.2 Semicuantificación de hierro tisular como Hemosiderina.....	114
4.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO RENALES.....	116
4.3.1 Expresión del Transportador de Metales Divalentes 1.....	116
4.3.2 Expresión del transportador ZIP14.....	119
4.3.3 Expresión de prohepcidina.....	122
4.3.4 CONTROL NEGATIVO DE INMUNOMARCACION.....	123

DISCUSIÓN

1. DUODENO.....	124
1.1 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	124
1.1.1 Importador de hierro DMT1.....	124
1.1.2 Importador de hierro ZIP14.....	126
1.2 CONCLUSIONES.....	128
2. HÍGADO.....	128
2.1 CONTENIDO DE HIERRO.....	128
2.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	129
2.2.1 Proteína de depósito de hierro L-ferritina.....	129
2.2.2 Importador de hierro DMT1.....	129
2.2.3 Importador de hierro ZIP14.....	130

Índice de contenidos

2.2.4 Proteína regulatoria hepcidina.....	131
2.3 CONCLUSIONES.....	132
3. RIÑÓN.....	135
3.1 CONTENIDO DE HIERRO.....	135
3.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	136
3.2.1 Importador de hierro DMT1.....	136
3.2.2 Importador de hierro ZIP14.....	138
3.2.3 Proteína regulatoria hepcidina.....	138
3.3 CONCLUSIONES.....	141
4. CONCLUSION GENERAL.....	144

CAPÍTULO 3: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Corazón, Pulmón, Páncreas.

Movilización de hierro.

RESULTADOS

1.INTRODUCCIÓN.....	146
2. CORAZÓN.....	147
2.1OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA CARDÍACA.....	147
2.2EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO CARDÍACO.....	148
2.2.1Cuantificación de hierro tisular.....	148
2.2.2 Semicuantificación de hemosiderina.....	149
2.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	150
2.3.1 Expresión del Transportador de Metales Divalentes 1.....	150
2.3.2 Expresión del transportador ZIP14.....	151
2.2.3 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina.....	152
2.2.4 Expresión de prohepcidina.....	153
2.2.5 control negativo de inmunomarcación.....	154
3. PULMÓN.....	155
3.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA PULMONAR.....	155

Índice de contenidos

3.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO PULMONAR.....	156
3.2.1 Cuantificación de hierro tisular.....	156
3.2.2 Semicuantificación de hemosiderina.....	157
3.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	158
3.3.1 Expresión del transportador DMT1.....	158
3.3.2 Expresión del transportador ZIP14.....	159
3.3.3 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina.....	160
3.3.4 Expresión del propéptido de hepcidina.....	161
3.3.5 Control negativo de inmunomarcación.....	162
4. PÁNCREAS.....	163
4.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA PANCREÁTICA.....	163
4.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO PANCREÁTICO.....	164
4.2.1 Cuantificación de hierro tisular.....	164
4.2.2 Semicuantificación de hemosiderina.....	165
4.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	166
4.3.1 Expresión del transportador de metales divalentes 1.....	166
4.3.2 Expresión del transportador ZIP14.....	167
4.3.3 Expresión del Receptor de Transferrina 1.....	168
4.3.4 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina.....	168
4.3.5 Expresión del propéptido de hepcidina.....	169
4.3.6 Control negativo de inmunomarcación.....	170

DISCUSIÓN

1. CORAZÓN.....	171
1.1 CONTENIDO DE HIERRO.....	171
1.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	171
1.2.1 Importador de hierro DMT1.....	171
1.2.2 Importador de hierro ZIP14.....	172

Índice de contenidos

1.2.3 Proteína regulatoria hepcidina.....	173
1.2.4 CONCLUSIONES.....	173
2. PULMÓN.....	176
2.1 CONTENIDO DE HIERRO.....	176
2.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	177
2.2.1 Importador de hierro DMT1.....	177
2.2.2 Proteína de depósito L-ferritina.....	177
2.2.3 Importador de hierro ZIP14.....	178
2.2.4 Proteína regulatoria hepcidina.....	178
2.2.5 CONCLUSIONES.....	179
3. PÁNCREAS.....	182
3.1 CONTENIDO DE HIERRO.....	182
3.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	183
3.2.1 Importador de hierro DMT1.....	183
3.2.2 Importador de hierro ZIP14.....	183
3.2.3 Importador de hierro RTf1.....	184
3.2.4 Proteína regulatoria hepcidina.....	184
3.2.5 CONCLUSIONES.....	185
4. CONCLUSIÓN GENERAL.....	188

CAPÍTULO 4: Estudios en Sistema Nervioso

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

Modelo Celular. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Modelo Animal. Regiones cerebrales.

RESULTADOS

MODELO CELULAR

1. INTRODUCCIÓN.....	191
2.EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y.....	192

Índice de contenidos

2.1 EFECTO DEL CITRATO AMÓNICO FÉRRICO.....	192
2.2 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	193
3. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO CELULAR.....	194
4. REVERSIÓN DEL EFECTO DE ROS CON N-ACETIL CISTEÍNA (NAC) EN SH-SY5Y.....	196
4.1 REVERSIÓN DEL EFECTO DE FAC.....	196
4.2 REVERSIÓN DEL EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	197
5. EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR EPO.....	197
5.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL PRETRATAMIENTO CELULAR CON ERITROPOYETINA HUMANA.....	197
5.2 EFECTO DE LA ALBÚMINA SOBRE EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO.....	198
6. EVALUACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DEL HIERRO CELULAR. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO NEURONAL.....	199
6.1. EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1.....	199
6.1.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC.....	199
6.1.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	200
6.2. EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR ZIP14.....	201
6.2.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC.....	201
6.2.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	202
6.3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA 1 (Rtf1).....	203
6.3.1 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	203
6.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE DEPÓSITO FERRITINA.....	204
6.4.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC.....	204
6.4.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	205
6.5 EXPRESIÓN DEL PROPÉPTIDO DE LA PROTEÍNA REGULATIVA HEPICIDINA.....	208
6.5.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC.....	208
6.5.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	210
6.6 EVALUACIÓN DEL MECANISMO REGULATIVO DE LA SÍNTESIS DE HEPICIDINA NEURONAL.....	211
6.7 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA IMPORTADORA DEL GRUPO HEMO, HCP1.....	213

Índice de contenidos

6.7.1. CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	213
6.8 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EXPORTADORA DEL GRUPO HEMO, FLVCR.....	214
6.8.1. CÉLULAS INCUBADAS CON EPO.....	214
6.9 CONTROL NEGATIVO DE INMUNOMARCACIÓN CELULAR.....	216
MODELO ANIMAL	
7. INTRODUCCIÓN.....	216
8. IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES.....	217
9. EVALUACIÓN DEL HIERRO CEREBRAL.....	218
9.1 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TISULAR EN LAS REGIONES CEREBRALES.....	218
9.2 ANÁLISIS CUALITATIVO DEL HIERRO TISULAR. OBSERVACIÓN DE HEMOSIDERINA.....	219
10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CLAVE DEL CICLO DEL HIERRO.....	220
10.1 EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES DMT1.....	220
10.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL TRANSPORTADOR ZIP14.....	222
10.3 CONTROLES NEGATIVOS DE INMUNOMARCACIÓN.....	224
DISCUSIÓN	
1. MODELO CELULAR.....	225
1.1 VIABILIDAD CELULAR.....	225
1.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO.....	226
1.2.1 Importador de hierro ZIP14.....	226
1.2.2 Importador de hierro RTf1.....	227
1.2.3 Importador de hierro DMT1.....	228
1.2.4 Proteína de depósito de hierro L-ferritina.....	228
1.2.5 Proteína reguladora hepcidina.....	229
1.2.6 Mecanismo regulatorio de síntesis de hepcidina.....	230
1.2.7 Transportadores del grupo hemo.....	231
1.3 PRETRATAMIENTOS CELULARES.....	231
1.4. CONCLUSIONES.....	231

Índice de contenidos

2. MODELO ANIMAL	233
2.1 CONTENIDO DE HIERRO CEREBRAL.....	233
2.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO	235
2.2.1 Importadores de hierro DMT1 y ZIP14.....	235
2.3 CONCLUSIONES.....	236
CONCLUSIONES FINALES	238
REFERENCIAS.....	240
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	255

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN

Figura 1. <i>Movilización duodenal de hierro</i>	3
Figura 2. <i>Movilización de hierro hepático</i>	7
Figura 3. <i>Captación de hierro celular mediante el Receptor de Transferrina 1 (RTf1)</i>	9
Figura 4. <i>Movilización de hierro en macrófagos del sistema retículo endotelial</i>	12
Figura 5. <i>Síntesis de la proteína Hefcidina</i>	14
Figura 6. <i>Acción de Hefcidina sobre el exportador de hierro Ferroportina</i>	16
Figura 7. <i>Movilización de hierro mediada por Hefcidina</i>	17
Figura 8. <i>Efecto de los diferentes niveles de Hefcidina sobre los enterocitos y macrófagos</i>	17
Figura 9. <i>Mecanismo de acción de Hefcidina</i>	19
Figura 10. <i>Internalización de Ferroportina dependiente de Jak2</i>	19
Figura 11. <i>Vía de señalización para la síntesis de Hefcidina</i>	23
Figura 12. <i>Regulación de la síntesis de Hefcidina por inflamación</i>	25
Figura 13A. <i>Regulación de Hefcidina por eritropoyesis e hipoxia</i>	27
Figura 13B. <i>Acción de EPO y ERFE en estados de eritropoyesis activa</i>	28
Figura 13C. <i>Acción de ERFE sobre BMP y síntesis de hepcidina</i>	28
Figura 14. <i>Regulación transcripcional de Hefcidina por anemia e hipoxia</i>	30
Figura 15. <i>Regulación de la expresión de Hefcidina según la disponibilidad sistémica de hierro y el estado inflamatorio e infeccioso</i>	30
Figura 16. <i>Regulación de IRP1</i>	32
Figura 17. <i>Regulación postranscripcional de las proteínas del ciclo del hierro por el sistema IRE-IRP</i>	34
Figura 18. <i>Regulación postranscripcional de las proteínas del ciclo del hierro por el sistema IRE-IRP</i>	34
Figura 19. <i>Estructura de la Eritropoyetina</i>	35
Figura 20. <i>Regulación de la eritropoyesis mediada por EPO</i>	37
Figura 21. <i>Funciones no eritropoyéticas de la eritropoyetina</i>	37

Índice de figuras

Figura 22. <i>Receptores de EPO</i>	38
Figura 23. <i>Vías de señalización de la Eritropoyetina</i>	39
Figura 24. <i>Síntesis de la Eritropoyetina</i>	41

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1. <i>Vía de administración de sustancias intraperitoneal</i>	47
Figura 2. <i>Método de extracción sanguínea del plexo submandibular</i>	48
Figura 3. <i>Cerebro de ratón cepa CF1</i>	51
Figura 4. <i>Células SH-SY5Y en cultivo celular, crecimiento adherente</i>	61
Figura 5. <i>Células viables captando el colorante supravital rojo neutral</i>	65

CAPÍTULO 1: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

El bazo murino: órgano eritropoyético extramedular.

RESULTADOS

Figura 1. <i>Inmunomarcación de DMT1 en bazo</i>	73
Figura 2. <i>Inmunomarcación de DMT1 en bazo</i>	74
Figura 3. <i>Inmunomarcación de ZIP14 en bazo</i>	75
Figura 4. <i>Inmunomarcación de ZIP14 en bazo</i>	76
Figura 5. <i>Inmunomarcación de L-ferritina en bazo</i>	77
Figura 6. <i>Inmunomarcación de L-ferritina en bazo</i>	78
Figura 7. <i>Inmunomarcación de prohepcidina en bazo</i>	79
Figura 8. <i>Control negativo esplénico</i>	79
Figura 9. <i>Determinación de hemoglobina en el Modelo Animal de Sobrecarga de hierro + EPO</i>	80
Figura 10. <i>Determinación de hematocrito en el Modelo Animal de Sobrecarga de hierro + EPO</i>	80

Índice de figuras

Figura 11. <i>Observación de la serie eritrocitaria</i>	82
Figura 12. <i>Recuento de reticulocitos. Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	82
Figura 13. <i>Observación de reticulocitos</i>	83
Figura 14. <i>Cuantificación de hierro circulante. Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	84
Figura 15. <i>Observación macroscópica del bazo murino</i>	84
Figura 16. <i>Histología esplénica</i>	85
Figura 17. <i>Cuantificación de hierro esplénico. Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	86
Figura 18. <i>Semicuantificación de depósitos de hierro esplénico como hemosiderina. Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	87
Figura 19. <i>Observación de hemosiderina esplénica</i>	87

CAPÍTULO 2: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Duodeno, Hígado, Riñón Absorción y movilización de hierro

RESULTADOS

Figura 1. <i>Histología duodenal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	97
Figura 2. <i>Hemosiderina duodenal</i>	98
Figura 3. <i>Inmunomarcación de DMT1 duodenal</i>	99
Figura 4. <i>Inmunomarcación de ZIP14 duodenal</i>	100
Figura 5. <i>Control negativo duodenal</i>	101
Figura 6. <i>Histología hepática en el Modelo Animal de Sobrecarga de hierro + EPO</i>	103
Figura 7. <i>Cuantificación de hierro hepático</i>	104
Figura 8. <i>Semicuantificación de depósitos de hierro hepático como hemosiderina</i>	104
Figura 9. <i>Observación de hemosiderina hepática</i>	105
Figura 10. <i>Inmunomarcación de DMT1 hepático</i>	106
Figura 11. <i>Inmunomarcación de ZIP14 hepático</i>	107

Índice de figuras

Figura 12. Inmunomarcación de L-ferritina en hígado.....	108
Figura 13. Inmunomarcación de prohepcidina hepática.....	109
Figura 14. Control negativo hepático.....	109
Figura 15. Histología de la corteza renal.....	112
Figura 16. Histología de la médula renal.....	113
Figura 17. Cuantificación de hierro renal	119
Figura 18. Semicuantificación de depósitos de hierro renal como hemosiderina.....	114
Figura 19. Observación de hemosiderina en corteza renal.....	115
Figura 20. Observación de hemosiderina en médula renal.....	116
Figura 21. Inmunomarcación de DMT1 en corteza renal.....	117
Figura 22. Inmunomarcación de DMT1 en corteza renal.....	118
Figura 23. Inmunomarcación de DMT1 en médula renal.....	119
Figura 24. Inmunomarcación de ZIP14 en corteza renal.....	120
Figura 25. Inmunomarcación de ZIP14 en corteza renal.....	121
Figura 26. Inmunomarcación de ZIP14 en médula renal.....	122
Figura 27. Inmunomarcación de prohepcidina en corteza renal.....	123
Figura 28. Control negativo renal.....	123

CAPÍTULO 3: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Corazón, Pulmón, Páncreas.

Movilización de hierro.

RESULTADOS

Figura 1. Histología cardíaca en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	148
Figura 2. Cuantificación de hierro cardíaco en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	149

Índice de figuras

Figura 3. Semicuantificación de depósitos de hierro cardíaco como hemosiderina en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	149
Figura 4. Observación de hemosiderina cardíaca.....	150
Figura 5. Inmunomarcación de DMT1 en corazón.....	151
Figura 6. Inmunomarcación de ZIP14 en corazón.....	152
Figura 7. Inmunomarcación de L-ferritina en corazón.....	153
Figura 8. Inmunomarcación de prohepcidina en corazón.....	154
Figura 9. Control negativo cardíaco.....	154
Figura 10. Histología pulmonar en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	156
Figura 11. Cuantificación de hierro pulmonar en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	157
Figura 12. Observación de hemosiderina pulmonar.....	158
Figura 13. Inmunomarcación de DMT1 en pulmón.....	159
Figura 14. Inmunomarcación de ZIP14 en pulmón.....	160
Figura 15. Inmunomarcación de L-ferritina en pulmón.....	161
Figura 16. Inmunomarcación de prohepcidina en pulmón.....	162
Figura 17. Control negativo pulmonar.....	162
Figura 18. Histología pancreática en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	164
Figura 19. Cuantificación de hierro pancreático en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.....	165
Figura 20. Observación de hemosiderina pancreática.....	165
Figura 21. Inmunomarcación de DMT1 en páncreas.....	166
Figura 22. Inmunomarcación de ZIP14 en páncreas.....	167
Figura 23. Inmunomarcación del Receptor de Transferrina 1 en páncreas.....	168
Figura 24. Inmunomarcación de L-ferritina en páncreas.....	169
Figura 16. Inmunomarcación de prohepcidina en páncreas.....	170
Figura 17. Control negativo pulmonar.....	170

CAPÍTULO 4: Estudios en Sistema Nervioso **Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.** **Modelo Celular. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** **Modelo Animal. Regiones cerebrales.**

RESULTADOS

Figura 1. Viabilidad celular 24 h de incubación con diferentes dosis de FAC.....	192
Figura 2. Viabilidad celular 72 h de incubación con diferentes dosis de FAC.....	193
Figura 3. Viabilidad celular a diferentes tiempos de incubación con dosis de FAC 30 μ M.....	193
Figura 4. Viabilidad celular utilizando H ₂ O ₂ (100-400 mM) por 6 h.....	194
Figura 5. Cuantificación de hierro (μ g/dL) en el medio de cultivo para tratamiento con FAC 600 μ M 24 y 48 h.....	195
Figura 6. Cuantificación de hierro (μ g/dL) en el medio de cultivo para tratamiento con FAC 30 μ M 72 h.....	195
Figura 7. Viabilidad celular utilizando NAC 2 y 4 mM 12 h previas a la incubación con FAC 30 μ M/ 72 h.....	196
Figura 8. Viabilidad celular utilizando NAC 2 y 4 mM 12 h previas al tratamiento celular con H ₂ O ₂ 400 mM/6 h.....	197
Figura 9. Viabilidad celular utilizando EPO 10, 25, 50, 75 Y 100 UI/mL como pretratamiento 12 h previas al tratamiento celular con FAC 30 μ M/72 h.....	198
Figura 10. Viabilidad celular utilizando albúmina 125 μ g/mL 12 h previas al tratamiento celular con FAC 30 μ M/72 h.....	199
Figura 11. Inmunomarcación de DMT1 en células de neuroblastoma humano.....	200
Figura 12. Inmunomarcación de DMT1 en células de neuroblastoma humano.....	201
Figura 13. Inmunomarcación de ZIP14 en células de neuroblastoma humano.....	202
Figura 14. Inmunomarcación de ZIP14 en células de neuroblastoma humano.....	203
Figura 15. Inmunomarcación del Receptor de Transferrina 1 en células de neuroblastoma humano.....	204
Figura 16. Inmunomarcación de L-ferritina en células de neuroblastoma humano.....	205
Figura 17. Inmunomarcación de L-Ferritina en células de neuroblastoma humano.....	206

Índice de figuras

Figura 18. <i>Inmunofluorescencia para H-ferritina en células de neuroblastoma humano</i>	207
Figura 19. <i>Inmunomarcación de prohepcidina en células de neuroblastoma humano</i>	209
Figura 20. <i>Inmunomarcación de prohepcidina en células de neuroblastoma humano</i>	210
Figura 21 a. <i>Inmunofluorescencia para RTf2 y HFE en células de neuroblastoma humano</i>	212
Figura 21 b. <i>Análisis de colocalización de RTF2 y HFE en células de neuroblastoma humano utilizando Image J</i>	213
Figura 22. <i>Inmunomarcación de HCP1 en células de neuroblastoma humano</i>	214
Figura 23. <i>Inmunomarcación de FLVCR en células de neuroblastoma humano</i>	215
Figura 24. <i>Control negativo celular</i>	216
Figura 25. <i>Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de neocorteza, tálamo, hipotálamo e hipocampo</i>	217
Figura 26. <i>Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de corteza, hipocampo</i>	217
Figura 27. <i>Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de cerebelo</i>	217
Figura 28. <i>Cuantificación de hierro en estriado en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	218
Figura 29. <i>Cuantificación de hierro en cerebelo en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO</i>	218
Figura 30. <i>Hemosiderina en estriado</i>	219
Figura 31. <i>Hemosiderina en hipocampo</i>	219
Figura 32. <i>Hemosiderina en cerebelo</i>	220
Figura 33. <i>Hemosiderina en médula espinal</i>	220
Figura 34. <i>Expresión de DMT1 en estriado</i>	221
Figura 35. <i>Expresión de DMT1 en hipocampo</i>	221
Figura 36. <i>Expresión de DMT1 en cerebelo</i>	222
Figura 37. <i>Expresión de ZIP14 en estriado</i>	222
Figura 38. <i>Expresión de ZIP14 en hipocampo</i>	223
Figura 39. <i>Expresión de ZIP14 en cerebelo</i>	223
Figura 40. <i>Expresión de ZIP14 en médula espinal</i>	223

Índice de figuras

Figura 41. <i>Control negativo estriado</i>	224
Figura 42. <i>Control negativo hipocampo</i>	224
Figura 43. <i>Control negativo cerebelo</i>	224
Figura 44. <i>Control negativo médula espinal</i>	224

Índice de esquemas y tablas

INTRODUCCIÓN

Esquema 1. <i>Esquema representativo del ciclo del hierro</i>	2
Esquema 2. <i>Toxicidad del hierro mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. Reacción de Fenton</i>	11

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema 1. <i>Tratamientos con hierro sacarato y eritropoyetina en el modelo animal</i>	46
Esquema 2. <i>Corte de secciones de cerebro</i>	52
Esquema 3. <i>Áreas cerebrales obtenidos del atlas de histología para ratones</i>	53
Esquema 4. <i>Estructuras tubulares renales</i>	54
Esquema 5. <i>Tratamientos y pretratamientos en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y</i> ...63	
Tabla 1. <i>Tiempos de bloqueo de peroxidasa endógena, dilución de anticuerpo primario empleado en inmunohistoquímica y tiempo de revelado de acuerdo a cada tejido en estudio</i>	60
Tabla 2. <i>Anticuerpo primario y Dilución de anticuerpo secundario empleados en inmunohistoquímica</i>	60
Tabla 3. <i>Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunocitoquímica, diluciones utilizadas y tiempos de revelado</i>	67
Tabla 4. <i>Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia, y diluciones utilizadas</i>	68

CAPÍTULO 1: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

El bazo murino: órgano eritropoyético extramedular.

RESULTADOS

Esquema 1. <i>Tratamientos con hierro sacarato y eritropoyetina en el modelo animal</i>	72
---	----

Índice de esquemas y tablas

Tabla 1. *Fórmula leucocitaria relativa en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....81

DISCUSIÓN

Esquema 1. *Manejo del hierro esplénico por los macrófagos de la pulpa roja en estados de Sobrecarga de Hierro (A), EPO (B) y Sobrecarga de Hierro + EPO (C)*.....92

CAPÍTULO 2: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Duodeno, Hígado, Riñón Absorción y movilización de hierro

RESULTADOS

Esquema 1. *Histología duodenal*.....97

Esquema 2. *Histología hepática*.....102

Esquema 3. *Estructura funcional renal*.....111

DISCUSIÓN

Esquema 1. *Regulación del metabolismo del hierro en duodeno. Captación y depósitos en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....127

Esquema 2. *Regulación del metabolismo del hierro en hígado. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....134

Esquema 3. *Regulación del metabolismo del hierro en riñón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....142

CAPÍTULO 3: Modelo Animal.

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis. Corazón, Pulmón, Páncreas. Movilización de hierro.

RESULTADOS

Esquema 1. *Células musculares cardíacas*.....147

Esquema 2. *Estructura pulmonar*.....155

Esquema 3. *Estructura pancreática*.....163

DISCUSIÓN

Esquema 1. *Regulación del metabolismo del hierro en corazón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....174

Índice de esquemas y tablas

Esquema 2. *Regulación del metabolismo del hierro en pulmón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....180

Esquema 3. *Regulación del metabolismo del hierro en páncreas. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO*.....185

CAPÍTULO 4: Estudios en Sistema Nervioso

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

Modelo Celular. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Modelo Animal. Regiones cerebrales.

DISCUSIÓN

Esquema 1. *Proteínas del ciclo del hierro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en exceso de hierro*.....232

Esquema 2. *Comparación anatómica del cerebro humano y murino*234

Tabla de abreviaturas

DMT1	Transportador de metales divalentes 1
ZIP14	<i>ZRT Irt-like protein 14</i>
RTf1	Receptor de Transferrina 1
RTf2	Receptor de Transferrina 2
HFE	Proteína de la hemocromatosis
IL-6	Interleuquina 6
FPN	Ferroportina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
EPO	Eritropoyetina
NAC	N acetil cisteína
FAC	Citrato amónico férrico
HCP1	<i>Heme carrier protein 1</i>
FLVCR	<i>feline leukemia virus subgroup C receptor</i>
DcytB	Ferrireductasa citocromo B duodenal
IRE	Elemento de respuesta al hierro
IRP	Proteína de respuesta al hierro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ERFE	Eritropoferrona
ANOVA	Análisis de varianza
DAB	Diamino bencidina
Cp	Ceruloplasmina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HJV	Hemojuvelina
HCT	Hematocrito
Hb	Hemoglobina
HRP	Peroxidasa de rábano
NTBI	Hierro no unido a transferrina
TBI	Hierro unido a transferrina
SD	Desvío estándar
PBS	Buffer sodio-potasio
BSA	Albúmina sérica bovina
rHuEPO	Eritropoyetina recombinante humana
EPOR	Receptor de EPO

Introducción

1.CICLO DEL HIERRO

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los seres vivos, desde los mamíferos hasta los organismos unicelulares. Este metal se encuentra formando parte de moléculas como la hemoglobina y la mioglobina. Es un elemento traza de naturaleza divalente y por lo tanto actúa como un componente redox de proteínas en procesos biológicos que requieren la transferencia de electrones (Mackenzie et al. 2008).

El hierro se encuentra íntimamente relacionado a la producción de energía celular, a la síntesis de ADN y el transporte de oxígeno, es por ello que es necesario un correcto equilibrio en su metabolismo dado que deficiencias o excesos resultan deletéreos para las células.

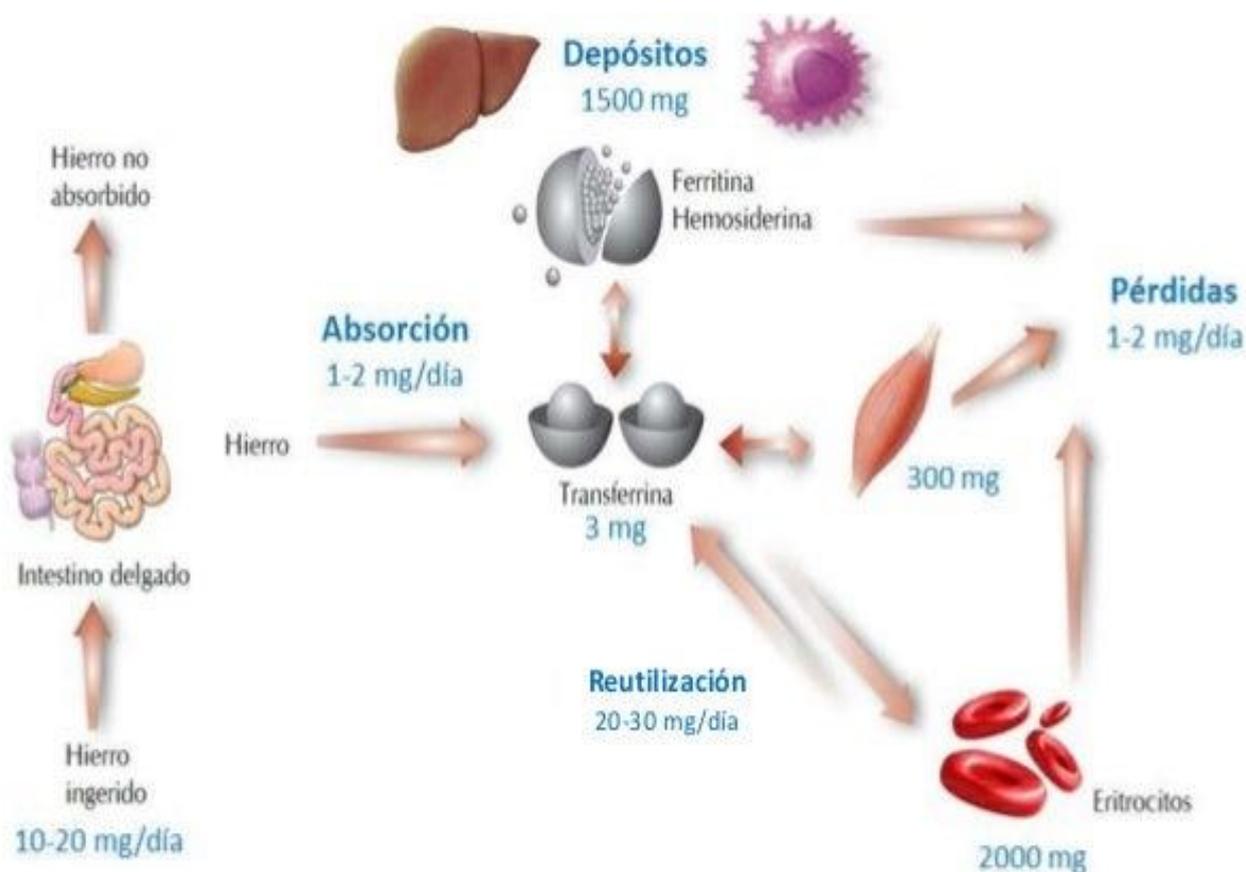
El hierro total del organismo es de 3-4 g y se distribuye principalmente en el compartimento funcional y el de reserva. El compartimento funcional posee entre el 70% y el 95% del hierro total corporal formando parte de las hemo-proteínas (hemoglobina y mioglobina) y de enzimas hemínicas y no hemínicas. El compartimento de reserva representa del 5% al 30% del hierro total corporal y constituye los depósitos en hígado, bazo y médula ósea. Únicamente el 1% del hierro se encuentra unido a la transferrina, proteína de transporte que compone el *pool* dinámico más importante (Muñoz et al. 2009).

Se requieren alrededor de 25 mg de hierro diarios para la eritropoyesis y otras funciones vitales, pero solo 1 o 2 mg del mismo provienen de la absorción intestinal de la dieta (Mackenzie et al. 2008). Este hierro deriva principalmente del reciclaje en el grupo hemo de los eritrocitos senescentes fagocitados por los macrófagos del sistema retículo endotelial, SRE (Li y Ginzburg 2010).

En cuanto al proceso de excreción del hierro se ha descrito que los mamíferos no poseen mecanismos regulatorios que lo controlen, por lo que muy bajas cantidades de hierro se pierden diariamente por descamación de las células epiteliales intestinales y de la piel, pequeños sangrados, menstruación, etc.

El intercambio diario de hierro entre el cuerpo y el medio externo es pequeño, comparado con la gran movilización de hierro entre los órganos internos que satisface la demanda diaria necesaria para la eritropoyesis (Esquema 1).

Introducción



Esquema 1. Esquema representativo del ciclo del hierro. Muñoz et al. 2008

La eritropoyesis regula el metabolismo del hierro y es por eso que ambos se encuentran estrechamente interrelacionados para prevenir la deficiencia de hierro y la toxicidad generada en estados de sobrecarga del mismo (Li y Ginzburg 2010). Estados de deficiencia de hierro resultan de un imbalance entre los requerimientos aumentados asociados al crecimiento o a la pérdida sanguínea y la captación del hierro de la dieta.

Las complicaciones más frecuentes que se asocian a la sobrecarga de hierro incluyen fibrosis hepática, cirrosis, cardiomiopatías, diabetes, artritis e hiperpigmentación entre otras. La sobrecarga de hierro es a menudo causada por terapias de transfusión sanguínea o por mutaciones genéticas que resultan en una aumentada absorción de hierro a nivel intestinal (Wrighting y Andrews 2008).

Para evitar desequilibrios en los niveles de hierro existen proteínas clave encargadas de regular su transporte, depósitos y reutilización.

La homeostasis del hierro sistémico involucra un control meticuloso de la absorción de hierro a nivel intestinal, la efectiva utilización en la eritropoyesis, el eficiente reciclaje de hierro de los

eritrocitos senescentes y el control de los depósitos del mismo principalmente en hígado y en los macrófagos (Andrews 2008).

1.2 ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO

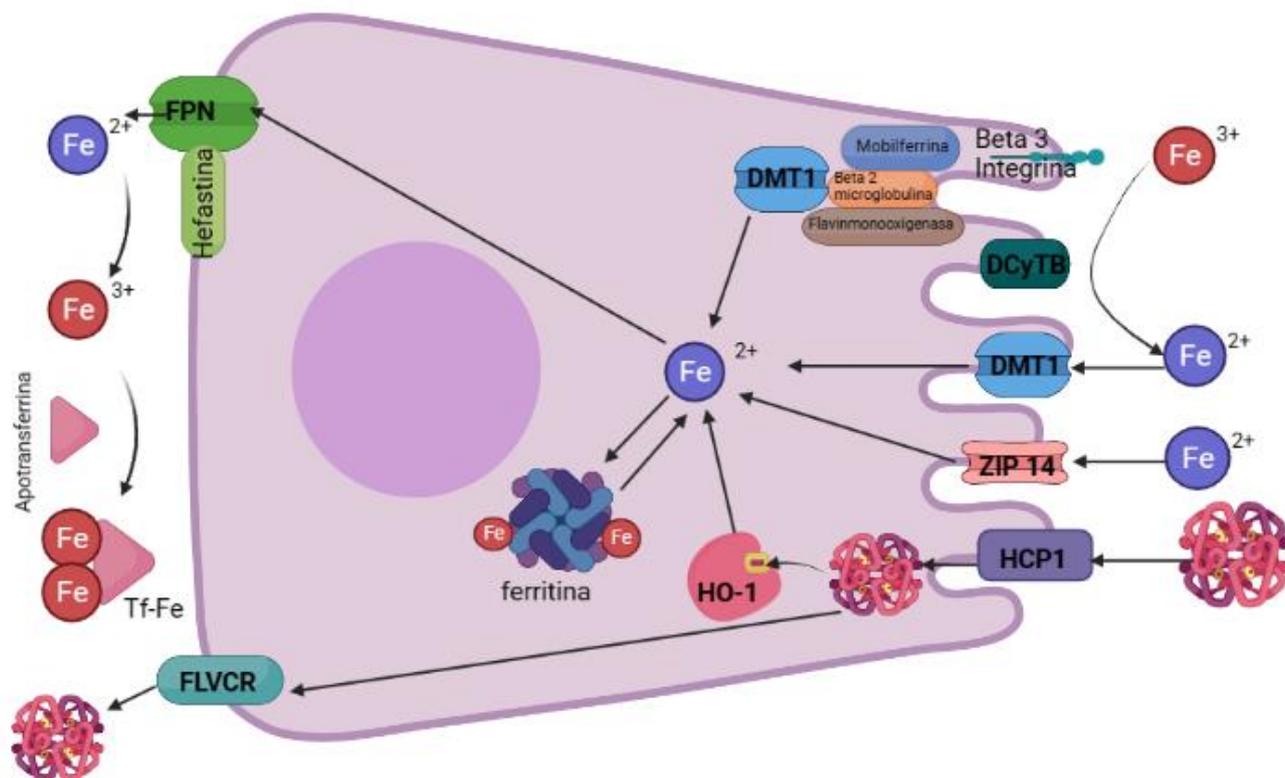


Figura 1. Movilización duodenal de hierro. Creado en BioRender.com

El reciclaje de hierro por parte de los macrófagos únicamente es incapaz de sostener las demandas de hierro para la eritropoyesis por períodos prolongados. Las pequeñas pérdidas de hierro por descamación, o exfoliación celular generarían un balance negativo del biometal si no existiera una captación del mismo.

El balance normal del hierro es principalmente controlado a nivel de la absorción intestinal del mismo (Figura 1). Esta absorción es llevada a cabo en la porción proximal del duodeno en donde las células polarizadas poseen vellosidades que protruyen hacia la luz intestinal para maximizar el área absorbente (Andrews 2008).

Introducción

El hierro dietario puede encontrarse en dos formas, hierro hemo y hierro no hemo. El hierro hemo se encuentra presente en carnes y es rápidamente absorbido mientras que el no hemo es proveniente de vegetales y granos (Mackenzie et al. 2008). El hierro hemo es de naturaleza hidrofóbica y si bien en un principio se creía que difundía por la membrana celular se ha descrito la presencia de un transportador a nivel intestinal denominado proteína transportadora de hemo 1 (HCP1 *Heme carrier protein 1*) que se expresa abundantemente en el borde en cepillo de los enterocitos duodenales (Shayegui et al. 2005). Estos autores demostraron que HCP1 es capaz de importar hierro hemo dependiendo de la temperatura y los niveles de hierro pudiendo saturarse.

Una vez que ingresa el hierro hemo en el enterocito es liberado de la protoporfirina mediante la enzima hemo oxigenasa y luego ingresa en la vía común del hierro no hemo (Andrews 2008).

También se ha descrito la presencia de un exportador del grupo hemo, FLVCR (receptor del virus de la leucemia felina subgrupo C), que parecería ser imprescindible para la eritropoyesis y podría ser una vía de salida del grupo hemo del enterocito (Quigley et al. 2004). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo implicado en la exportación del grupo hemo a través de FLVCR, se ha descrito que su exportación requiere de una proteína extracelular que se una al hemo, como la albúmina o la hemopexina (Khan & Quigley, 2011).

La mayoría del hierro dietario en forma no hemo se encuentra en estado férrico. Para su captación es necesario que se reduzca a estado ferroso mediante la acción de una enzima reductasa denominada DCyTB que utiliza ácido ascórbico como cofactor (McKie et al. 2001). El gen CYBRD1 que codifica para DCyTB carece de región IREs, los niveles de proteína y su ARNm aumentan frente a bajas concentraciones de hierro (McKie et al. 2001). Sin embargo, al igual que SLC40A1 que codifica para el exportador de hierro ferroportina y el gen SLC11A2 que codifica para DMT1 contiene elementos de respuesta a la hipoxia (HIF) (Shah et al. 2009).

El hierro en estado ferroso se absorbe a través del transportador de metales divalentes DMT1 localizado en la membrana apical en enterocitos y en la subapical en endosomas (Canonne-Hergaux et al. 1999). Gunshin et al. (1997) demostraron que DMT1 es un transportador electrogénico es decir que requiere protones para movilizar hierro provistos por el ácido gástrico. El transportador DMT1, conocido como Nramp2 (proteína 2 de resistencia natural asociada a macrófagos) es una glicoproteína de 12 fragmentos transmembrana con un alto grado de hidrofobicidad y características de un canal iónico. Existen 4 transcriptos de DMT1 como resultado del corte alternativo de su ARNm, DMT1A, DMT1B generados por el corte de exones en región 5' y DMT+IRE, DMT-IRE por corte de exones en 3' (Hubert y Henze 2002). Estas isoformas poseen características similares de transporte,

Introducción

la diferencia radica en las células en las cuales se expresan, su localización subcelular y la respuesta intracelular a los niveles de hierro (Shawki et al. 2012).

La expresión de DMT1 aumenta en estados de deficiencia de hierro lo que puede deberse a su regulación postranscripcional por la presencia de la isoforma 3' IRE expresada en intestino (Hubert et al. 2002) y su localización se modifica de apical a perinuclear en estados de sobrecarga del biometal (Giorgi y Roque 2014).

DMT1 también es responsable de la captación de hierro en otros tipos celulares además de los enterocitos como los hepatocitos, células pulmonares y pancreáticas relacionándose con la captación de hierro en estados basales y en situaciones patológicas (Giorgi, D'Anna y Roque 2015; Giorgi y Roque 2014; Aguirre et al. 2005). Este transportador no sólo es capaz de incorporar hierro ferroso al interior celular sino también cobre, zinc, cobalto, manganeso y plomo en estado divalente. Posee actividad bacteriostática pero no bactericida posiblemente porque contribuye a deplecionar los depósitos de hierro de los fagosomas en donde se replican los microorganismos (Andrews 2008).

Una vez dentro de los enterocitos el hierro tiene dos posibles caminos, puede ser almacenado en el interior en forma de ferritina, una proteína de depósito de hierro capaz de unir 4500 átomos de hierro en estado férrico formando un centro de hierro hidroxifosfato (Munro y Linder 1978). Cuando no se encuentra unida a hierro se denomina apoferritina y es un polímero compuesto por dos subunidades, la subunidad H o *heavy* de 21 kDa y la L o *light* de 19 kDa. En vertebrados se han detectado 2 cadenas de ferritina, la cadena ligera o L-ferritina que coensambla con la cadena catalítica activa H-ferritina (Arosio y Levi 2002). Se encuentra particularmente elevada en tejidos que almacenan hierro como el hígado y el bazo o en tejidos con sobrecarga de hierro en donde la producción de L-ferritina permite a la célula expandir su capacidad de depositar el biometal sin un exceso de sitios catalíticos (Arosio y Levi 2002).

Una vía posible del hierro es su exportación hacia el espacio extracelular mediante la ferroportina (FPN) localizada en la membrana basolateral del enterocito, único exportador de hierro descrito hasta la fecha. La ferroportina también conocida como IREG1, MTP1 o SLC39A1 (McKie et al. 2000, Donovan et al. 2000, Abboud y Haile 2000) contiene 571 aminoácidos y se encuentra altamente expresada en varios tejidos como placenta, hígado, bazo, riñón y duodeno (McKie et al. 2000).

La expresión de FPN en los macrófagos del sistema reticuloendotelial desempeña un rol fundamental en la reutilización de hierro en la eritropoyesis mediante la fagocitosis de eritrocitos

Introducción

senescentes (Knutson et al. 2003). Ferroportina codificada por un gen en el cromosoma 2q en los humanos está formada por 8 exones y con una región IRE en su 5' UTR (McKie et al. 2000).

La unión del hierro a la proteína de transporte transferrina requiere de la oxidación del hierro en estado ferroso por la ferroxidasa Hefastina, una multioxidasa transmembrana que colocaliza con ferroportina en la membrana basolateral de los enterocitos absortivos duodenales (Vulpe et al. 1999; Han y Kim 2007).

El hierro no unido a transferrina (NTBI) es transportado por un transportador de zinc, (ZIP14 Zrt-Irt-like protein 14 o SLC39A) expresado en órganos como duodeno, yeyuno, corazón e hígado (Liuzzi et al. 2006). La familia de proteínas transportadoras transmembrana ZIP está conformada por 14 miembros con alta homología que interviene en el transporte de otros minerales como manganeso, zinc y hierro (Nam y Knutson 2012). Se demostró en modelos animales de ratas que la expresión de estos transportadores ZIP es afectada por la concentración de hierro dietario (Nam y Knutson 2012).

También se ha demostrado que el hierro férrico puede ser captado por los enterocitos a través de la proteína β 3-integrina, para ser transferido a la proteína chaperona mobilferrina (Conrad et al. 1993). Dado que la mobilferrina ha sido aislada en asociación con β 3-integrina, flavin monooxigenasa y β 2-microglobulina, se postula que este complejo proteico de alto peso molecular llamado paraferitina transportaría el hierro a través de la membrana apical de los enterocitos (Figura 1). Además, se ha descrito que DMT1, importador de hierro ferroso hacia el citoplasma, forma parte de este complejo de proteínas (Umbreit et al. 2002).

1.3 CAPTACIÓN, TRANSPORTE Y DEPÓSITOS DE HIERRO

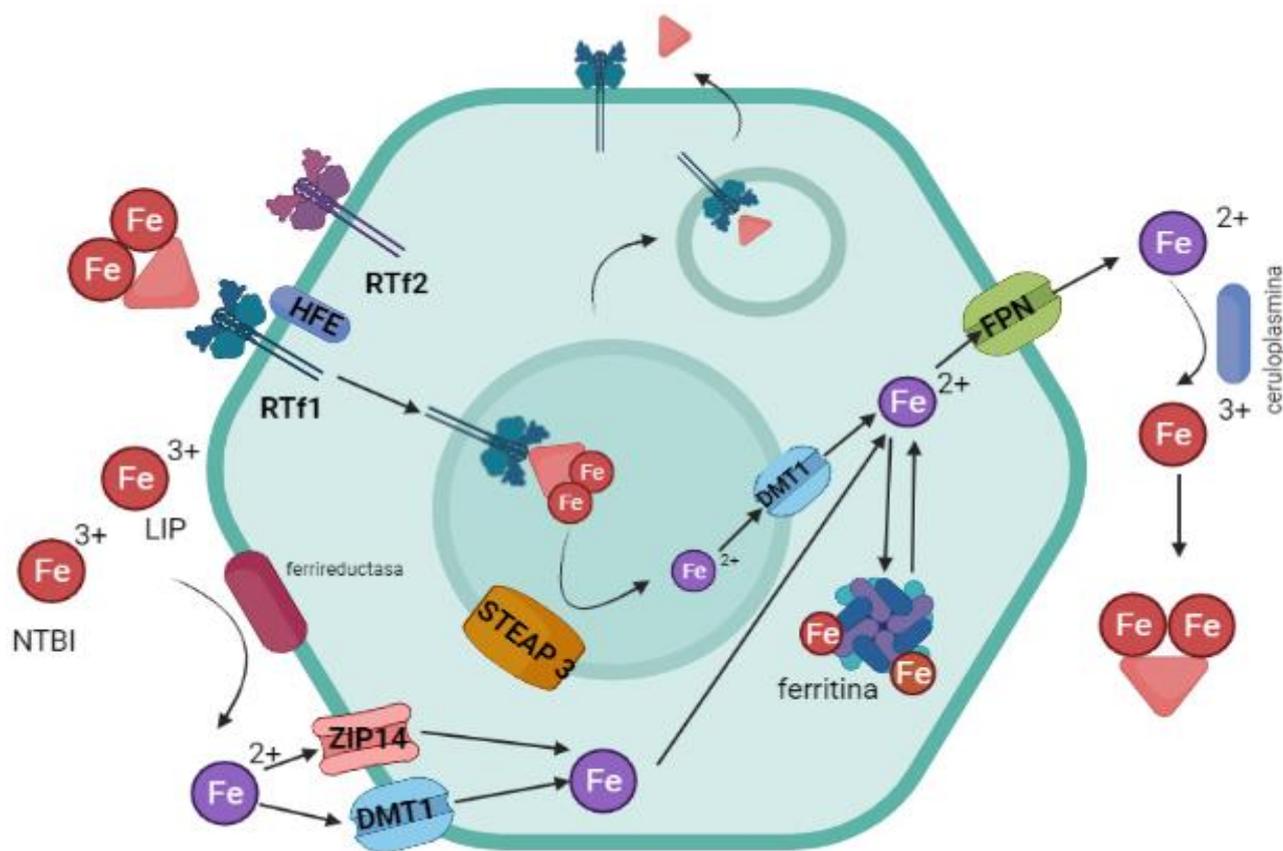


Figura 2. Movilización de hierro hepático. Creado en BioRender.com

Como describimos anteriormente luego de la absorción intestinal del hierro el hierro férrico es transportado en la circulación unido a la transferrina (Tf), proteína de transporte secretada activamente por los hepatocitos y otras células del organismo. La transferrina une hierro solubilizándolo en un ambiente acuoso para su correcto transporte hacia los tejidos (Andrews 2008).

La proteína Tf posee dos sitios de unión al hierro férrico y su interacción es dependiente del pH, teniendo elevada afinidad de unión a pHs cercanos a 7 (Ponka, 1999). El contenido total de hierro unido a la Tf (TBI, *transferrin bound iron*) es de aproximadamente 3 mg correspondiente principalmente al hierro reciclado a partir de los eritrocitos senescentes y, en menor medida, al absorbido de la dieta (Wang & Pantopoulos, 2011).

En estado de balance del biometal el 30% de la transferrina se encuentra saturada con hierro mientras que el 70% restante actúa como mecanismo protector para la captación de hierro en exceso, evitando la toxicidad del hierro libre. En estados de sobrecarga de hierro la capacidad de

Introducción

saturación de la Tf puede ser superada y en consecuencia el biometal puede unirse a ligandos como el citrato, generando el *pool* de hierro no unido a Tf (NTBI, *non transferrin bound iron*) (Pérez et al., 2005). Se ha descrito, que el hierro NTBI es rápidamente captado por hepatocitos, miocitos y células endócrinas causando daño tisular y falla orgánica (Ganz y Nemeth 2012).

El hierro unido a transferrina (Tf) puede ser internalizado por las células para ser depositado, principalmente en el hígado, o utilizado por los precursores eritroides u otras células para cumplir con funciones vitales en el organismo (Figura 2).

En la mayoría de las células el hierro ingresa por la unión de la holotransferrina al receptor de transferrina tipo 1 (RTf1, Transferrin receptor 1) (Piroux et al. 2013). Rtf1 es una glicoproteína de membrana homodimérica de 190 KDa, cuyos monómeros se encuentran ligados por dos puentes disulfuro. Cada molécula del RTf1 tiene la capacidad de unir dos moléculas de Tf (Ponka, 1999). La expresión de Rtf1 es controlada en varias condiciones celulares como el estado del hierro y los niveles de oxígeno.

El ARNm de RTf1 puede ser regulado de manera postranscripcional mediante las proteínas IRE-IRP (elementos de respuesta al hierro - proteínas de respuesta al hierro) como se desarrollará posteriormente en la sección de regulación postranscripcional de las proteínas del ciclo del hierro.

El receptor de Tf1 también es regulado a nivel transcripcional dado que su promotor contiene elementos de respuesta a hipoxia (HRE) que dimerizan con el factor inducible por hipoxia (HIF) (Wenger et al. 2005). Estudios celulares utilizando células de hepatoma K562 en condiciones de hipoxia han demostrado un aumento en los niveles de expresión del ARNm de RTf1 (Toth et al. 1999).

También se ha observado una regulación del Rtf1 mediada por la proteína de la hemocromatosis o HFE miembro de la familia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I. Se ha demostrado que HFE, Rtf1 y Tf formarían un complejo ternario donde HFE reduciría la afinidad de Rtf1 por Tf por la unión al mismo dominio helicoidal de RTf1-Tf compitiendo de esta forma por el sitio de unión (Waheed et al. 2002; Lebron et al. 1999).

El receptor de Transferrina 2 o RTf2, también participa en la captación celular de hierro. Posee un 45% de identidad con el RTf1 en su dominio extracelular (Kawabata et al. 1999). Al igual que RTf1, la interacción entre RTf2 y Tf es dependiente del pH. En este sentido, la holotransferrina se une a los receptores a pH neutro o levemente alcalino mientras que la apotransferrina lo hace a pH ácido (Pérez et al. 2005). Otra característica que diferencia a ambos receptores es la afinidad por la holotransferrina, siendo la de RTf2 aproximadamente 25 veces menor que la de RTf1 (Kawabata et al. 2000; Pérez et al. 2005). Por otro lado, a diferencia de RTf1, el receptor de transferrina 2 (RTf2)

Introducción

no es regulado de manera postranscripcional dado que no presenta segmentos IRE en su ARNm y no parece ser regulado por hierro en un modelo animal de hemocromatosis (Fleming et al. 2000).

Luego de su unión, el complejo Rtf1-Tf-Fe³⁺ es endocitado en vesículas cubiertas de clatrina. Cuando el pH del endosoma disminuye, debido a la actividad ATPasa, el hierro se libera y se reduce a ferroso por la acción de la reductasa STEAP3 y se transporta fuera del endosoma vía el transportador DMT1 (Figura 3) (Fleming et al. 1998).

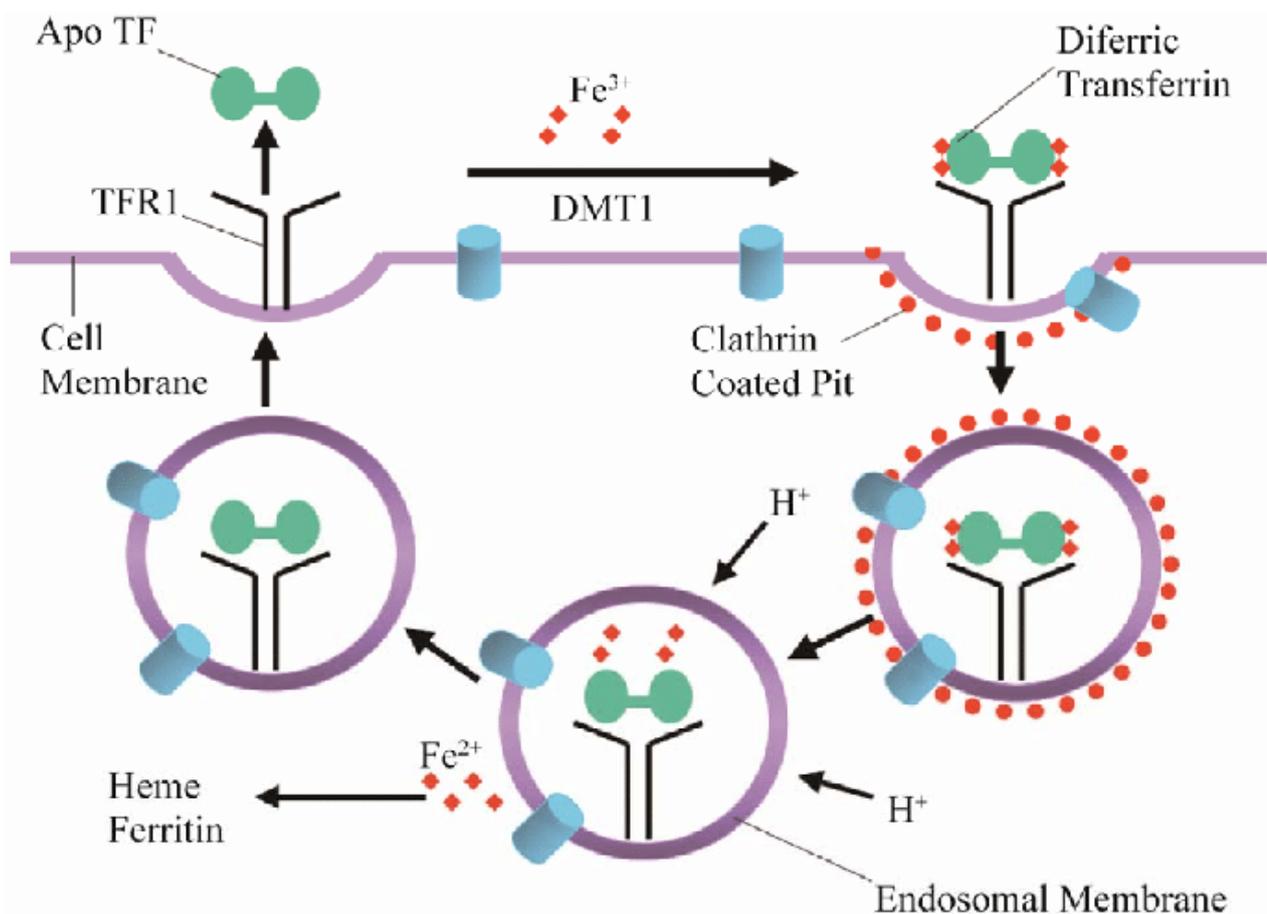


Figura 3. Captación de hierro celular mediante el Receptor de Transferrina 1 (RTf1).

El importador de hierro DMT1 se expresa en enterocitos y en células hepáticas (Giorgi y Roque 2014). Sin embargo, los hepatocitos de ratones deficientes de DMT1 y en pacientes humanos con pérdida de función del transportador se sobrecargan de hierro indicando que DMT1 no sería el único transportador involucrado en la captación de hierro hepática (Gunshin et al. 2005; Mims et al. 2004; Iolascon et al. 2006).

Introducción

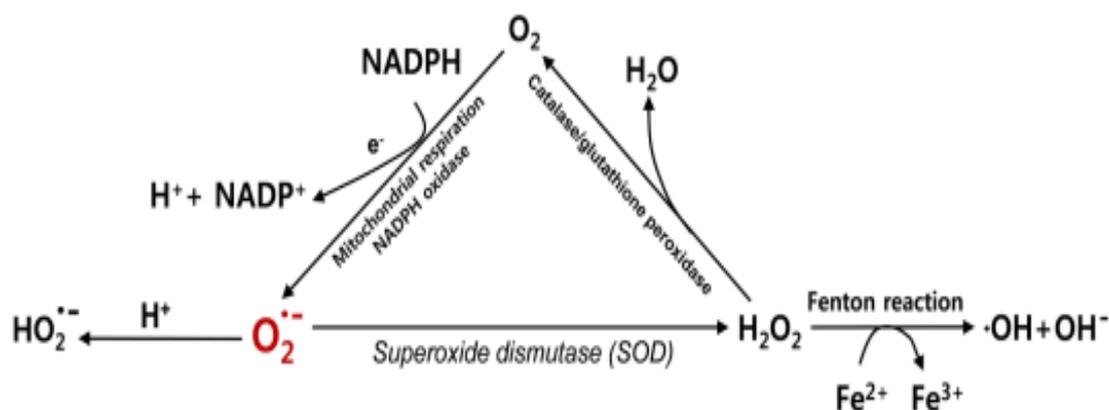
Nam et al. (2012) han demostrado que el transportador de hierro ZIP14 se expresa abundantemente en hígado, principal sitio de depósitos de hierro en el organismo.

Si bien en condiciones basales el hígado adquiere hierro por unión del RTf1-transferrina (Morgan y Baker 1986), en condiciones de exceso existe un elevado porcentaje de hierro NTBI (Craven et al. 1987). Se ha sugerido que ZIP14 sería el transportador clave en la captación hepática de NTBI en estados de sobrecarga de hierro (Jenkitkasemwong et al. 2015). Estudios de Liuzzi et al. (2006) demostraron en cultivos de células hepáticas que el hierro NTBI puede ser incorporado mediante ZIP14. Asimismo, estudios de Zhao et al. (2010) demostraron que ZIP14 puede estar involucrado también en la captación de hierro TBI vía RTf1-Tf transportando el Fe^{2+} desde el endosoma hacia el citoplasma celular de manera similar a DMT1.

En el citoplasma celular el hierro puede almacenarse en forma de ferritina o hemosiderina evitando así su toxicidad. La proteína de depósito Ferritina es un heteroplímero de 24 subunidades que puede almacenar hasta 4500 átomos de hierro. Está formada por dos cadenas, la H-ferritina (High) y L-ferritina (Light), la H posee actividad ferroxidasa importante para movilizar hierro en estado sólido en el centro de la proteína (Andrews 2008). La proteína Ferritina es el precursor de hemosiderina, un agregado heterogéneo de hierro con componentes lisosomales y otros productos de digestión intracelular (Wixom et al. 1980). La Ferritina también se encuentra circulando en suero siendo la forma sérica igual a la citoplasmática predominantemente en su forma L (Worwood et al. 1976).

La regulación de la síntesis de ferritina es mediada fundamentalmente por hierro mediante una regulación postranscripcional por proteínas regulatorias IRE-IRP como se explicará posteriormente (Casey et al. 1988).

La ferritina posee una acción antioxidante por la generación de depósitos de hierro que previene la toxicidad del hierro férrico en exceso y la generación de especies reactivas de oxígeno vía la reacción de Fenton (Esquema 2) (Mackenzie et al. 2008). En este sentido se ha observado un aumento en la síntesis de ferritina en hígado y en células eritroides en modelos animales de ratones tratados con agentes oxidantes (Giorgi y Roque 2014; Tsuji et al. 2000).



Esquema 2. Toxicidad del hierro mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. Reacción de Fenton.
Kim et al. 2015

Hemosiderina se colorea de azul en la tinción de Perls y está formada por hierro en estado férrico que le da su color amarillento (Iancu 2011). El hierro proveniente de las moléculas de ferritina degradadas constituye la mayor fuente de este biometal presente en la hemosiderina, al cual se asocian lípidos, grupo hemo y carbohidratos como componentes adicionales de este conglomerado heterogéneo, que se localiza principalmente en lisosomas secundarios (Iancu 2011).

En función de las necesidades del organismo el hierro se libera de las células mediante la proteína Ferroportina, único exportador de hierro hasta el presente. La proteína Ferroportina se asocia a una oxidasa en este caso ceruloplasmina que convierte el hierro ferroso en férrico para su posterior unión a transferrina (Figura 2).

La mayoría de la ceruloplasmina se expresa en hígado, aunque también se la ha encontrado en cerebro y en pulmón. Funciona como un antioxidante que convierte hierro ferroso en hierro férrico disminuyendo la potencial formación de ROS vía la reacción de Fenton. La oxidación de hierro mediada por ceruloplasmina se acopla a la reducción molecular de oxígeno previniendo la formación de ROS (De Domenico et al. 2011).

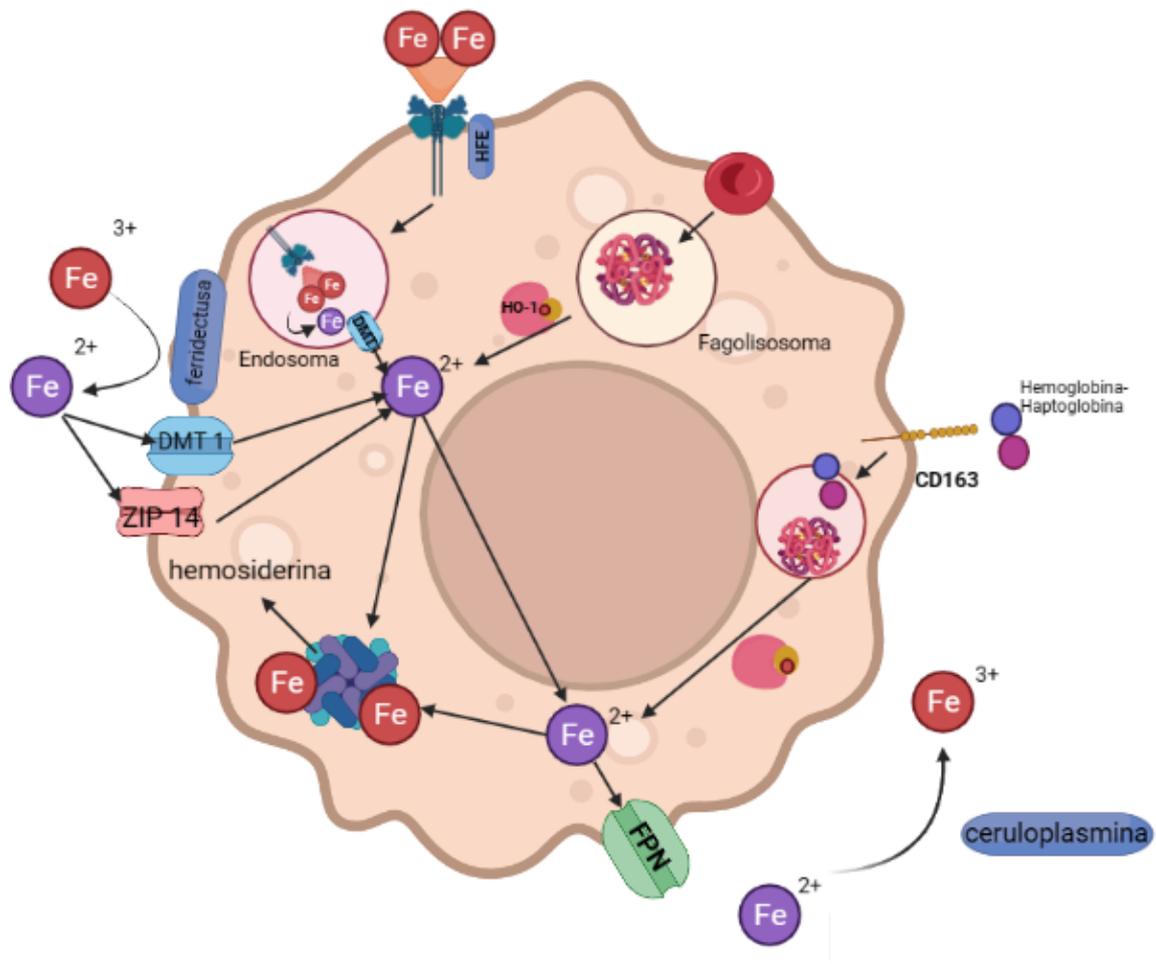


Figura 4. Movilización de hierro en macrófagos del sistema retículo endotelial. Adaptado de Beaumont et al. 2000. Creado con BioRender.com.

Los macrófagos del sistema reticuloendotelial, de hígado y bazo desempeñan una función muy importante en el metabolismo del hierro mediante el proceso de fagocitosis eritrocítica. Estas células expresan la proteína importadora de hierro DMT1 participando en el transporte de hierro adquirido cuando los eritrocitos senescentes son fagocitados (Gruenheid et al. 1999) (Figura 4).

Otro mecanismo de importación de hierro macrófágico es a través de la unión RTf1-transferrina (Knutson & Wessling-Resnick 2003).

Otra vía de ingreso de hierro a la célula es mediada por el receptor CD163, expresado exclusivamente en monocitos y macrófagos, que se une al complejo formado entre haptoglobina y hemoglobina liberada por la destrucción de eritrocitos en el espacio intravascular (Kristiansen et al. 2001).

2. REGULACIÓN DEL CICLO DEL HIERRO

2.1 ROL CENTRAL DE HEPCIDINA

Hepcidina es el principal regulador del ciclo del hierro (Nemeth y Ganz 2006). Su expresión inhibe el egreso del hierro celular mediante su unión a la proteína exportadora de hierro ferroportina. La unión hepcidina-FPN bloquea la absorción intestinal, inhibe la liberación del hierro desde el SRE e inhibe la liberación de los depósitos de hierro principalmente hepáticos (Ganz y Nemeth 2012).

Hepcidina, hormona peptídica de 25 aminoácidos, se sintetiza principalmente en el hígado como un precursor de 84 aminoácidos que posteriormente es procesado y secretado en forma de un péptido de 25 aminoácidos (Park et al. 2001). Sin embargo, se ha observado la expresión de hepcidina en otros órganos como corazón y pulmón y se postula que produciría una regulación local a nivel de estos órganos regulando el flujo de hierro (Lakhal-Littleton et al. 2016; Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

Los hepatocitos han sido reconocidos como el mayor sitio de síntesis de hepcidina dada su localización en la circulación portal que distribuye el hierro absorbido a nivel intestinal además de estar involucrados en los depósitos de hierro y por su proximidad a las células de Kupffer que reciclan eritrocitos (Ganz y Nemeth 2012).

La expresión de hepcidina es regulada en respuesta al hierro, a la inflamación, a la hipoxia y a la eritropoyesis inefectiva (Veuthey, D'Anna y Roque 2008, D'Anna, Giorgi y Roque 2011; D'Anna y Roque 2012; Giorgi y Roque 2013).

Hepcidina es regulada homeostáticamente por los requerimientos eritropoyéticos de hierro, de esta forma durante la eritropoyesis activa la producción de hepcidina se inactiva dejando hierro disponible para la síntesis de hemoglobina (Pak et al. 2006). La deficiencia absoluta o relativa de hepcidina causa sobrecarga de hierro en enfermedades como la hemocromatosis hereditaria.

Originalmente se la identificó como un péptido con propiedades antimicrobianas por lo que se la denominó LEAP1 (liver expressed antimicrobial peptide) (Krause et al. 2000). Posteriormente se demostró su relación con el metabolismo del hierro cuando la inactivación del gen de hepcidina en ratones ocasionó estados severos de sobrecarga de hierro (Nicolas G et al. 2001). Es conocido que los individuos con exceso de hierro son más susceptibles a infecciones bacterianas que aquellos individuos con un balance de hierro normal (Weinberg 1978). De esta forma privar de hierro a los patógenos mediante la acción de hepcidina durante la infección podría ser una ventaja evolutiva del hospedador.

El genoma de ratón contiene dos genes que codifican para hepcidina pero sólo hepcidina 1 pareciera tener un rol fundamental en el metabolismo del hierro (Lou et al. 2004).

Introducción

En humanos el péptido hepcidina es codificado por un gen pequeño de tres exones que producen la preprohepcidina de 84 aminoácidos que está compuesta por: una secuencia señal de 24 aminoácidos en el extremo N-terminal para su reconocimiento en el retículo endoplasmático, una pro-región central entre los aminoácidos 25 y 59 y el péptido maduro de 25 aminoácidos en el extremo C-terminal (Figura 5) (Park et al. 2001; Pigeon et al. 2001). El extremo C-terminal posee un sitio de clivaje para furina, un miembro de la familia de pro-hormonas convertasas que clivan a precursores proteicos para activarlos (Figura 5) (Pigeon et al. 2001; Valore & Ganz 2008).

Se ha descrito que la furina convertasa sería la principal enzima involucrada en la eliminación de la pro-región de la prohepcidina produciendo la hepcidina madura, que es liberada a la sangre (Valore & Ganz 2008).

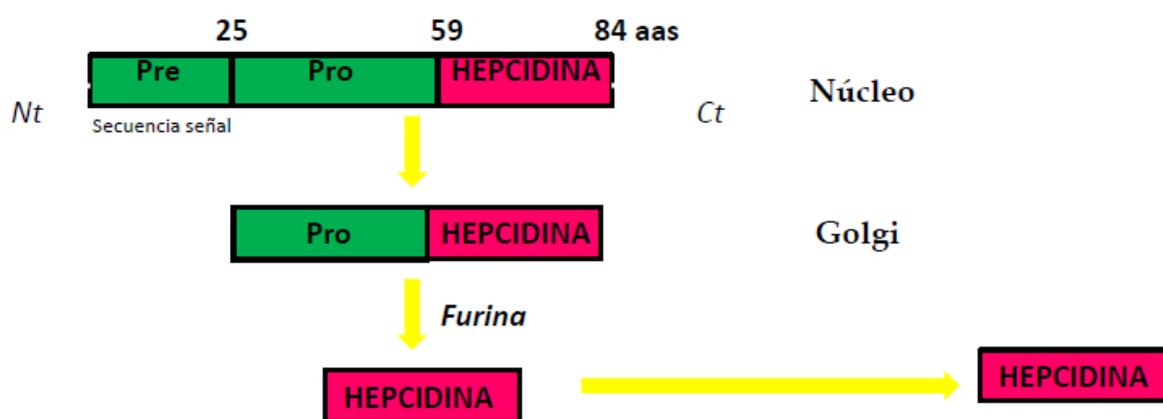


Figura 5. Síntesis de la proteína Hepcidina.

La hepcidina es un péptido muy pequeño que presenta una estructura terciaria compleja compuesta por 8 residuos cisteína, conectados por 4 puentes disulfuro (Ganz 2003). Esta estructura peptídica, dificulta la obtención de anticuerpos. Por ello, desde el descubrimiento de hepcidina como proteína reguladora del ciclo del hierro, números estudios han intentado desarrollar una técnica que permita la evaluación de los niveles séricos y urinarios de esta hormona.

Por su pequeño tamaño y su mecanismo de acción puede ser filtrada como un péptido pequeño por la membrana glomerular renal y luego reabsorbida y degradada en el túbulo proximal utilizando un mecanismo genérico de reciclaje de aminoácidos (Nemeth y Ganz 2021). Un pequeño porcentaje de la hepcidina filtrada puede ser detectado en orina (Nemeth y Ganz 2021). Su detección en suero resulta compleja (Kemna et al. 2007). Los avances respecto a la determinación cuantitativa de

Introducción

hepcidina requieren de inmuno-ensayos enzimáticos para la detección de prohepcidina sérica humana.

Estudios de Valore y Ganz (2008) en células de hepatoma humano HepG2 y en cultivo primario de hepatocitos, demostraron un aumento de los niveles de prohepcidina celular cuando la síntesis de hepcidina fue estimulada, identificando una relación directa entre los niveles celulares del pro-péptido y del péptido.

Además, en la bibliografía solo se describe que la síntesis de hepcidina hepática es regulada transcripcionalmente por hierro, por la actividad eritropoyética y por la inflamación (Flanagan et al. 2007; Lee & Beutler 2009). Teniendo en cuenta estos estudios, el análisis de la expresión de prohepcidina en células y tejidos permitiría inferir el cambio en la expresión de hepcidina. Un estudio en cardiomiocitos muestra que en condiciones de deficiencia de hierro se activa furina convertasa (clivaje de prohepcidina) elevando los niveles de hepcidina (Lakhal-Littleton et al. 2016). De esta forma el corazón sería el único órgano reportado hasta la fecha en donde no se correlacionan los niveles de prohepcidina y hepcidina. Se propone que el corazón llevaría a cabo un control local del hierro mediado por hepcidina dada la elevada cantidad de hierro que requiere para sus funciones vitales evitando la deficiencia en miocardiocitos (Lakhal-Littleton et al. 2016).

En un estudio reciente, se desarrolló una técnica confiable y específica para la detección del péptido activo de hepcidina en suero, que involucra una cuantificación costosa pero altamente específica a través del método de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (Lefebvre et al, 2015). Sin embargo, este método no es ampliamente accesible ni se encuentra validado en modelos animales experimentales (Gutschow et al. 2015).

Teniendo en cuenta las dificultades existentes en los métodos de cuantificación de hepcidina, en el presente trabajo de tesis estudiamos la expresión tisular del pro-péptido, que se correlaciona con los niveles tisulares de hepcidina (Valore y Ganz 2008).

Hepcidina controla la absorción de hierro a nivel intestinal, la liberación del mismo desde los macrófagos del SRE y desde los sitios de depósito como el hígado (Figura 6). La deficiencia de hepcidina conduce a severa sobrecarga de hierro como ocurre en la mayoría de los casos de hemocromatosis hereditaria en donde las mutaciones asociadas a genes que regulan a hepcidina (HFE, RTf2, HJV) conducen a la hiperabsorción de hierro dietario conduciendo a estados de exceso de hierro en donde el mismo se deposita a nivel hepático y en otros órganos produciendo toxicidad y daño celular (Ruchala y Nemeth 2014).

Introducción

El eflujo de hierro celular es controlado por hepcidina mediante dos mecanismos, la oclusión del receptor FPN y la endocitosis y degradación de FPN (Nemeth y Ganz 2021). El mecanismo de oclusión es más efectivo cuando hay altos niveles de hepcidina y es reversible cuando los niveles de hepcidina disminuyen (Nemeth y Ganz 2021). El segundo mecanismo ocurre con menores concentraciones de hepcidina y su efecto es prolongado en el tiempo (Nemeth y Ganz 2021).

Hepcidina regula negativamente la liberación celular de hierro mediante su unión a FPN y su posterior internalización y degradación (Figura 6) demostrado por primera vez en células embrionarias renales que expresaban ferroportina localizada en la membrana celular. Hepcidina induce un cambio conformacional en ferroportina que permite la ubiquitinización del segmento citoplasmático rico en lisina conectado a los seis dominios helicoidales de FPN (Nemeth y Ganz 2021). FPN ubiquitinada se degrada posteriormente en lisosomas y proteosoma. Un estudio reciente indica que Rnf217 es una ubiquitin ligasa E3 que cataliza la degradación de FPN en respuesta a la unión a hepcidina (Jiang et al. 2021).

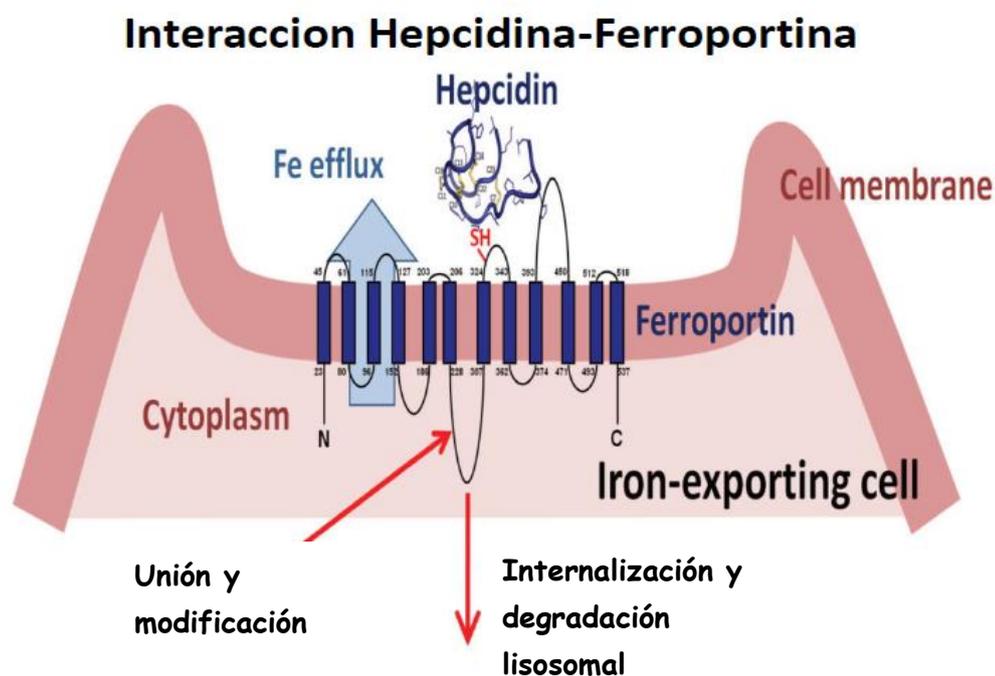


Figura 6. Acción de Hepcidina sobre el exportador de hierro Ferroportina.

Introducción

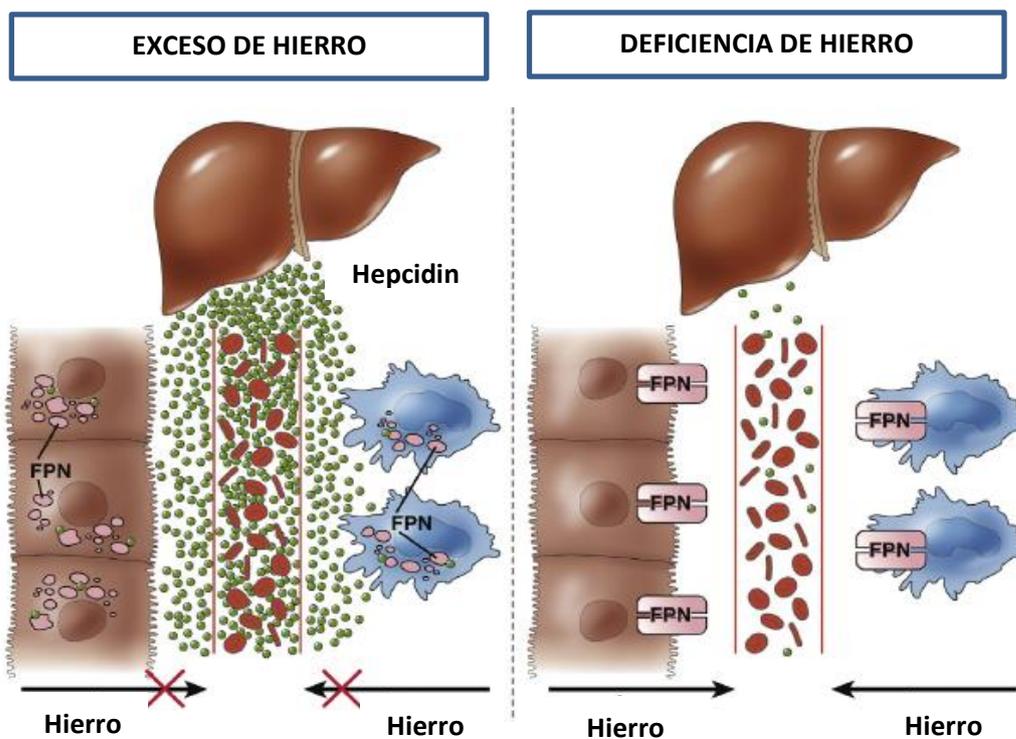


Figura 7. Movilización de hierro mediada por hepcidina. Adaptado de Shah y Xie 2014.

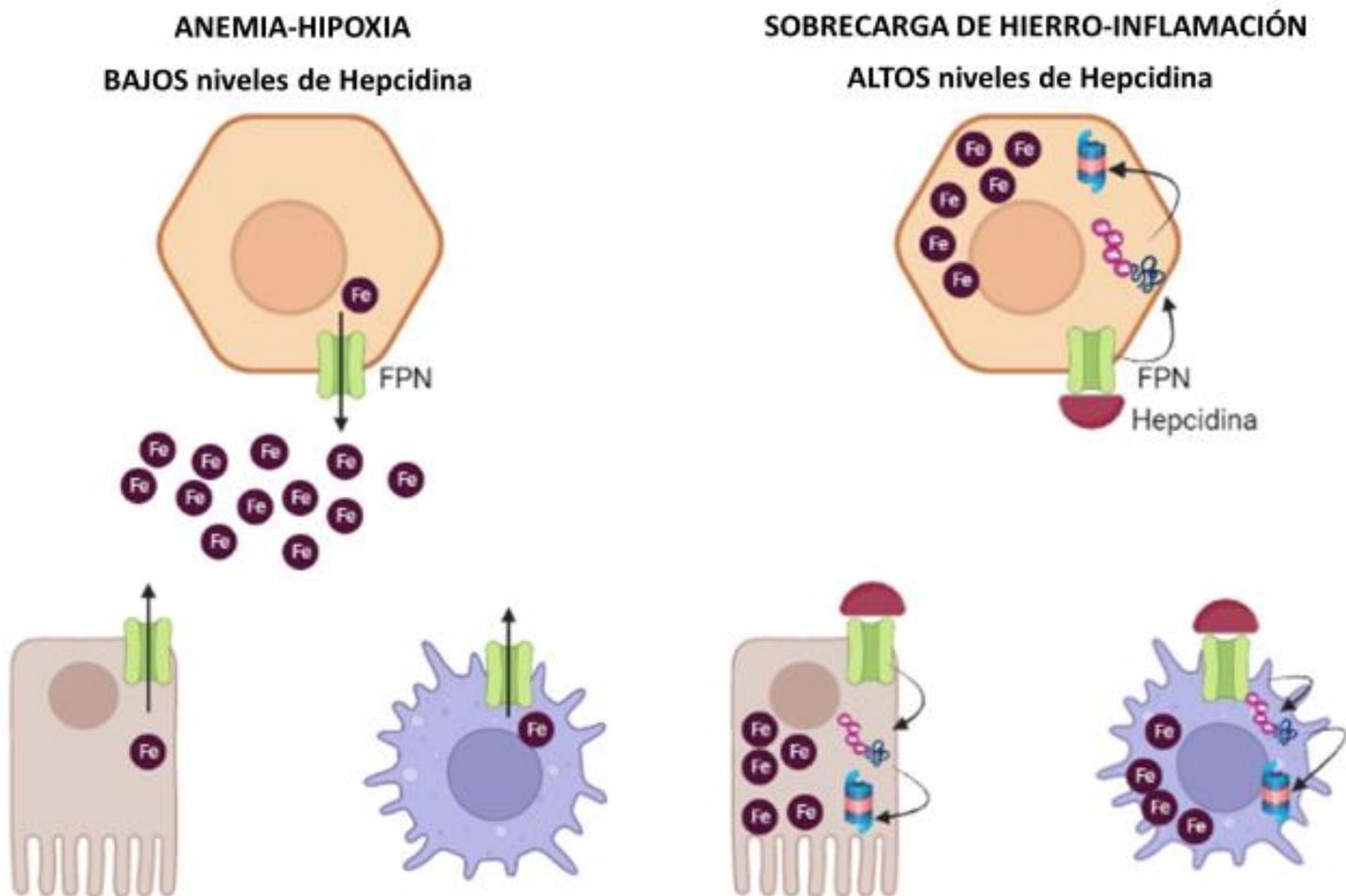


Figura 8. Efecto de los diferentes niveles de Hepcidina sobre los enterocitos y macrófagos. Creado con BioRender.com

Introducción

La ferroportina facilita el transporte del hierro mediante un mecanismo conformacional que alterna el acceso al hierro desde caras intracelulares y extracelulares del transportador (Figura 9). Los dos brazos de ferroportina de seis hélices encierran una cavidad central a través de la cual el hierro se mueve hacia afuera. Aún no se comprende que impulsa la direccionalidad del transporte de hierro, pero se asume que está acoplado a otro transporte energéticamente favorable de otro ion o molécula (Ganz, 2021).

El control de hepcidina sobre la actividad de ferroportina se lleva a cabo a través de al menos dos mecanismos. Por un lado, hepcidina se une dentro de la cavidad central de la ferroportina para ocluirla cuando el hierro es transportado desde el citoplasma al espacio extracelular impidiendo su salida (Figura 9). Este mecanismo requiere una elevada concentración de hepcidina para alcanzar una alta ocupación de ferroportina (Ganz, 2021).

El segundo mecanismo de regulación implica endocitosis y proteólisis de ferroportina inducidas por hepcidina. Aquí, se cree que la unión a la hepcidina causa un cambio conformacional en la ferroportina, con la consiguiente ubiquitinación en un asa intracelular rica en lisina que conecta las dos mitades de la molécula de ferroportina (Ganz, 2021)

La unión de hepcidina a ferroportina depende del bucle extracelular de ferroportina y la presencia de cisteína en posición 326 (Ganz y Nemeth 2012). La afinidad de hepcidina y ferroportina depende de la unión de Janus quinasa 2 citosólica (Jak2) al exportador de hierro. Ferroportina es un dímero en donde cada monómero permanece unido a hepcidina por Jak2 (Figura 10).

Posteriormente las dos moléculas de Jak2 se autofosforilan y fosforilan a FPN (De Domenico et al. 2007). FPN es fosforilada en sus residuos tirosinas adyacentes en la membrana plasmática, lo que resulta en la internalización de FPN-hepcidina por endocitosis. Una vez dentro de la célula FPN es monoubiquitinada en el residuo lisina en posición 253, posteriormente a ser desfosforilada se degrada en lisosomas (De Domenico et al. 2007). Esta ubiquitinación pareciera ser dependiente de la presencia de Fe^{2+} unido a FPN. La ubiquitinación es crítica para la degradación de FPN dado que un complejo de proteínas citosólicas reconoce a FPN ubiquitinada permitiendo su captura en vesículas que se fusionan con endosomas y posteriormente lisosomas para su degradación.

La ubiquitinación es un mecanismo regulador por el cual el amino 76 de la proteína ácida ubiquitina está unida covalentemente a otras proteínas, generalmente para marcarlos para la degradación proteolítica. Se lleva a cabo por una cascada de tres enzimas (ligasas de ubiquitina E1, E2 y E3) que, respectivamente, activan la ubiquitina, la transfieren y, en última instancia, ligarlo a una cadena lateral de lisina en la proteína objetivo o posteriormente a una lisina en la cadena de

Introducción

poliubiquitina en la proteína objetivo (Ganz 2021). La especificidad de la proteína reside predominantemente en la ligasa E3, ya que son sólo 2 genes humanos para E1 y 35 para E2, pero ~600–700 genes que codifican ligasas E3. Nemeth y Ganz (2021) mostraron que RNF217 contribuye a la ubiquitinación de ferroportina que impulsa endocitosis y proteólisis de ferroportina inducida por hepcidina (Figura 9).

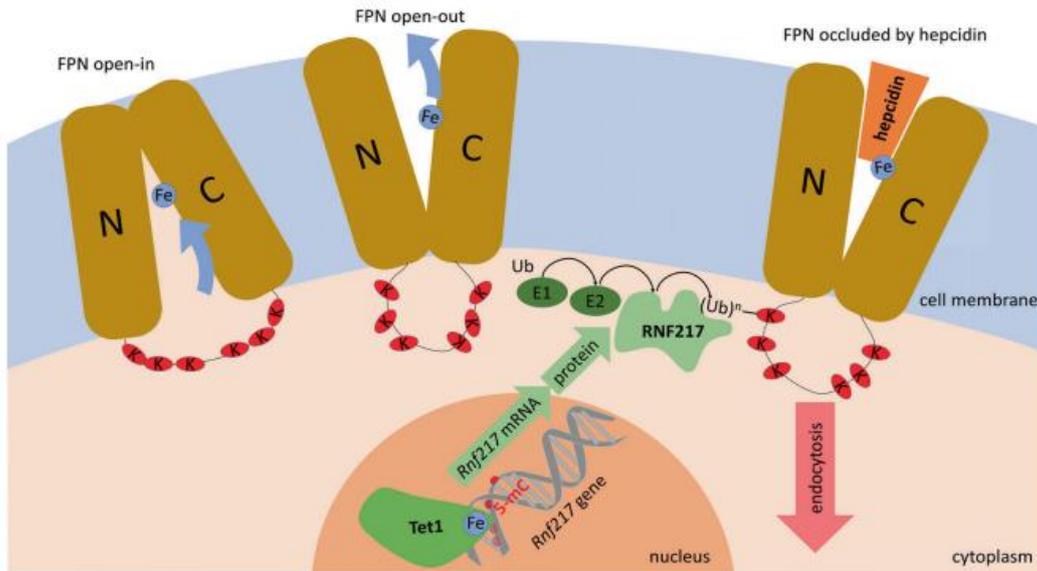


Figura 9. Mecanismos de acción de Hepcidina. Ganz 2021

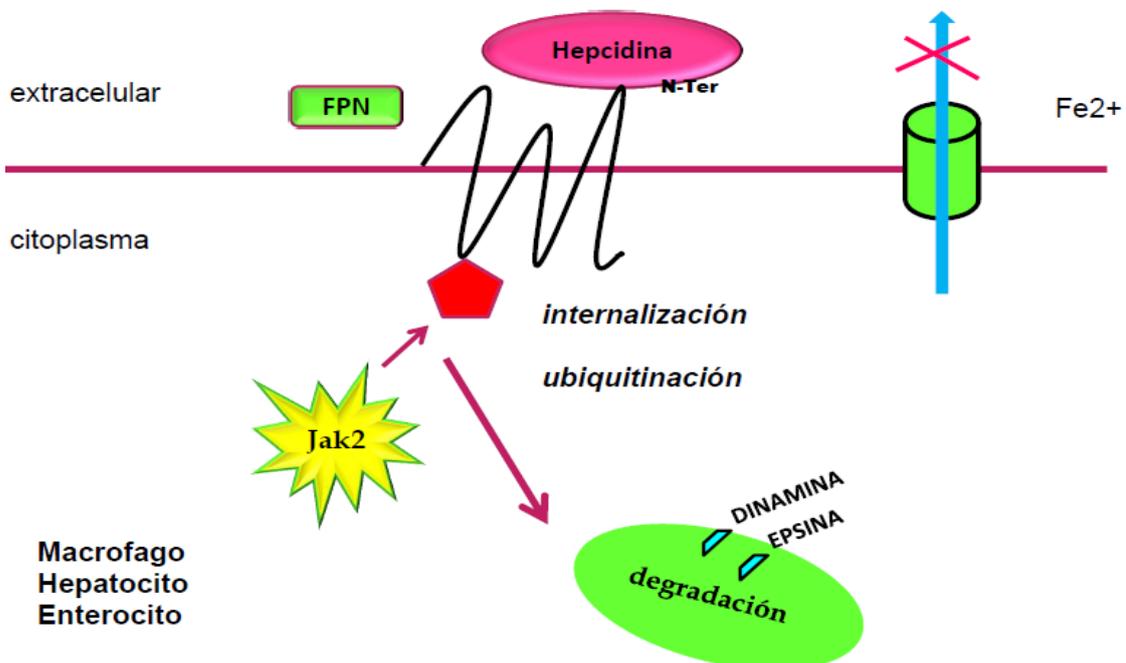


Figura 10. Internalización de Ferroportina dependiente de Jak2.

Introducción

La expresión de FPN es regulada también de una manera independiente de hepcidina mediada por hemo y hierro. La existencia de varios mecanismos regulatorios de FPN demuestra su gran importancia en la homeostasis del hierro. De esta forma el hemo causa un rápido aumento de la transcripción de ferroportina promoviendo la acumulación nuclear del regulador transcripcional Nrf2 que conduce al desplazamiento de Bach 1, represor transcripcional del elemento de reconocimiento de Maf (MARE) a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) en el promotor de ferroportina (Delaby et al. 2008). Además, la traducción de FPN es controlada mediante la interacción de elementos de respuesta al hierro con proteínas de respuesta al hierro, sistema IRE-IRP.

Ha sido ampliamente demostrado que en estados de exceso de hierro se induce el aumento del ARNm de hepcidina en hepatocitos, aunque se desconoce el mecanismo exacto (Pigeon et al. 2001). El ARNm de hepcidina carece de regiones IRE por lo que es necesario un sistema diferente al IRE-IRP para regular los niveles de este péptido en respuesta al hierro (Ganz y Nemeth 2006).

Algunos autores proponen, dado que es un péptido antimicrobiano, una regulación mediada por inflamación. En este sentido se ha observado que en hígados murinos y hepatocitos tratados con LPS aumenta el ARNm de hepcidina (Pigeon et al. 2001).

Frente a estados de exceso de hierro para coordinar la absorción apical de hierro a nivel intestinal con la transferencia basolateral del mismo hacia el plasma, el efecto de hepcidina sobre FPN basolateral debe comunicarse con mecanismos que disminuyan la absorción intestinal de hierro. Existen tres mecanismos que actúan de manera coordinada, en primer lugar, la acumulación de hierro celular causada por la disminución de la exportación de hierro luego de la interacción de hepcidina con ferroportina se inactivan las proteínas regulatorias del hierro IRP1 e IRP2 que se unen a los elementos de respuesta al hierro IRE en la región 3' del ARNm de DMT1 desestabilizándolo y disminuyendo la síntesis de DMT1 (Gunshin et al. 2001). En el segundo mecanismo el hierro celular actúa como cofactor de las prolin hidroxilasas que sensan oxígeno e induce la hidroxilación del factor inducible por hipoxia HIF2 α produciendo su degradación y removiendo el efecto estimulador de la transcripción de DMT1 (Shah et al. 2009). El tercer mecanismo involucra la activación de ubiquitin ligasas desencadenado por la unión de hepcidina a FPN, su difusión al citoplasma y la transubiquitinación y posterior degradación proteosomal de DMT1 (Brasse-Lagnel et al. 2011).

La producción de hepcidina es regulada de manera transcripcional por hierro. Es lógico que hepcidina como otras hormonas sea regulada por retroalimentación de la sustancia que controla, el hierro, de acuerdo a su concentración. Se sugiere que los dos receptores de transferrina RTf1 y RTf2 junto con HFE que interactúa con ambos receptores podrían servir como un sensor de

Introducción

holotransferrina o transferrina diférrica (Schimdt et al. 2008, Gao et al. 2009). HFE está estructuralmente relacionada con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de clase I, cuya unión al RTf1 es inhibida competitivamente por la holotransferrina (Giannetti et al. 2004). Por lo tanto, cuando aumenta la concentración de holotransferrina (Fe-Tf), HFE se desplaza del complejo con el RTf1, dado que el sitio de unión de HFE en el RTf1 se superpone con el de la holotransferrina. Luego de la liberación, HFE interactúa con el RTf2 y, a su vez, el complejo RTf2-HFE es estabilizado por la unión de Fe-Tf (Pantapoulos, 2008). El complejo formado por FeTf-HFE-RTf2 estimula la expresión de hepcidina por una vía poco comprendida. Se propone que el complejo formado potencia la vía de señalización de BMP y/o MAPK (Gao et al. 2009).

Si bien el mecanismo de acción de HFE en la síntesis de hepcidina se encuentra claramente establecido también se sugiere que podría tener un rol en la regulación de transportadores de hierro tanto del Receptor de Transferrina por competir con la holotransferrina en su unión o de otros importadores por mecanismos poco conocidos. Se ha descrito en células de hepatoma que sobreexpresan HFE la disminución de la captación de hierro NTBI por la disminución de la expresión del transportador ZIP14 desestabilizándolo, aunque no se observaron cambios en el ARNm (Gao et al. 2008).

La vía de señalización de BMP utiliza Smads citoplasmáticas como señal clave en la regulación de la transcripción de hepcidina (Babitt et al. 2006). Esta vía regula varios procesos vitales como la morfogénesis embrionaria, el desarrollo óseo y la reparación tisular. Hemojuvenila (HJV) es un adaptador específico del hierro a las BMP que aumenta su sensibilidad por las BMPs (Ganz, 2011). En humanos mutaciones de hemojuvenila conducen a deficiencia severa de hepcidina y puede ser la causa de hemocromatosis juvenil (Papanikolau et al. 2004). Las BMP interactúan con sus receptores del tipo serina treonina quinasa. Se propone que, en respuesta al aumento de la saturación de transferrina, RTf2 inicia una cascada de señalización que aumenta la síntesis de BMP-6. Posteriormente, BMP-6 sería secretada al exterior celular para interactuar con los receptores de BMP y con su co-receptor HJV, activando la vía de señalización de SMADs que estimula la síntesis de hepcidina (Rishi et al. 2015).

Se ha demostrado que HFE interacciona con el receptor de BMP tipo 1 ALK3 estabilizando a la proteína en la superficie celular y permitiendo que la señalización por BMP conduzca al aumento de la expresión de hepcidina (Wu et al. 2014). El transcripto de BMP6 es producido principalmente en las células no parenquimatosas hepáticas indicando que podría tener una función parácrina influenciando en la transcripción de Hamp (gen que codifica para hepcidina) en las células hepáticas

Introducción

vecinas. De esta forma las células hepáticas no parenquimatosas sensan los niveles de hierro y liberan BMP6 que desencadena la vía de transcripción de hepcidina (Enns et al. 2013).

Otras dos proteínas de membrana, la neogenina inicialmente conocida por sus funciones en el sistema nervioso y una serina proteasa matriptasa 2 (MT-2) están involucradas en la síntesis de hepcidina modulando la concentración de hemojuvenila en la membrana celular, de esta forma MT-2 inhibe la síntesis de hepcidina por el clivaje de hemojuvenila y neogenina inhibe la secreción de HJV (Silvestri et al. 2008; Lee et al. 2010). Posteriormente a la activación del receptor de BMP la transcripción de hepcidina es contralada por la vía de las SMADs 1/5/8. Actualmente se ha propuesto que la regulación de hepcidina por el hierro intracelular involucraría el aumento de la síntesis hepática de BMP-6 por el exceso de hierro celular (Kautz et al. 2008).

Luego, BMP-6 sería secretada desde las células para interactuar con su co-receptor HJV y con el receptor de BMP, activando una vía de señalización intracelular en la que se fosforilan SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8) (Ganz & Nemeth, 2012). Este mecanismo favorecería la unión de pSMAD1/5/8 con SMAD4 formando un complejo que translocaría al núcleo, activando la transcripción del gen de hepcidina (Figura 11) (De Domenico et al. 2007).

La relación entre la vía de las Smad y el metabolismo del hierro se estableció al estudiar a ratones con una delección específica de Smad4 y demostrar un exceso de hierro (Wang et al. 2005).

Alto Fe

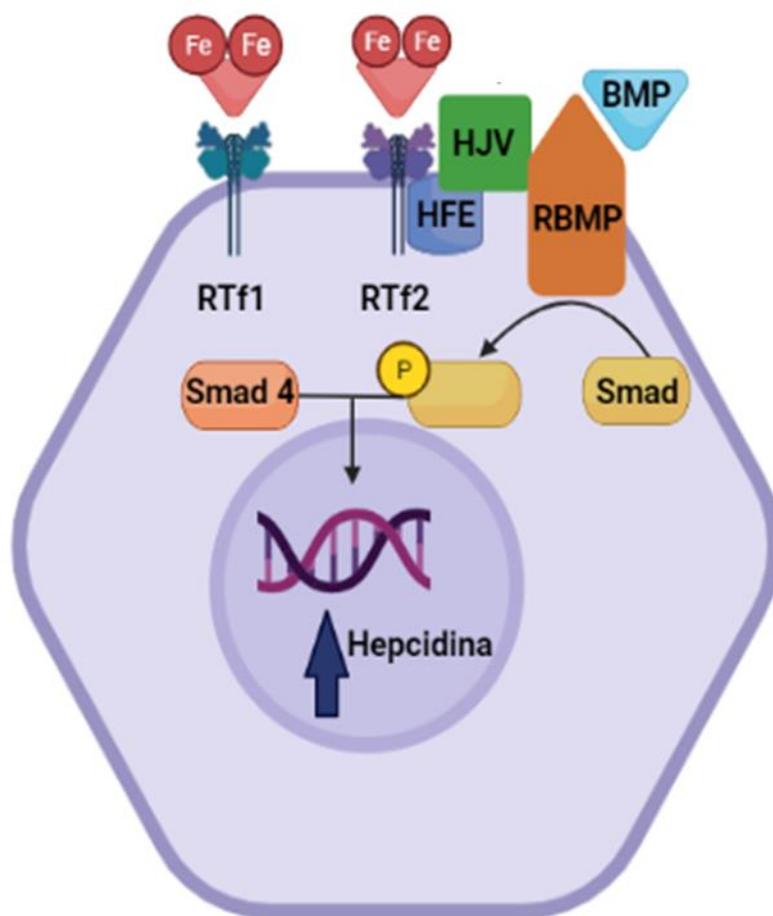


Figura 11. Vía de señalización para la síntesis de Hepcidina. Adaptado de Ganz, 2011. Creado con BioRender.com

2.2 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR INFLAMACIÓN

La inflamación presenta un potente efecto en la homeostasis del hierro mediante la reducción de la absorción intestinal, el secuestro de hierro en los macrófagos y la disminución de los niveles séricos (Ganz 2011). La síntesis de hepcidina hepática es regulada de manera transcripcional por IL-6 a través de la vía de señalización de las STAT-3 que interaccionan con su elemento de unión en el promotor de hepcidina (Figura 12) (Nemeth 2004; Pietrangelo et al. 2007). En este sentido se ha observado en hepatocitos cultivados con IL-6 un aumento en la síntesis de hepcidina (Nemeth et al. 2003).

Además, ratones tratados con turpentina para inducir inflamación aumentan los niveles de ARNm de hepcidina (Nicolas et al. 2002). Existe evidencia que demuestra que el promotor del gen HAMP

Introducción

contiene un sitio de unión a STAT-3 (Verga Falzacappa et al. 2007). Pietrangelo et al. (2007) demostraron que STAT3 es el primer factor de transcripción que media la inducción de hepcidina vía IL-6.

La vía de señalización de JAK-STAT3 opera de manera similar a la vía de BMP-SMAD en donde la unión de una citoquina, por ejemplo, IL6 se une a su receptor e induce una cascada de señalización que finaliza en la fosforilación de STAT3 que trasloca al núcleo para unirse a un factor de transcripción e inducir la expresión de hepcidina. Se ha sugerido que las vías de JAK-STAT y BMP-SMAD se entrecruzarían a nivel de SMAD4 (Wang et al. 2005).

Los niveles de hepcidina aumentan rápidamente en la inflamación por la vía de IL-6 además de otras vías de señalización como las de BMP (Armitage et al. 2011, Besson-Forunier et al. 2012). Si bien IL-6 y otras citoquinas actúan mediante la vía de las STAT3, también se propone que activina-B actúa mediante la vía de las BMP y las Smad 1/5/8 estimulando la expresión de hepcidina durante los estados de inflamación (Ruchala y Nemeth 2014). En este sentido se ha demostrado que es necesario el receptor de BMP1 Alk3 para la respuesta de hepcidina mediada por IL-6. Esto se observó dado que ratones que carecían de Alk3 eran incapaces de inducir la síntesis de hepcidina en respuesta a IL-6 (Mayeur et al. 2014).

Los mencionados y posiblemente otros mecanismos aumentan la producción de hepcidina y sus niveles plasmáticos durante la inflamación y en estados infecciosos. El aumento de hepcidina conduce a hipoferrremia posiblemente para controlar la multiplicación de microorganismos que requieren hierro extracelular, sin embargo, se limita también el hierro disponible para la eritropoyesis y contribuye a la anemia de la inflamación o anemia de las enfermedades crónicas (Ganz y Nemeth 2012).

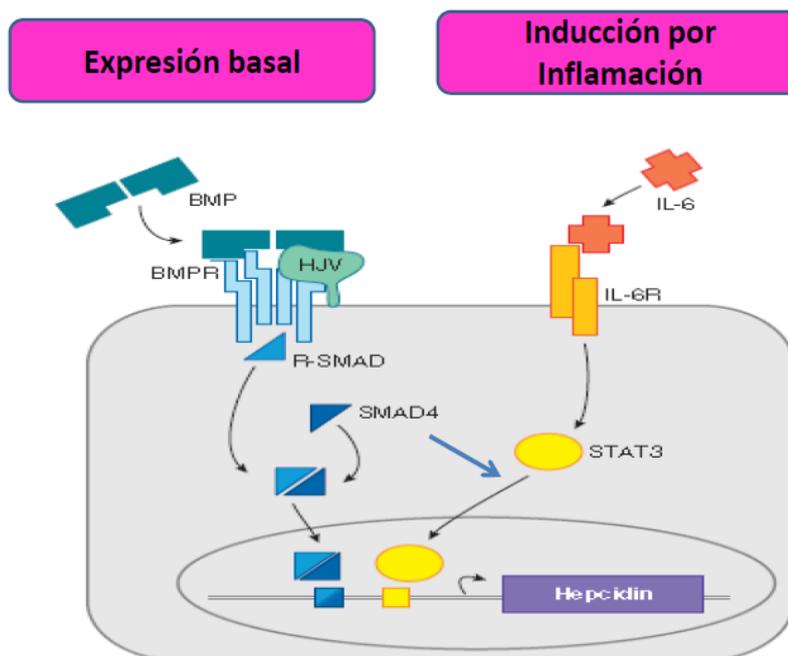


Figura 12. Regulación de la síntesis de Hepcidina por inflamación.

Adaptado de Ruchala y Nemeth 2014.

2.3 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR ERITROPOYESIS

La existencia de una conexión entre la eritropoyesis y la absorción del hierro fue observada hace 50 años en estudios en animales con hipoxia y tratados con eritropoyetina, observando que la absorción de hierro radiactivo aumenta en estados de hipoxia o en presencia de EPO (Mendel 1961).

El eritrón conformado por las células eritroides en desarrollo en medula ósea y los eritrocitos circulantes consumen alrededor del 80% del hierro plasmático (Wrighting y Andrews 2008).

Una de las principales moléculas de señalización que median la eritropoyesis es la eritropoyetina (EPO), que se produce fundamentalmente a nivel renal y contribuye a la maduración y diferenciación de los precursores eritroides. La actividad eritropoyética suprime la síntesis de hepcidina hepática. Nicolás et al. (2002) demostraron que el ARNm de hepcidina en un modelo animal de ratón de anemia fue suprimido, en este sentido se propone que el aumento en la absorción y movilización de hierro en estados de anemia podría conducir a la supresión de la síntesis de hepcidina mediado por el estado de hipoxia mediada por factores inducibles por hipoxia. En estados de eritropoyesis activa aumenta la demanda de hierro que puede conducir a hipoferremia y la supresión de la síntesis de hepcidina por un mecanismo regulatorio en respuesta a hierro (Ganz 2011). En este sentido Ashby et al. (2010) reportaron que la administración exógena de eritropoyetina en humanos provoca un marcado y prolongado descenso de los niveles de hepcidina

Introducción

circulante. En este contexto se ha observado que la administración de eritropoyetina suprime a hepcidina posiblemente a través de un mediador liberado desde médula ósea con sitio de acción a nivel hepático (Pak et al. 2006).

La estrecha relación entre la eritropoyesis y el metabolismo del hierro en los vertebrados es necesaria dado el elevado contenido de hierro de los eritrocitos y su alto recambio (Giblett et al. 1956). Los eritrocitos tienen una vida media en humanos de 120 días y en ratón de 40 días previo a ser ingeridos por los macrófagos del sistema reticuloendotelial para que el hierro sea reciclado y enviado a médula ósea en el humano y también a bazo en ratones para la síntesis de glóbulos rojos nuevos. Cada segundo se producen entre 2 y 3 millones de glóbulos rojos y se requieren entre 30 y 40 mg de hierro para producir 30 pg de hemoglobina por célula, un total de 6 g de hemoglobina al día.

Sin embargo, el pool de hierro unido a transferrina es 10 veces menor a los requerimientos diarios de hierro, predominantemente el hierro necesario para la eritropoyesis proviene del reciclaje del grupo hemo por los macrófagos proveniente de otros glóbulos rojos senescentes (Li y Ginzburg 2010). Es por ello que la eritropoyesis domina el metabolismo del hierro y ambos se relacionan de forma muy estrecha, en consecuencia, el proceso dinámico de transporte de hierro para la eritropoyesis requiere de un estricto control para prevenir deficiencias o excesos de hierro y proteger al organismo de anemias o de la potencial toxicidad generada por el biometal.

Hepcidina es el principal regulador de la homeostasis del hierro, controlando su absorción intestinal, y su liberación por parte de los macrófagos del SRE y la circulación del hierro para su utilización en la eritropoyesis. Mediante la disminución de la transcripción del gen de hepcidina, la actividad eritropoyética estimula la absorción de hierro a nivel intestinal, así como también la liberación del mismo desde los macrófagos y desde los sitios de depósitos como los hepatocitos (Ganz 2018).

Eritropoyetina puede inhibir la síntesis de hepcidina de forma directa mediante la unión a su receptor en los hepatocitos (Pinto et al. 2008), sin embargo, numerosos estudios indican la presencia de un factor eritroide para inhibir la síntesis de hepcidina (Tanno et al. 2010).

Inicialmente se propuso la existencia de un regulador eritroide liberado por los eritroblastos, GDF15 como regulador de la síntesis de hepcidina sin embargo, al realizar flebotomías a ratones deficientes en este factor de crecimiento no se observaron diferencias en los niveles de hepcidina respecto a los controles sugiriendo que existirían otras vías involucradas en la síntesis de hepcidina (Casanovas et al. 2013).

Introducción

El principal regulador eritroide de la síntesis de hepcidina es la eritroferrona (ERFE) que se sintetiza y secreta por los eritroblastos medulares y de sitios extramedulares. La producción de ERFE es inducida por EPO. ERFE actúa en los hepatocitos suprimiendo la síntesis de hepcidina por un mecanismo regulatorio poco conocido que involucra a las BMP (Figura 13 A) (Ganz 2018). En situaciones de hipoxia, los riñones sensan bajo oxígeno y secretan EPO que estimula la eritropoyesis y la producción de ERFE. Dado que ERFE suprime la síntesis de hepcidina el hierro se moviliza desde los sitios de depósito para ser utilizado en la síntesis de glóbulos rojos (Figura 13 B) (Srole y Ganz 2021). Recientemente se ha demostrado que ERFE se une y secuestra a ciertos miembros de la familia de las BMPs fundamentalmente BMP2, BMP6 y el heterodímero formado por BMP2/6 mediante la unión al receptor de BMP ALK3 (Figura 13 C) (Wang et al. 2020).

Se ha demostrado el aumento de ERFE en ratones sometidos a pérdidas sanguíneas o tratados con EPO (Ganz 2018). Es suprimido por inhibidores de STAT5 sugiriendo que está involucrada la vía regulatoria de Jak2-STAT5 en la regulación de la expresión de ERFE mediada por EPO (Ganz 2018).

Existe una relación inversa entre la concentración sérica de ERFE y hepcidina sérica en pacientes con Beta talasemia o en pacientes con administración exógena de EPO. (Wang et al. 2017). Wang y colaboradores (2017) demostraron que ERFE suprime la fosforilación de Smad 1/5 en cultivo primario de hepatocitos murinos y en una línea celular Hep3B. De esta forma la supresión de la síntesis de hepcidina por ERFE es en parte mediada por la vía de las BMP.

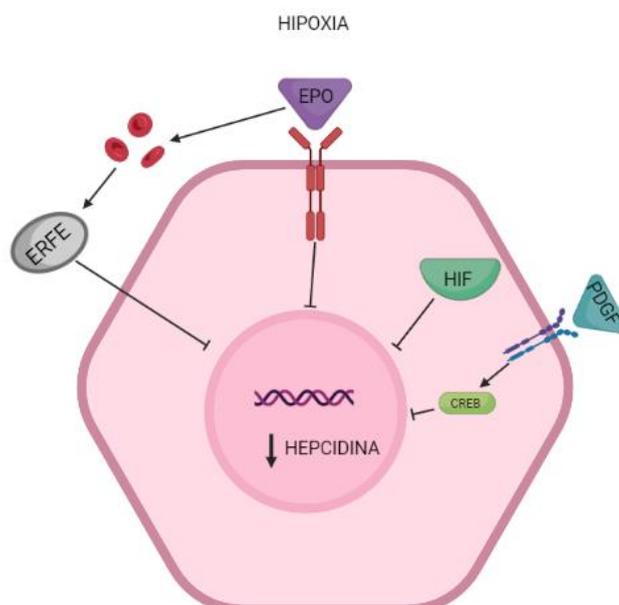
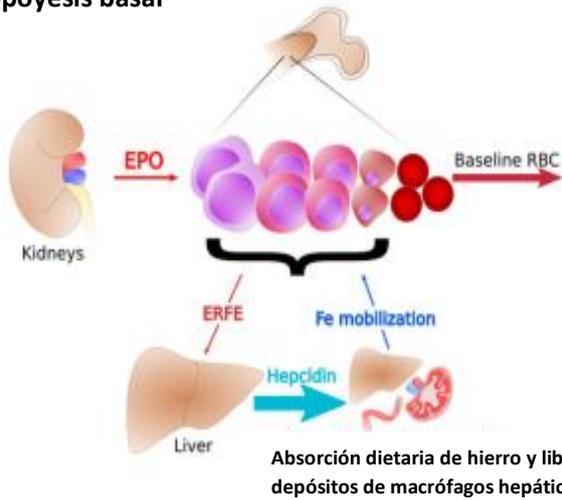


Figura 13 A. Regulación de hepcidina por eritropoyesis e hipoxia.

Adaptado de Rishi et al. 2015. Creado con BioRender.com

Introducción

Eritropoyesis basal



Eritropoyesis inducida

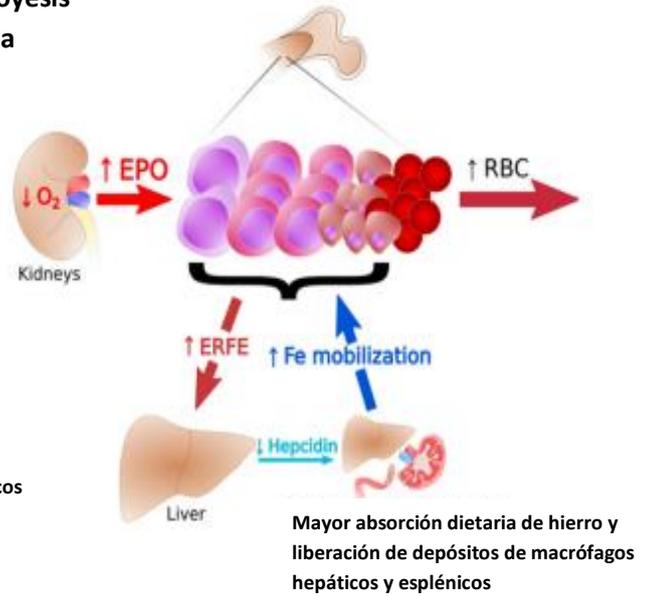


Figura 13 B. Acción de EPO y ERFE en estados de eritropoyesis activa. Ganz, 2021

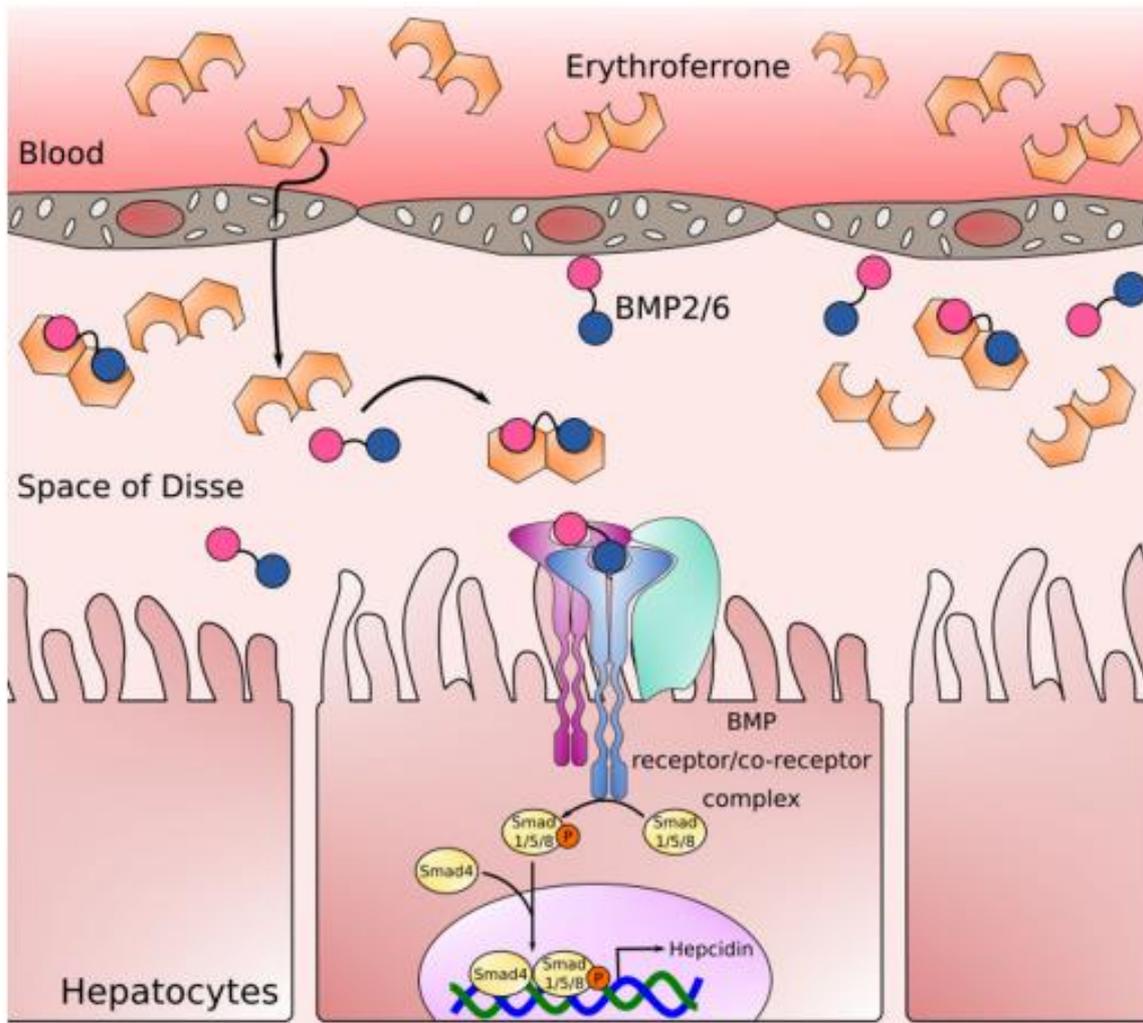


Figura 13 C. Acción de ERFE sobre BMP y síntesis de hepcidina. Srole y Ganz 2021

2.4 REGULACIÓN DE HEPCIDINA POR HIPOXIA

Similar a la respuesta de hepcidina frente a la eritropoyesis se ha observado una disminución de su expresión en estados de hipoxia (Nicolas et al. 2002). El principal regulador de hepcidina en hipoxia es el factor inducible por hipoxia (HIF) (Figura 14) del que se conocen tres subunidades HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α . En presencia de oxígeno estas subunidades son modificadas por la enzima prolil deshidrogenasa y sufren una degradación proteosomal. Las prolil hidroxilasas son enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y su actividad requiere de la unión de hierro al sitio activo y de oxígeno como cosustrato, de esta forma es muy importante un correcto balance de hierro y oxígeno (Myllyharju 2013).

En estados de privación de oxígeno esta enzima se inactiva lo que conduce a la estabilización de los HIF que traslocan a núcleo y se unen a su receptor nuclear ARNT o HIF1 β formando un heterodímero que se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) y regulan la transcripción de genes específicos de hipoxia entre ellos el gen de EPO (Greer et al. 2012). En este sentido se ha demostrado que individuos voluntarios expuestos a elevadas altitudes de hipoxia disminuyen significativamente los niveles de hepcidina y aumentan de forma significativa los de eritropoyetina y la producción de glóbulos rojos (Piperno et al. 2011).

Además, se ha demostrado que HIF1 α se une a 3 HREs en el gen de HAMP y reduce su expresión en células humanas en cultivo y en ratones (Peyssonnaud et al. 2007). Por otro lado, se ha observado que la hipoxia conduce a un aumento en la expresión del ARNm de la furina en células hepáticas en cultivo mediado por HIF1 α (McMahon et al. 2006). En este sentido Silvestri et al. (2008) demostraron un aumento en la expresión de la enzima furina en situaciones de hipoxia y de escaso hierro sugiriendo que éste sería un mecanismo indirecto para regular los niveles de hepcidina.

La hipoxia también regula los niveles de matriptasa 2 o Tmprss6, aumentándolos mediante el reconocimiento del factor inducible por hipoxia 1 por una región HRE localizada en el promotor del gen de Tmprss6 (Maurer et al. 2012).

Por otro lado, se demostró que ratones sometidos a condiciones de hipoxia no presentaban cambios en los niveles de expresión de SMAD 1/5/8 o STAT3 sugiriendo que no estarían involucradas las vías de BMP o JAK-STAT en la regulación de hepcidina por hipoxia (Sonnweber et al. 2014). En este mismo estudio se observó un aumento en otras citoquinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y de proteínas de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB) (Sonnweber et al. 2014).

Introducción

La hipoxia puede inhibir la expresión de hepcidina por una vía independiente de eritropoyetina iniciada por la degradación de C/EBP α , un factor de transcripción crítico requerido para la expresión basal de hepcidina (Anderson et al. 2012). En estados de hipoxia los macrófagos pueden inhibir SMAD y el factor C/EBP α en hepatocitos para reducir la expresión de hepcidina (Chaston et al. 2011).

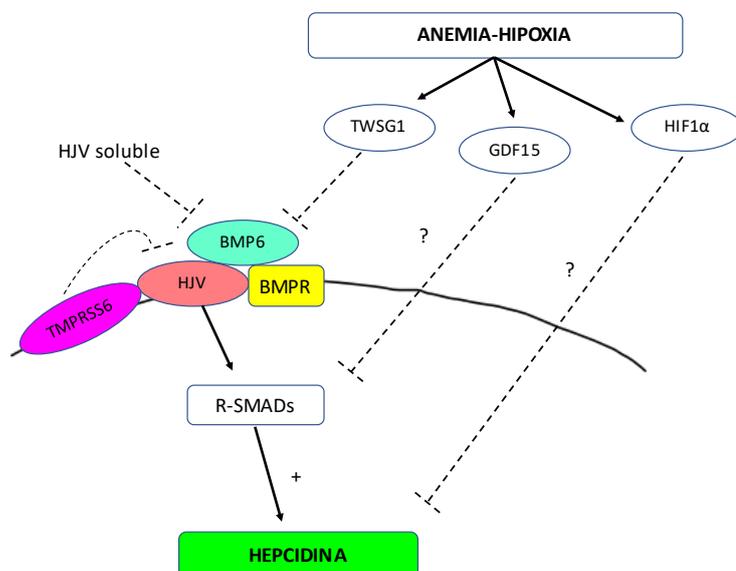


Figura 14. Regulación transcripcional de hepcidina por anemia e hipoxia. Adaptado de Rishi et al. 2015.

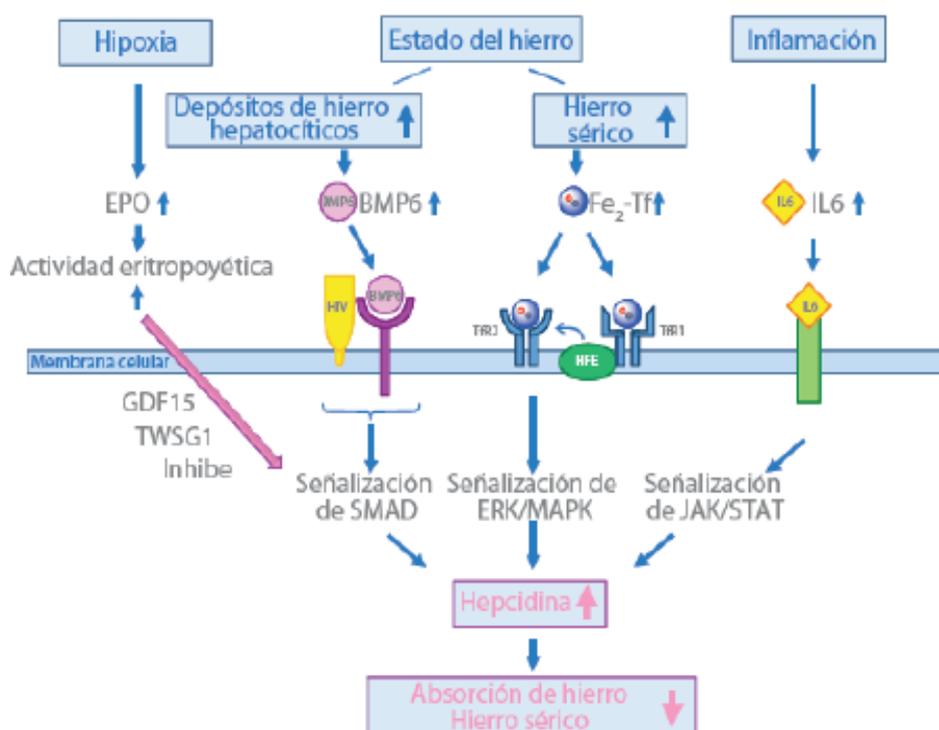


Figura 15. Regulación de la expresión de hepcidina según la disponibilidad sistémica de hierro y el estado inflamatorio e infeccioso. Adaptado de Henze et al. 2010.

2.5 REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

Para mantener la homeostasis de hierro celular es necesario un balance coordinado entre su captación, utilización y depósitos. Esto explica que la expresión de las proteínas clave involucradas en el metabolismo del hierro sea controlada de manera post-transcripcional por los niveles intracelulares del biometal. Este mecanismo de regulación es mediado por interacciones específicas entre secuencias de elementos de respuesta al hierro (IRE) localizados en el ARNm y proteínas regulatorias citoplasmáticas (IRP).

Las IRE son secuencias de nucleótidos filogenéticamente conservadas, que están compuestas por 28 bases que forman una estructura secundaria en forma de horquilla que les permite interactuar con las IRP (Hentze y Kuhn 1996). Las secuencias IRE se localizan en las regiones no codificantes o no traducidas (UTRs) en los extremos 5' o 3' de los ARNm y, dependiendo de la posición, difiere el efecto que ocasiona su interacción con las IRP. Las IRE situadas en la región UTR 5' regulan la unión del mensajero al ribosoma y controlan la iniciación de la traducción mientras que las ubicadas en la región UTR 3', modulan la estabilidad o degradación del ARNm por acción de endorribonucleasas (Perez et al. 2005)

Dos proteínas IRP (IRP1 e IRP2) se han identificado en células de mamíferos y actúan como sensores del contenido celular de hierro.

La IRP1 es una proteína bifuncional que puede actuar como aconitasa citoplasmática o unirse a secuencias IRE (Figura 16). Posee un cluster [4Fe-4S] en su sitio activo y puede convertirse reversiblemente en su forma activa [4Fe-4S] o inactiva [3Fe-4S] en respuesta a modificaciones en la disponibilidad de hierro. Bajo condiciones de depleción del metal, la apoIRP1 puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE. Contrariamente, en estados de exceso de hierro, la IRP1 incorpora un átomo del metal al cluster [4Fe-4S], adoptando una conformación en la cual es incapaz de interactuar con el ARN, pero posee actividad aconitasa (Figura 16) (Kaldy et al. 1999).

Regulación de IRP 1

Control del Fe Celular

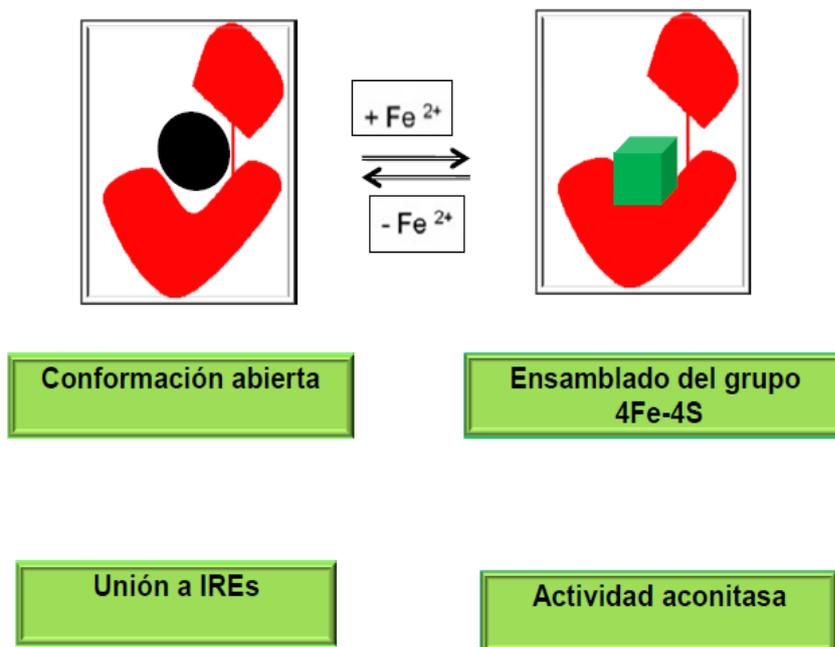


Figura 16. Regulación de IRP1.

La IRP2 posee 62% de homología con la IRP1 pero carece del cluster [4Fe-4S] y no posee actividad aconitasa. Tiene capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE localizadas en los mensajeros. En su región N-terminal contiene una secuencia rica en cisteína que es responsable de la degradación proteasomal cuando los niveles intracelulares de hierro son altos (Iwai et al. 1995). La síntesis de las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro es regulada a través de la interacción IRE-IRP (Perez et al. 2005).

Uno de los ARNm más estudiado es el de RTf1 que contiene en su UTR 3' cinco secuencias IRE altamente conservadas, permitiendo la unión de proteínas de respuesta al hierro (IRP) en estados de deficiencia de hierro estabilizando el ARNm y causando el aumento de la expresión de RTf1 (Figura 18). En estados de exceso de hierro las IRPs son inactivadas o degradadas y la síntesis de RTf1 disminuye (Mackenzie et al. 2008). En este caso, la interacción IRE-IRP protege al mensajero de la degradación, permitiendo su traducción y la síntesis del receptor (Casey et al. 1988). Ferritina posee una única región IRE en el 5'UTR de su ARNm y en este caso la interacción IRE-IRP bloquea la traducción (Leibold y Munro 1988).

La isoforma IRE de DMT1 es regulada postranscripcionalmente por la presencia de la secuencia 3' IRE localizado sobre todo en intestino en donde su expresión aumenta en estados de deficiencia

Introducción

de hierro (Hubert y Henze 2002). Esto sucede dado que, en estados de deficiencia de hierro, el objetivo de la célula es aumentar la captación del metal y disminuir su utilización o depósitos. Las IRP activas se unen a las secuencias IRE, aumentando la síntesis de RTf1 y DMT1 mientras que disminuyen la de ferritina. Inversamente, cuando los niveles de hierro son altos, el metal es utilizado o depositado y su incorporación debe ser disminuida. Las IRP se disocian de las IRE y, como consecuencia, el ARNm del RTf1 y DMT1 es degradado y la síntesis de ferritina aumenta (Perez et al. 2005).

Una de las dos formas de FPN contiene un IRE en la región 5', de esta forma cuando los niveles de hierro disminuyen IRP1/2 se unen al segmento IRE bloqueando la síntesis de FPN. Este mecanismo previene la depleción celular de hierro (Ganz y Nemeth 2012). Cuando el nivel intracelular de hierro aumenta como ocurre luego de la eritrofagocitosis y la degradación del grupo hemo en los macrófagos del sistema reticuloendotelial aumenta la traducción de ferroportina para exportar el hierro reciclado (Ganz y nemeth 2012).

Zhang et al. (2009) identificaron una variante de corte alternativo que carece de región IRE en 5' y se expresa fundamentalmente en células de la mucosa intestinal y en eritroblastos sugiriendo que este transcripto podría permitir el transporte de hierro y no ser regulado de manera postranscripcional por el hierro citosólico. Esta variante de corte alternativo que carece de la región 5'IRE es un componente minoritario de la totalidad del ARNm de FPN en la mayoría de los tejidos sin embargo representa un 25% del total de FPN en duodeno y un 40% en médula ósea (Ganz y Nemeth 2012).

Introducción

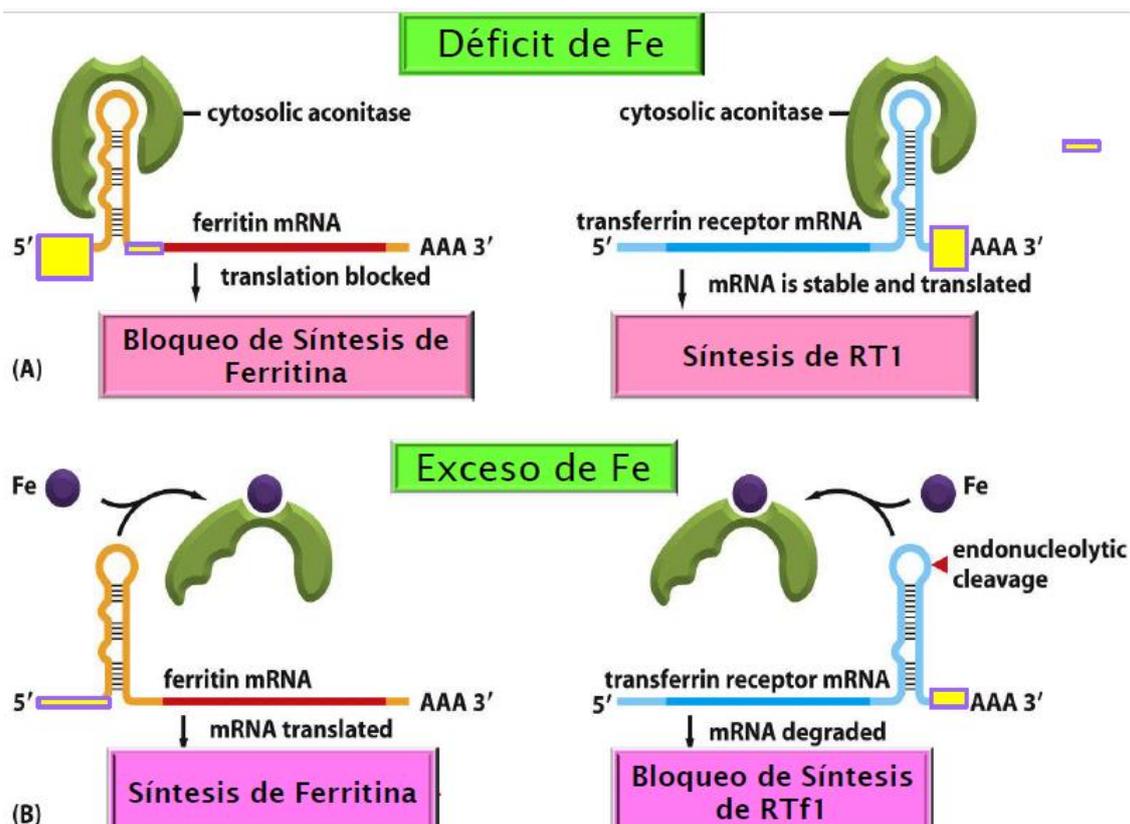


Figura 17. Regulación postranscripcional de las proteínas del ciclo del hierro por el sistema IRE-IRP.

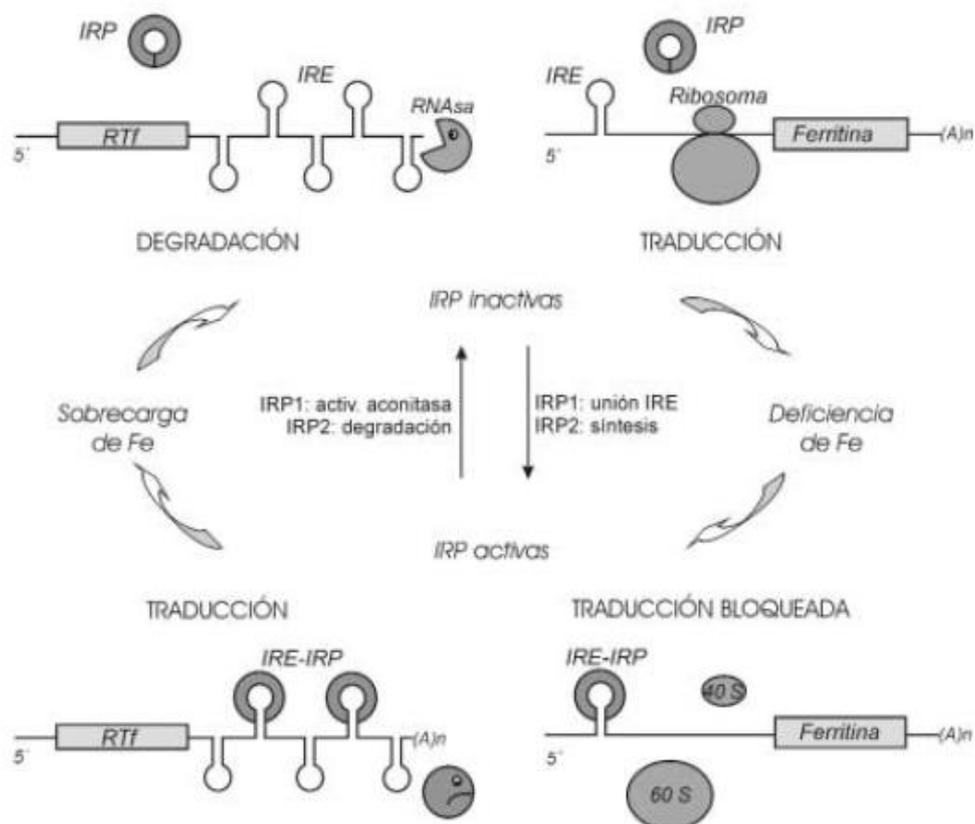


Figura 18. Regulación postranscripcional de las proteínas del ciclo del hierro por el sistema IRE-IRP. Pérez et al. 2005

3. ERITROPOYETINA

3.1 ESTRUCTURA MOLECULAR

Eritropoyetina es una glicoproteína de 30,4 kDa, en los humanos el gen de EPO se localiza en el cromosoma 7 y codifica para una cadena polipeptídica de 193 aminoácidos (Sasaki et al. 2000, Maiese et al. 2005). La proteína madura está conformada por 165 aminoácidos (Figura 19).

Una modificación post-traducciona genera un corte de 27 aminoácidos terminales y la acción de una carboxipeptidasa provoca la pérdida de la arginina C-terminal (residuo 166). A partir de estas dos modificaciones se obtiene una proteína de 165 aminoácidos que contiene dos puentes disulfuro, los cuales unen residuos de cisteína en posiciones 7-161 y 29-33. Cuatro cadenas de hidratos de carbono tres residuos N-glicosídicos unidos a N-asparaginas (residuos 24, 38 y 83) y un residuo O-glicosídico unido a O-serina (residuo 126) constituyen, aproximadamente, 40% de la masa molecular (Wen et al. 1994). Las cadenas laterales están formadas por los monosacáridos manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico o siálico.

El grado de glicosilación influye en diversos procesos biológicos, tales como reconocimiento celular, actividad, vida media y, además, favorece la solubilidad, minimiza la agregación y protege a la proteína de la degradación por radicales libres (Banks 2011).

La hormona activa de 165 aminoácidos tiene una masa molecular de, aproximadamente, 34 kDa si esta glicosilada y 18,4 kDa si se excluyen los hidratos de carbono. Ésta hormona fue purificada de orina humana de pacientes anémicos en 1977 por Miyake et al. (1977) y su gen fue clonado ocho años más tarde (Jacobs et al. 1985), estos descubrimientos permitieron a la industria farmacéutica la obtención de la eritropoyetina recombinante (rHuEPO) para el uso terapéutico en pacientes anémicos.

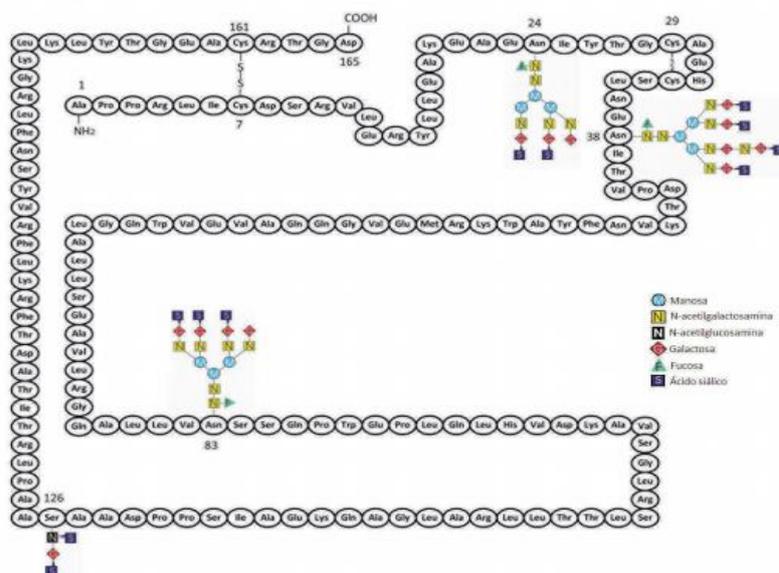


Figura 19. Estructura de la Eritropoyetina. Wen et al. 1994

3.2 ORIGEN Y FUNCIÓN

Eritropoyetina (EPO) es el regulador principal de la eritropoyesis promoviendo la supervivencia, proliferación y maduración de los progenitores eritroides, regulando los estadios tardíos de maduración de las células progenitoras eritroides. En médula ósea el principal sitio de unión de EPO son las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) estimulándolas a proliferar y madurar de normoblastos a reticulocitos y a eritrocitos maduros (Figura 20) (Gregory y Eaves 1978; Lombardero et al. 2011).

EPO es una hormona hematopoyética sintetizada fundamentalmente por el tejido renal, aunque en la vida fetal también es sintetizada por hepatocitos y las células de Ito (Maxwell et al. 1994). Las células peritubulares renales la producen en respuesta a la hipoxia para aumentar la masa eritroide y de esta forma suplir las demandas de oxígeno. En este sentido Obara et al. (2008) identificaron a las células de los capilares peritubulares como las células productoras de EPO y observaron que presentan una arborización similar a las neuronas con proyecciones multidireccionales. Koury et al. (1989) estimaron que entre el 20 y el 30% de las células intersticiales de la corteza interna son productoras de EPO mientras que en la corteza subcapsular menos del 10% son productoras de EPO.

La expresión de EPO está estrictamente regulada por el desarrollo, de manera fisiológica y por mecanismos celulares para mantener la homeostasis de los glóbulos rojos. Durante la embriogénesis el hígado es el mayor sitio de síntesis de la eritropoyetina. En condiciones extremas de hipoxia o anemia puede reactivarse su síntesis hepática (Kapitsinou et al. 2010; Haase 2013). Se estima que en condiciones normales alrededor del 10% de la EPO circulante es de origen extrarenal.

Sin embargo, se desconoce si la producción de esta citoquina por otros tejidos será suficiente para suplir las necesidades en estados de daño renal (Vittori et al. 2021). Esta citoquina se ha encontrado expresada en tejidos como bazo, pulmón, testículos, y endotelio (Anagnostou et al. 1990; Digicaylioglu et al. 1995; Marti et al. 1996).

EPO presenta nuevas funciones fisiológicas en cerebro. Las células neuronales expresan el receptor de EPO (EPO-R) y también se ha descrito que los astrocitos son productores de EPO (Masuda et al. 1993; Morishita et al. 1997; Marti et al. 1996).

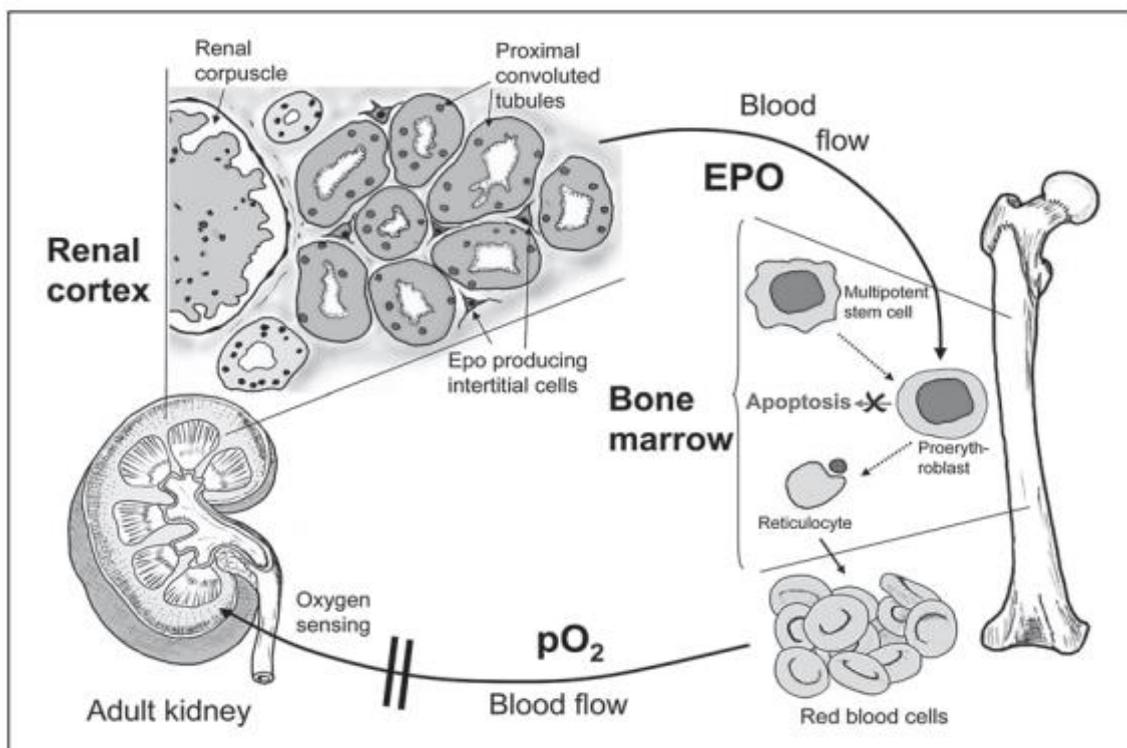


Figura 20. Regulación de la eritropoyesis mediada por EPO. Lombardero et al. 2011

EPO y su receptor EPO-R, se expresan en muchos tejidos y exhibe diferentes efectos en células no hematopoyéticas. Se ha observado una potente actividad neuroprotectora de esta citoquina (Wang et al. 2004, Pregi et al. 2006). También, se han descrito efectos cardioprotectores de EPO frente a la isquemia (Gao et al. 2007). Además, se han observado efectos anti apoptóticos, antiinflamatorios, angiogénesis, neurogénesis y regulación de la respuesta inmune (Figura 21) (Lombardero et al. 2011).

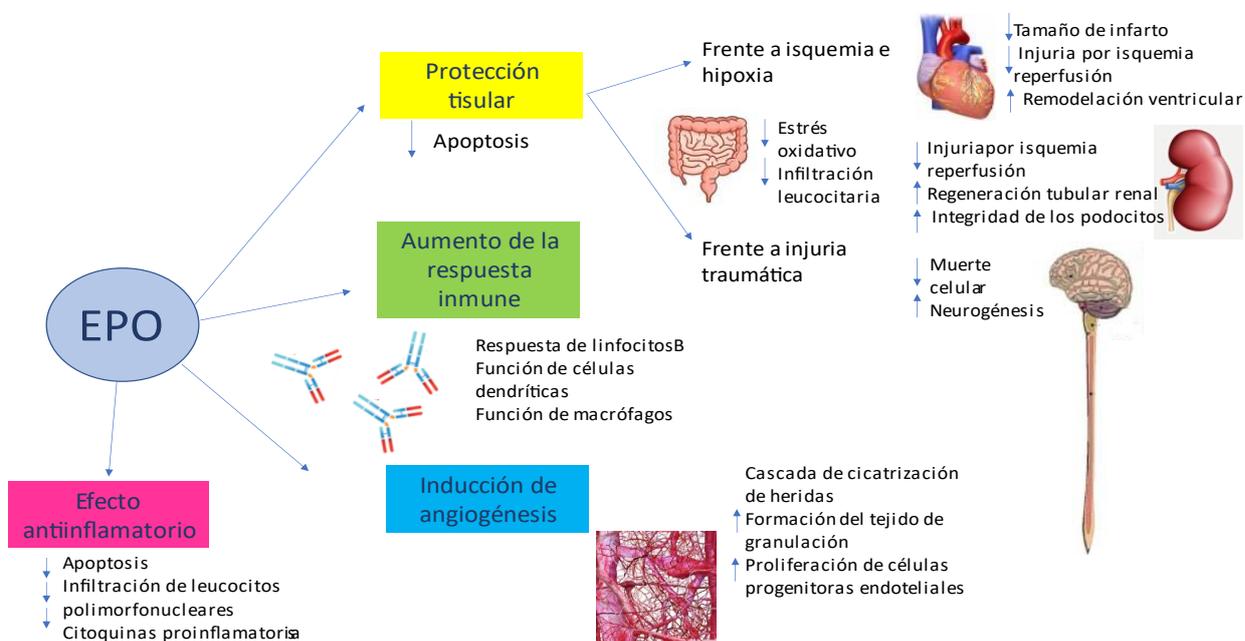


Figura 21. Funciones no eritropoyéticas mediadas por EPO. Lombardero et al. 2011

3.3 MECANISMO DE ACCIÓN

Para llevar a cabo su función EPO se une a diversos receptores, los conocidos hasta el momento son el receptor clásico homodimérico (EPOR₂), el receptor de EPO-β común heterodímero y el receptor transmembrana Ephrin tipo B4 (EphB4) (Figura 22).

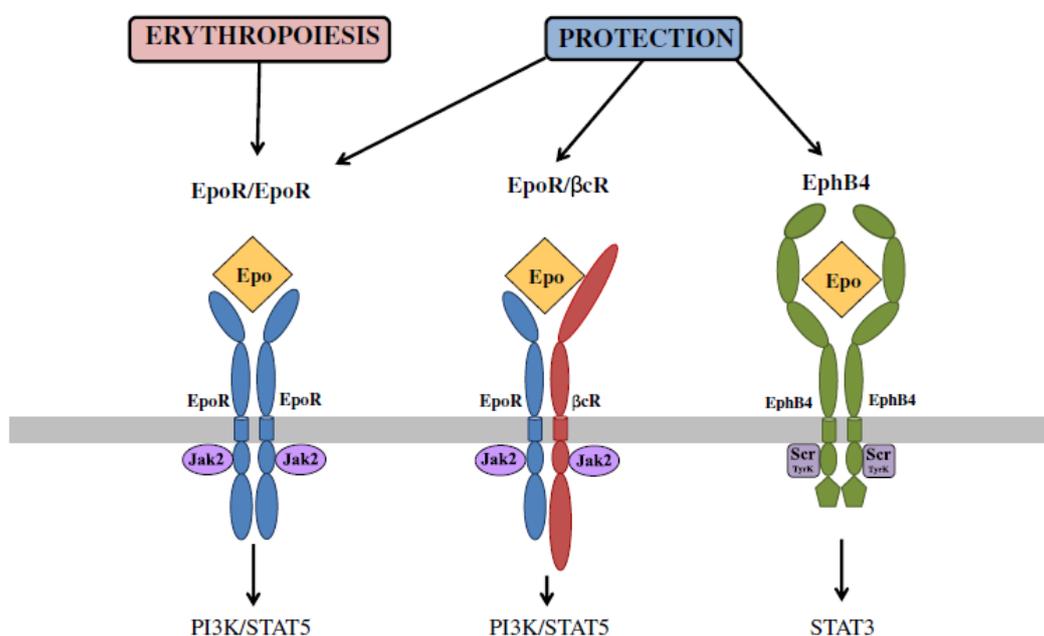


Figura 22. Receptores de eritropoyetina. Vittori et al. 2021

Cada molécula de EPO se une a dos receptores adyacentes de EPO (EPOR) también conocido como p66 que consiste en un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, y activan una cascada de señalización intracelular cuyo mensaje deriva en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores eritroides (Lappin 2003).

Además, existe una isoforma soluble del receptor clásico de EPO, que carece de la porción transmembrana y citoplasmática por splicing alternativo; de esta manera el receptor soluble de EPO regula negativamente la unión de EPO al EPOR y ha sido detectada en cerebro de ratón. En contraste con el EPOR este receptor soluble es regulado negativamente por hipoxia (Soliz et al. 2007).

La dimerización resultante del EPOR activa a un receptor asociado a tirosina kinasa (Jak2) por transfosforilación.

En consecuencia, los 8 residuos tirosina del EPOR son fosforilados y activan a STAT5, que de esta forma trasloca al núcleo. Por este mecanismo reconoce una secuencia específica en el promotor de los genes blanco y así comienza la transcripción de los genes eritroides (Figura 23).

Introducción

La activación del EPOR por la unión de EPO, que es esencial para poner de manifiesto su función hematopoyética y antiapoptótica, es transitoria ya que las fosfatasas desfosforilan a Jak2 e inactivan al EPOR (Yoshimura y Arai 1996; Rossert y Eckardt 2005).

Mecanismos como la internalización y degradación del EPOR mediada por proteosoma, así como la finalización de señales intracelulares por la activación de fosfatasas, contribuyen a modular la respuesta de EPO. Wenker et al. (2010) demostraron que podría estar involucrada en la regulación mediada por EPO la vía reguladora de fosfatidil inositol trifosfato (PI3K) /Akt.

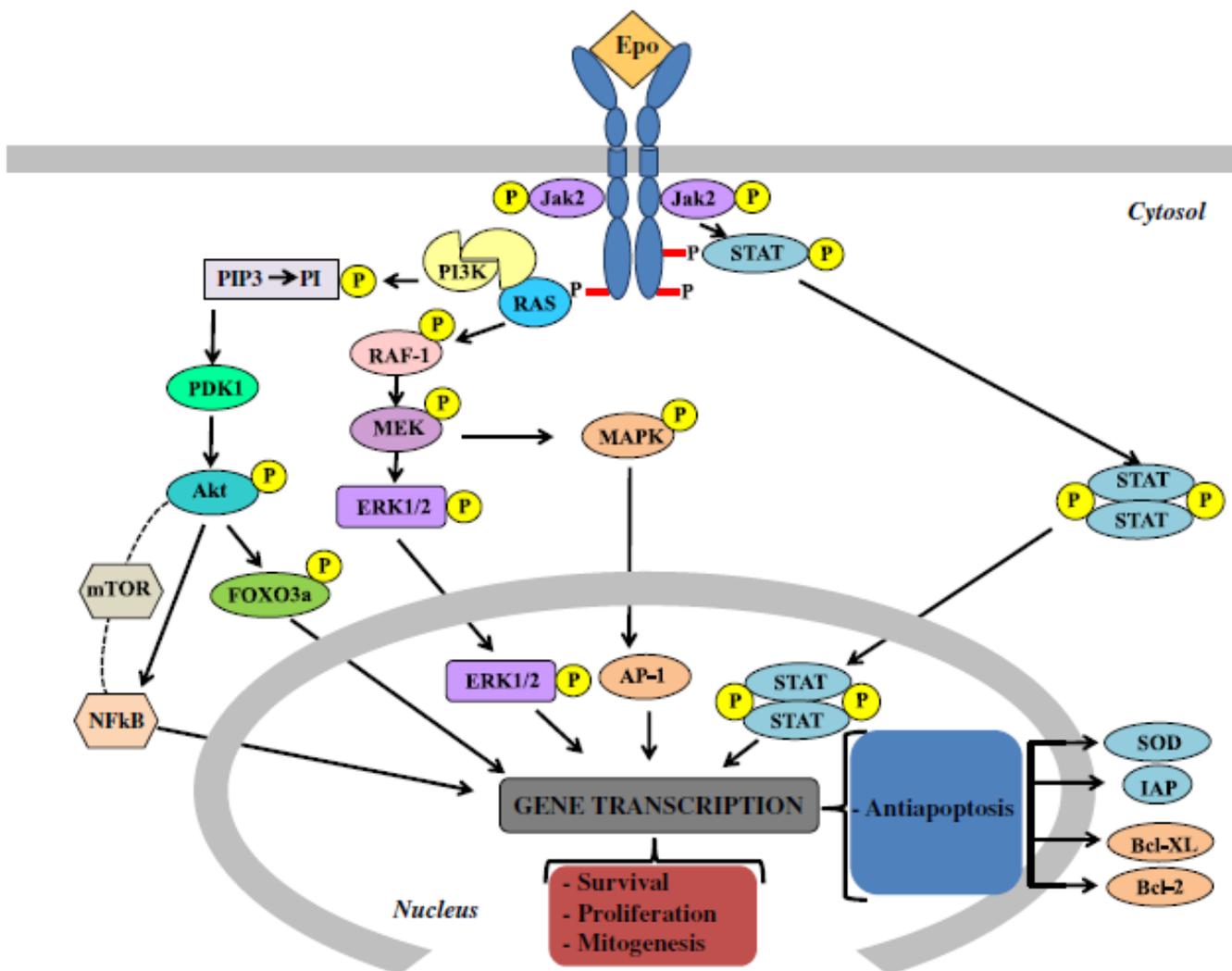


Figura 23. Vías de señalización de Eritropoyetina. Vittori et al. 2021

Se ha reportado que además de células eritroides medulares, otros tejidos también expresan el EPOR como neuronas, páncreas, riñón, hígado, pulmón y corazón, aunque su función no es

totalmente conocida en estos órganos (Anagnostou et al 1994; Masuda et al. 1993; Fenjves et al. 2003).

En tejidos no eritroides la unión de EPO es mediada por un receptor de EPO heterodímero (monómero del EPOR y una subunidad citoquina β común (CD131)) que pertenece a la subfamilia compartida por receptores para GM-CSF, IL-3 e IL-5 (Leist et al. 2004). Debido a su participación en la protección endógena frente a la inflamación e injuria tisular algunos autores hacen referencia a este receptor EpoR/ β cR como el receptor de la reparación innata (IRR) (Heij et al. 2012).

El receptor de EPO EphB4 media la vía de señalización inducida por EPO vía STAT3 y promueve el crecimiento tumoral y su progresión (Pradeep et al. 2015). Por otro lado, también se ha reportado que la señalización de Ephrin/Eph induce la formación de sinapsis, así como también la neurogénesis favoreciendo la generación de la memoria (Ashton et al. 2012; Dines et al. 2015).

En los últimos años se le han atribuido otras propiedades a esta citoquina como sus características antiapoptóticas en células neuronales frente a diferentes agentes tóxicos (Pregi et al. 2006; Wenker et al. 2010) y también su efecto cardioprotector entre otros.

EPO, hormona protectora con función pleiotrópica, podría prevenir la apoptosis celular en estados de deficiencia de oxígeno o en exposiciones a agentes tóxicos o a ROS (Maiese et al. 2008).

A partir de estos antecedentes nos planteamos evaluar la función protectora de EPO en células neuronales y en diferentes tejidos frente a estados de desbalance de hierro estudiando la toxicidad ocasionada por exceso de hierro sobre la expresión de las proteínas clave del ciclo del hierro.

3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ERITROPOYETINA

Las células productoras de EPO responden a la disminución de la presión parcial de oxígeno sensada por los factores inducibles por hipoxia (HIFs). Existen 3 homólogos de HIF, (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) que forman dímeros con HIF-1 β (Kaelin and Ratcliffe, 2008). EPO responde a HIF-2 α que contiene un elemento de respuesta al hierro en la región 5'UTR y se ha observado que limitaría su expresión durante la deficiencia de hierro (Rankin et al. 2007, Sanchez et al. 2007).

En condiciones fisiológicas con niveles normales de oxígeno HIF- α se expresa de forma constitutiva y es hidroxilado en residuos prolyl por las prolyl hidroxilasas (PHD), generando un sitio de unión para la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), un componente del complejo ubiquitina-ligasa (Figura 23). Por lo tanto, mientras exista oxígeno disponible, HIF- α es poliubiquitinado y sujeto a la degradación proteosomal.

Introducción

De forma contraria en situaciones de hipoxia, pVHL no puede unirse a HIF- α quien se acumula y heterodimeriza con un miembro de la familia de HIF- β y trasloca al núcleo. Allí recluta al coactivador p300 formando un complejo que se une a elementos de respuesta a la hipoxia (HREs). Este complejo transcripcional activa entre 100 y 200 genes incluyendo los involucrados en la eritropoyesis, angiogénesis y autofagia (Kaelin y Ratcliffe 2008) (Figura 24).

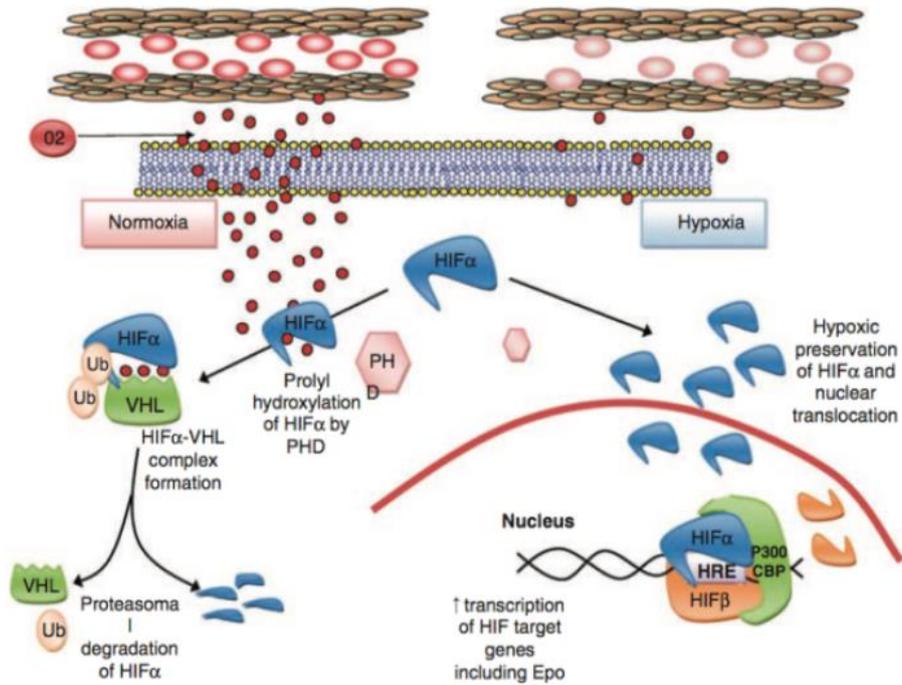


Figura 24. Síntesis de EPO. Patnaik y Tefferi (2009)

Materiales
Y
Métodos

1.MODELO ANIMAL

1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El ratón (*Mus musculus*) de laboratorio es el modelo biológico de excelencia utilizado en estudios científicos dado que el humano y el ratón comparten el 99% de su genoma (30.000 genes); siendo el 1% restante (300 genes) propios de cada especie (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002). El ratón es utilizado para estudiar enfermedades que afectan a humanos desde el nivel celular hasta su manifestación clínica.

1.1.1 CEPA ANIMAL

En este trabajo se utilizaron ratones hembras de 3 meses de edad de la cepa CF1, con un peso de 30 ± 5 gr, criados y mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional del Sur.

Para fundar una cepa se necesitan por lo menos veinte generaciones de apareamientos entre hermanos. Este proceso conduce a la pérdida de variabilidad genética, a coeficientes de endocría prácticamente iguales a uno y estabilidad fenotípica (Oyarzabal 2011).

1.1.2 PRINCIPIO DE LAS TRES R: NÚMERO DE ANIMALES A UTILIZAR

Con el fin de seguir el principio de las tres R de la experimentación humanizada con los animales, propuesta por William Russell y Rex Burch (1959): Reducir, Reemplazar y Refinar el uso de animales de experimentación el número de animales a utilizar se determinó mediante el cálculo del mínimo número necesario utilizando el método de la ecuación recursiva propuesto calculando el E residual (X)

$$X = N - T - B + 1$$

$$X = (5 * 4) - 4 - 5 + 1$$

$$X = 12$$

En donde N es el número total de observaciones; T es el número de tratamientos; B es el número de bloques; X es el E residual. El E residual se debe encontrar entre 10 y 20 (Festing 2006).

Concluimos que utilizando 20 ratones en el modelo experimental (5 ratones por grupo), el error residual del experimento se encuentra entre 10 y 20. Por lo tanto, 20 es el mínimo número de ratones a utilizar para obtener resultados con relevancia estadística.

1.1.3 CONDICIONES DE BIENESTAR ANIMAL

Los animales fueron obtenidos, criados y mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional del Sur durante toda la experiencia hasta el sacrificio. Los animales fueron distribuidos de a 4 ratones por jaula, uno de cada condición y diferenciados con marcas de ácido pícrico en el pelaje según el siguiente código:

Sin marca: Control

Una marca: Sobrecarga de Hierro

Dos marcas: EPO

Tres marcas: Sobrecarga de Hierro + EPO

Las marcas fueron reforzadas cada dos días.

Las cinco (5) jaulas se distribuyeron en el mismo estante para que todos los animales tengan la misma exposición a la luz y las mismas condiciones ambientales. La temperatura ideal debe mantener la termoneutralidad animal y no alcanzar temperaturas extremas, para roedores se mantuvo controlada entre 20 a 26°C y la humedad relativa entre 35 y 70 % (López Gómez 2005).

Las habitaciones tuvieron un ciclo artificial de doce horas de iluminación y doce horas de oscuridad, siempre en el mismo horario.

Todos los animales tuvieron acceso libre al agua y a la comida “*ad libitum*” de acuerdo a las condiciones de la guía de Cuidado y Uso de animales de laboratorio del NIH (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1976). Los ratones se alimentaron con una dieta estándar de mantenimiento y calidad certificada (Ganave ratas y ratones, Alimentos Pilar SA, Argentina) que contiene cantidades normales de hierro, 270 ppm.

Las jaulas utilizadas fueron jaulas de plástico de policarbonato, claro y autoclavable, con piso y paredes sólidas y la cama (viruta de madera absorbente irradiada) se removió cada 24 horas observando el estado de los animales.

1.1.4 APROBACIÓN ÉTICA

Previo a dar inicio al estudio y desarrollo del modelo animal, el protocolo experimental de trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Sur (Resolución CDBByF número 397/18 número de protocolo 133/2018). Los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y

Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1976).

1.2 DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL

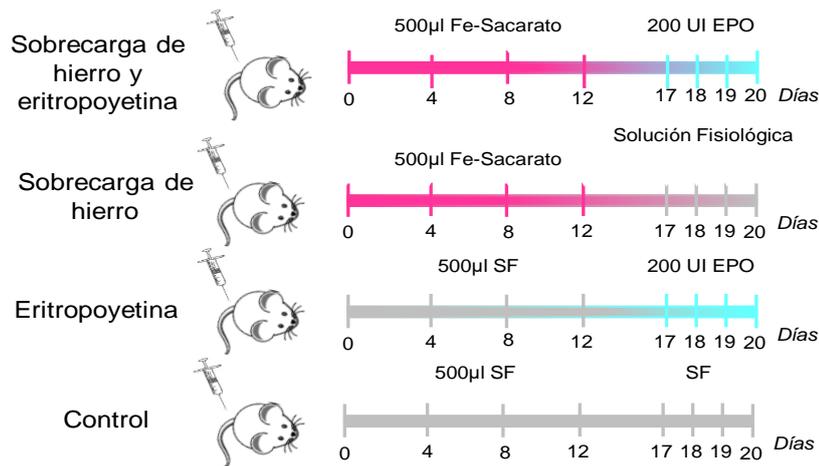
1.2.1 TRATAMIENTO

El modelo animal que desarrollamos fue de sobrecarga de hierro inducido con inyecciones intraperitoneales de hierro sacarato (hierro coloidal) de acuerdo a estudios previos en nuestro laboratorio (Giorgi y Roque 2014).

Luego de establecida la sobrecarga se estimuló la eritropoyesis con inyecciones de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) para observar su efecto sobre el exceso de hierro y su acción sobre las proteínas del ciclo del hierro.

Los ratones fueron divididos en 4 grupos de acuerdo a su peso.

- Grupo Control: recibió dosis ip. de solución fisiológica,
- Grupo Sobrecarga de Hierro: recibió dosis ip. de 500 µL de hierro sacarato en una dosis de 466 mg/kg de peso los días 0, 4, 8 y 12 de la experiencia,
- Grupo EPO: recibió dosis ip. de EPO los días 17, 18 y 19 de la experiencia en una dosis total de 20000 UI/Kg de peso distribuidas en 3 inyecciones de 200 UI por inyección en 140 µL de acuerdo a bibliografía consultada (Pak et al 2006),
- Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO: recibió ambos tratamientos como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Tratamientos con hierro sacarato y eritropoyetina en el modelo animal.

1.2.2 VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO

Para administrar el tratamiento (Fe sacarato, EPO y/o solución fisiológica) se utilizaron jeringas y agujas de calibre 25 –27 G ½ a 1 pulgada, de bisel pequeño.

El ratón se sujetó con una mano inmovilizando la pata izquierda, con una inclinación craneal desplazando las vísceras. Posteriormente se insertó la aguja en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen, luego se llevó hacia arriba en dirección craneal para introducirla en la cavidad peritoneal, levantando la aguja en contra de la pared abdominal paralela a la columna vertebral para evitar lesiones en el intestino (Figura 1).

Una rápida administración del fluido puede causar daños en el tejido y hemorragia debido a la presión interna (Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud LIMA, 2008).



Figura 1. Vía de administración de sustancias intraperitoneal.
Imagen obtenida por la cátedra de Fisiología Humana, UNS año 2016.

1.2.3 SEGUIMIENTO Y CONTROL

Los animales fueron distribuidos en cinco (5) jaulas de acuerdo al peso (30 ± 5 gr), los mismos fueron supervisados a diario evaluando su comportamiento individual y grupal.

1.2.4 VÍA DE EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

La extracción sanguínea se realizó del plexo submandibular, dado que este método de extracción es rápido y no produce estrés, pánico ni discomfort en el animal y puede ser realizado sin anestesia y es menos agresiva que la técnica en desuso de punción retroorbital (Fernández et al. 2010). Para ello el ratón se sujeta firmemente alineando su cabeza con el cuerpo, y se comprimen ligeramente los vasos del cuello del lado opuesto al de la punción. Posteriormente se localiza el sitio de punción, una pequeña zona circular desprovista de pelo ubicada en el centro de la mandíbula inferior. Se inclina dorsalmente 1-2 mm la aguja de 21 G, siendo la profundidad óptima de punción de 2-3 mm. La gota de sangre que emana se recoge en un eppendorf con anticoagulante (Figura 2).

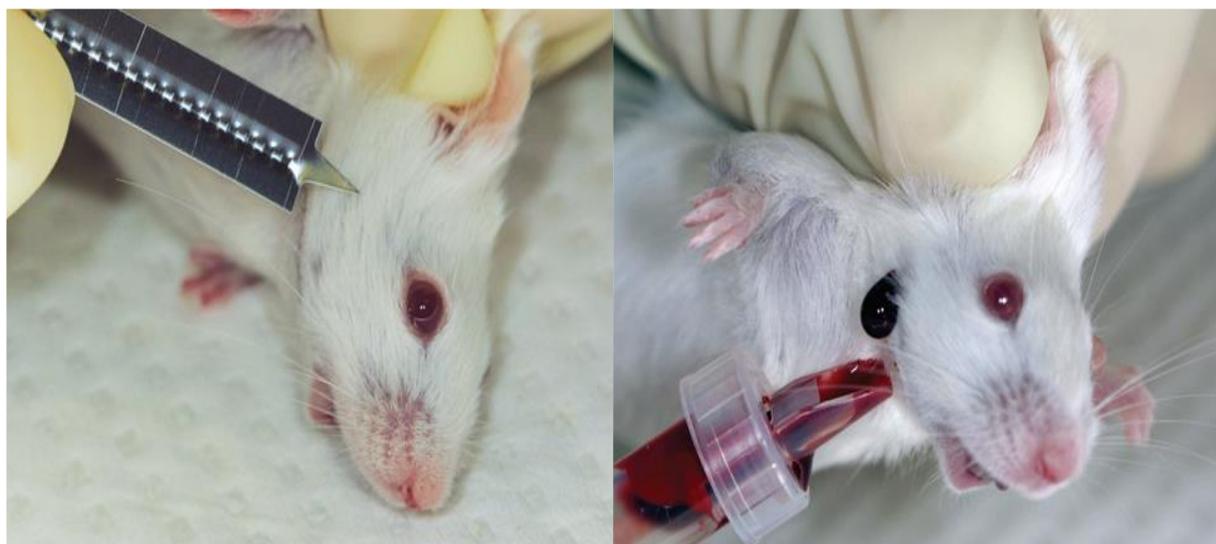


Figura 2. Método de extracción sanguínea del plexo submandibular. (Golde et al. 2005)

1.3 ENSAYOS HEMATOLÓGICOS

Con las muestras de sangre de ratón se procedió a realizar los estudios hematológicos correspondientes.

1.3.1 FÓRMULA LEUCOCITARIA

Para realizar la fórmula se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos y se obtuvo el extendido sanguíneo que se coloreó con la tinción de May Grünwald-Giemsa utilizando colorante de May Grünwald durante 3 minutos al que se le agregó luego un estabilizador a pH 7,2 durante 1 minuto para que el colorante precipite y coloree estructuras ácidas. Posteriormente a un lavado con agua corriente se incubó con el colorante Giemsa al 10% en estabilizador durante 12 minutos que coloreó estructuras básicas. Con el microscopio óptico con aumento de 1000X se diferencian los glóbulos blancos en polimorfonucleares y mononucleares hasta contar 100 células totales.

La fórmula leucocitaria relativa de referencia para el ratón es de polimorfonucleares 15-25% y 75-85% de mononucleares. También se observó la forma y coloración de la serie eritrocitaria.

1.3.2 HEMOGLOBINA

Se utilizó el método colorimétrico de la cianometahemoglobina que consiste en incubar la muestra de sangre con el reactivo de Drabkin (Wiener kit Argentina) que contiene un surfactante para lisar

los glóbulos rojos, ferrocianuro de potasio que oxida el hierro ferroso de la hemoglobina a hierro férrico para transformarla en metahemoglobina y ferrocianuro férrico que convierte la metahemoglobina a cianometahemoglobina, un compuesto coloreado a pH 7,2. Posteriormente, se midió la absorbancia a 560 nM.

La determinación se realizó por duplicado para cada ratón. Para calcular la concentración de hemoglobina se tiene en cuenta la absorbancia obtenida de un testigo provisto por el kit de concentración conocida. Intervalo de referencia en ratón: 13,0 – 15,0 g/dL.

1.3.3 HEMATOCRITO

El hematocrito (HCT) se define como la relación entre el volumen de glóbulos rojos y el volumen de sangre total. Se expresa como porcentaje o como fracción decimal. Para la determinación del hematocrito se realizó el método del microhematocrito que utiliza volúmenes pequeños de sangre y permite valorar el hematocrito de forma directa.

La sangre se colocó en capilares heparinizados, dos por ratón, que se cargan por capilaridad hasta las $\frac{3}{4}$ partes de su longitud, uno de sus extremos se obturó con plastilina y posteriormente se centrifugaron en microcentrífuga 5 minutos a 2000 g. Finalmente el valor del hematocrito se determinó mediante el uso de un ábaco o midiendo con regla la columna de glóbulos rojos y la columna de sangre total, expresando el resultado en %. Intervalo de referencia en ratón: 42-50 %.

1.3.4 HIERRO PLASMÁTICO

El hierro circula unido a la proteína de transporte Transferrina donde sólo el 30% se halla saturada con hierro en estados de adecuado hierro (Pérez et al. 2005). En estados de exceso del biometal el 70 % restante puede captar el exceso de hierro libre evitando su toxicidad, dado que libre es altamente tóxico para las células. Cuando la capacidad de saturación de la Tf es superada en estados de sobrecarga de hierro, el biometal puede unirse a ligandos como el citrato, formando el hierro no unido a Tf (NTBI) (Pérez et al. 2005).

Para su cuantificación el hierro se debe separar de la transferrina que lo transporta y posteriormente reducirse a hierro en estado ferroso. Esto se logra mediante la utilización de ácido ascórbico y ácido cítrico presentes en el kit comercial. Sin embargo, en estados de exceso la transferrina se satura y se cuantifica el hierro unido y no unido a transferrina.

La sangre se centrifugó en capilares heparinizados para separar el plasma y cuantificar el contenido de hierro circulante que se encuentra unido a la proteína de transporte transferrina. Para esta determinación se utilizó un kit comercial, FerColor kit Wiener lab, 200 μ L de plasma se incubaron con 1 mL de reactivo A que contiene ácido cítrico para separar el hierro unido a la transferrina y ácido ascórbico que reduce el hierro en estado férrico a hierro ferroso, posteriormente se midió la absorbancia a 560 nM, y luego se agregaron 200 μ L de reactivo B, reactivo de color ferene, para formar un compuesto coloreado cuya absorbancia se lee a 560 nM, y es estable durante 30 minutos. La determinación se realizó por duplicado para cada muestra sanguínea. La absorbancia leída es directamente proporcional a la cantidad de hierro presente en la muestra.

1.3.5 RECUENTO DE RETICULOCITOS

El recuento reticulocitario se realizó a partir de las muestras sanguíneas incubando volúmenes iguales de sangre entera anticoagulada y colorante supravital azul brillante de cresilo, que precipita el ARN polirribosomal presente en el citoplasma de los reticulocitos, mientras que los eritrocitos maduros se tiñen de color verdoso. Los restos de ARN se observan como un precipitado azul reticular. Pueden observarse diferentes grados de abundancia y tamaño del precipitado dependiendo del grado de maduración del reticulocito. La mezcla se incubó durante 30 minutos y luego se realizaron extendidos sobre portaobjetos.

Los reticulocitos se visualizaron en microscopio óptico con aumento de 1000X y se contabilizaron 1000 células totales entre glóbulos rojos maduros y reticulocitos en campos elegidos al azar. El intervalo de referencia de ratón es de 0-4%.

1.4 SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS

1.4.1 MÉTODO DE SACRIFICIO

El día 20 de la experiencia, luego de evaluar el comportamiento animal, los ratones fueron sacrificados posteriormente a la extracción sanguínea.

El método de eutanasia elegido fue el de dislocación cervical ya que origina menos sufrimiento animal y es rápido. Para ello se sujeta y se agarra la base de la cola del animal; de una sola vez, de forma rápida y con decisión se sujeta la base del cráneo con una varilla para que se separen las vértebras cervicales del cerebro conduciendo a la muerte animal.

Para corroborar la muerte del animal se verifica la ausencia de ventilación pulmonar, latido cardíaco, ausencia de reflejos, midriasis, cianosis de las mucosas y pérdida del control de esfínteres.

1.4.2 EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS

Rápidamente luego del sacrificio animal se realizó la necropsia y obtención de tejidos. Cada ratón se colocó en posición decúbito dorsal sobre una plancha de telgopor, sujetándolo por sus extremidades con agujas.

Se descontaminó la zona a realizar la incisión con abundante alcohol y luego, se realizó un corte en la piel en la región abdominal hasta el mentón junto con un segundo y tercer corte para formar una Y invertida desde el primero hacia las extremidades inferiores del animal. Con la cavidad abierta, se ingresó al tejido hepático por una vena de gran calibre y se realizó el lavado hepático con solución fisiológica cortando la vena esplénica para extraer el gran volumen de sangre del hígado y evitar la presencia de glóbulos rojos, hasta que adquirió una coloración parda. Luego se extrajeron los órganos de estudio: hígado, bazo, duodeno, riñón, pulmón, páncreas, corazón y cerebro mediante la apertura del cráneo realizando una incisión sobre la cabeza.

Posteriormente los órganos se fijan en formaldehído para evitar la autólisis y producir la fijación tisular. Los trozos de tejidos destinados a técnicas histológicas se fijaron durante 24 h en formaldehído a 4°C, mientras que los trozos de tejidos para la cuantificación de hierro tisular se colocaron a -20°C.

1.4.2.1 OBTENCIÓN DE REGIONES CEREBRALES

Luego de abrir el cráneo del animal y extraer el cerebro completo se colocó sobre placa de vidrio localizando el bulbo olfatorio y el cerebelo (Figura 3). El cerebro se cortó en 4 regiones con cuchillas de micrótopo siguiendo el Atlas de Histología para ratones de acuerdo a las zonas de interés predominantes en cada región (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition) según las siguientes identificaciones:

Zona 1 (C1): predominancia del estriado

Zona 2 (C2): corteza, hipocampo, hipotálamo y tálamo

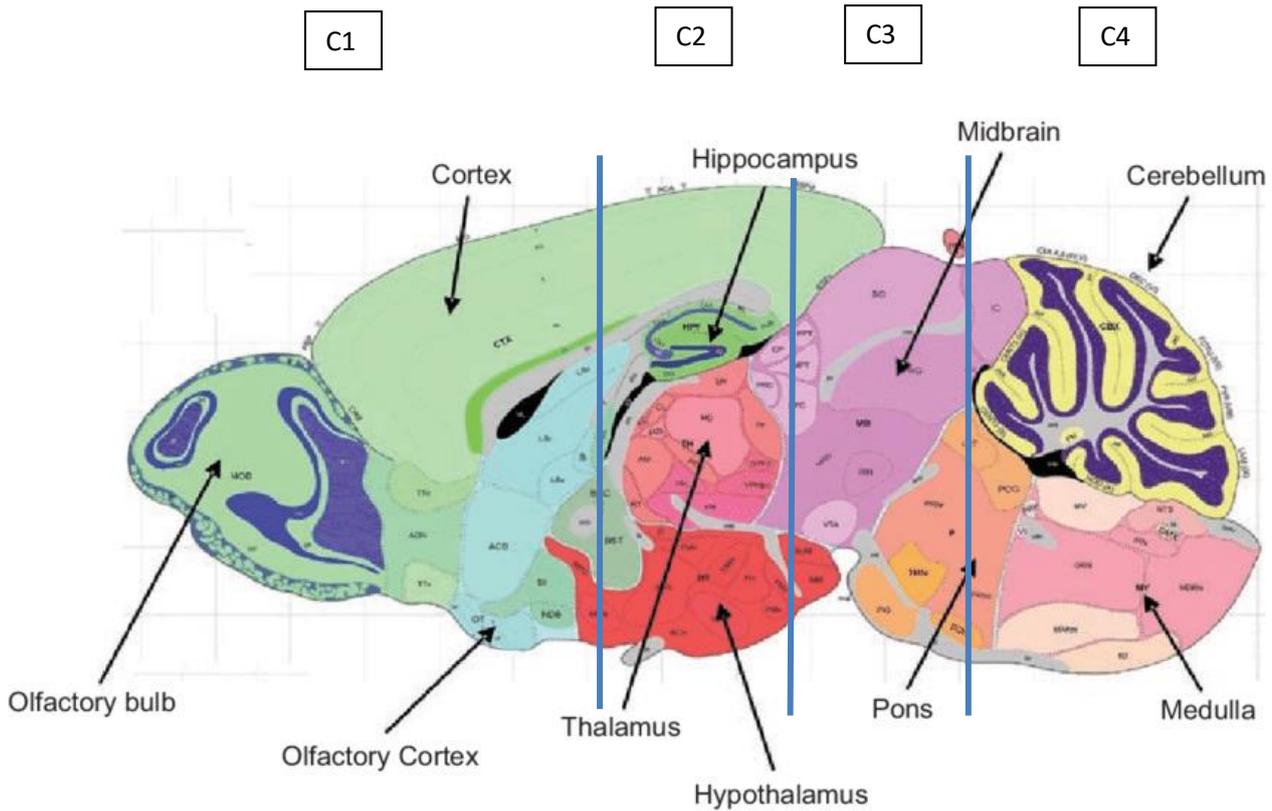
Zona 3 (C3): sustancia negra

Zona 4 (C4): cerebelo y médula espinal



Cerebelo

Figura 3. Cerebro de ratón cepa CF1.
Extraído en el Laboratorio de Fisiología Humana-UNS año 2016.



Esquema 2. Corte de secciones de cerebro. Figure on ResearchGate.

1.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Los tejidos extraídos fueron fijados en formaldehído durante 24 h a 4°C, este fijador es utilizado debido a su rápida penetración, bajo costo, fácil preparación y adecuada conservación de estructuras tisulares e intracitoplasmáticas. El formaldehído reacciona con los aminoácidos básicos formando uniones cruzadas de puentes de metileno. Utilizando este fijador se rompen los enlaces débiles, se forman enlaces covalentes y los átomos de hidrógeno son reemplazados por el fijador. El fijador contiene formalina (formaldehído al 37-40% p/v) y un buffer para mantener el pH de la solución.

Luego de ser fijados, los tejidos fueron embebidos en diferentes solventes para ser deshidratados, aclarados e incluidos en parafina y poder formar los tacos histológicos para ser cortados en micrótopo. El procedimiento se llevó a cabo utilizando un procesador de tejidos Microm STP 120 Thermo scientific.

1.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los tejidos fijados en formaldehído durante 24 h se lavan con agua corriente durante 5 minutos. Luego se colocan en soluciones de alcohol de graduación creciente para producir la deshidratación del tejido y así permitir la penetración de la parafina que es hidrofóbica, dado que el fijador en el que se encontraban es acuoso e impide su penetración, para ello se incuban primero con alcohol 50% durante 30 minutos.

Posteriormente se escurren y pasan a una solución de alcohol 96% durante 2 h, luego a una solución de alcohol 100% durante 1 h, la solución de alcohol 100 fue removida y renovada a los 30 minutos.

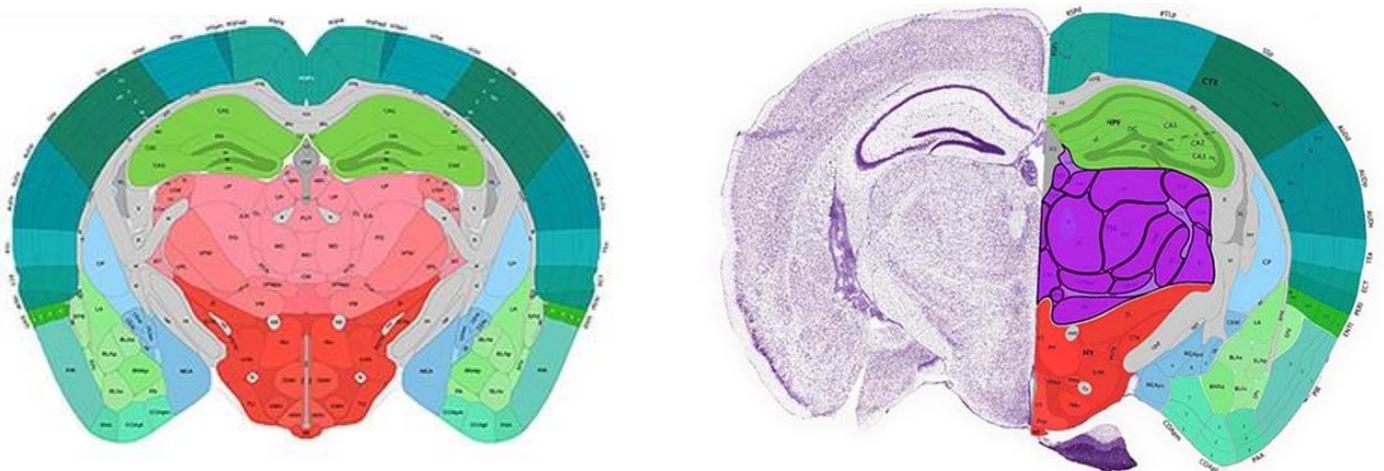
El paso siguiente es la aclaración en tolueno durante 1 hora y finalmente se incluye en parafina durante 2 h para entacar en anillos histológicos.

1.5.2 CORTE EN MICRÓTOMO

Posteriormente a la obtención de los tacos histológicos se procedió al corte en micrótomó rotatorio tipo Minot (Leica), se obtuvieron finas secciones de 0,5 μM de espesor de cada tejido a estudiar para realizar tinciones histológicas y técnicas de inmunohistoquímica. Para cada estudio se cortaron 3 tacos de tejidos de cada condición (3 ratones diferentes).

1.5.3 IDENTIFICACIÓN DE ÁREAS CEREBRALES

Las áreas cerebrales se identificaron al microscopio óptico en cada sección siguiendo el atlas de histología para ratones (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition*) utilizando la tinción de hematoxilina y eosina.



Esquema 3. Áreas cerebrales.

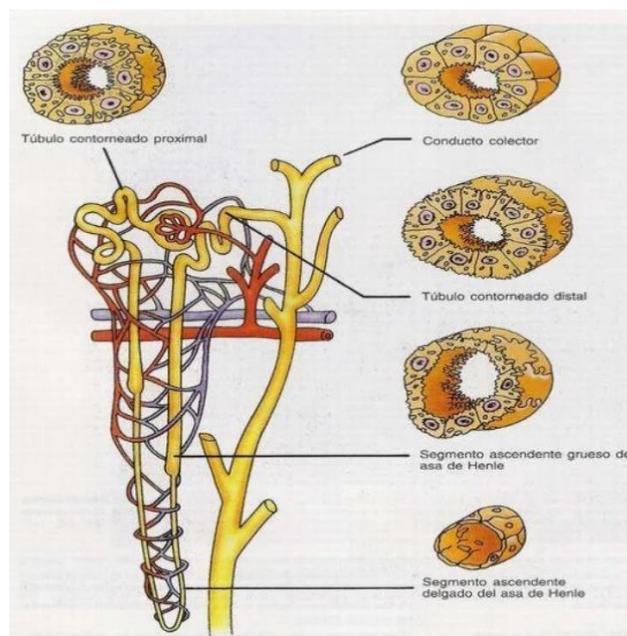
Obtenidas del atlas de histología para ratones (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition*) y tinción con hematoxilina y eosina [BrainDNAGeneticsNeuroscienceUCSD](https://www.braindnagenetics.ucsd.edu/) by University of California - San Diego november 14, 2021

1.5.4 IDENTIFICACIÓN DE SEGMENTOS RENALES

El tejido cortical renal contiene numerosas estructuras tubulares. En los estudios inmunohistoquímicos realizados en riñón se establece un criterio para la caracterización e identificación de los diferentes segmentos del túbulo proximal, debido a que las proteínas evaluadas presentan alta expresión en esta porción de la nefrona. En primer lugar, se tuvo en cuenta que los túbulos proximales son muy abundantes en la corteza renal y que poseen epitelio cúbico con un lumen angosto (Esquema 4).

Luego de la identificación de los túbulos proximales, los diferentes segmentos de estos túbulos se caracterizan e identifican empleando un criterio de clasificación que se basa en la localización diferencial y en las características estructurales específicas que posee cada segmento (Wolff et al. 2011; Veuthey et al. 2008):

- Los segmentos S1 y S2 se encuentran principalmente en la corteza, cercanos a los glomérulos;
- Los segmentos S3 se encuentran en el límite de la corteza, muy cercanos a la región externa de la médula externa;
- El lumen de los segmentos S1 y S3 es más angosto que el de los segmentos S2.



Esquema 4. Estructuras tubulares renales

1.5.5 TINCIÓN DE HEMOTOXILINA Y EOSINA

Antes de comenzar con las técnicas de inmunohistoquímica se realizó la tinción de hematoxilina y eosina a cada tejido para observar claramente la histología propia de cada uno. En los tejidos teñidos

con la técnica de H y E, los ácidos nucleicos se tiñen de un color azul oscuro y las proteínas de rosado a anaranjado (Cardiff et al. 2014).

1.5.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Cardiff y colaboradores (2014) describen el protocolo para la tinción de hematoxilina y eosina en secciones de tejido de ratón.

Los vidrios con los cortes en parafina se colocan en cajas histológicas y la parafina se retira utilizando xileno durante 20 minutos. Las muestras se hidrataron previo a la coloración; para ello los cortes se colocaron en alcohol 100% durante 5 minutos y luego se transfirieron a alcohol 96% durante 5 minutos. Finalmente se colocaron en alcohol 70% o 50% durante 5 minutos previo al agua destilada durante 2 minutos. Las muestras se colocaron en una solución de hematoxilina por 3 minutos y bajo agua corriente a pH básico a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Posteriormente las muestras se colocan en una solución de eosina por 2 minutos y finalmente se deshidratan en alcoholes de graduación creciente durante 2 minutos cada uno para terminar en xileno durante 2 minutos, para luego colocarles el cubreobjetos por encima utilizando bálsamo de Canadá como medio de montaje. La tinción se observa bajo microscopio óptico.

1.5.6 TINCIÓN DE PERLS ANALISIS CUALITATIVO DEL NIVEL DE HIERRO TISULAR

El hierro en exceso se acumula en las células, sobre todo en los macrófagos en forma de hemosiderina, un derivado de la ferritina. La hemosiderina es un pigmento de color amarillo pardo que contiene hierro en forma de hidróxido férrico y aparece como acúmulos o granulaciones intracelulares (García del Moral 1993). La hemosiderina puede colorearse mediante la técnica del azul de Perl's por contener Fe^{3+} libre (Perls 1867).

1.5.6.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El hierro depositado en forma de hemosiderina se libera por acción del ácido clorhídrico y reacciona con ferrocianuro potásico para dar ferrocianuro férrico. Esta técnica pone en evidencia la presencia de complejos insolubles de hierro por la formación de un precipitado coloreado, azul de Prusia (Crudo et al. 2016). Esta técnica histoquímica permite detectar el hierro no unido a proteínas. La intensidad de coloración es únicamente un parámetro cualitativo y permite realizar una semicuantificación para evaluar el contenido de hierro en forma de depósitos.

1.5.6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los portaobjetos con los cortes de tejido se colocan 20 minutos en xileno para desparafinizar. Posteriormente los tejidos se hidratan en soluciones de alcohol de graduación decreciente durante 10 minutos cada uno pasando por alcohol 100%, 96% y finalmente alcohol 50% antes de colocarlo en agua destilada durante 2 minutos.

Se coloca ferrocianuro férrico durante 4 minutos sobre cada corte de tejido para acelerar la reacción y luego se incuba durante 15 minutos con la solución de trabajo que contiene partes iguales de ferrocianuro férrico 10% y ácido clorhídrico 2%.

Pasado este tiempo se lava con agua destilada y luego se incuba con rojo nuclear 1% previamente filtrado durante 1 minuto y 30 segundos. Se enjuaga con agua destilada y se incuba con soluciones de alcohol de graduación creciente hasta llegar al xileno para proceder al montaje utilizando bálsamo de Canadá como medio de montaje.

1.5.7 TINCIÓN DE PERLS MODIFICADA

Para los tejidos que contienen bajo contenido de hierro depositado se utilizó una técnica más sensible para su visualización. El protocolo se llevó a cabo para los segmentos encefálicos.

Es un método simple y sensible para la visualización de hierro férrico. Nguyen-Legros y colaboradores (1980) desarrollaron una nueva reacción para la demostración histoquímica de hierro exógeno.

1.5.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método consiste en la conversión del hierro a azul de Prusia que actúa luego como un catalizador para la oxidación de la diaminobenzidina por el peróxido de hidrógeno.

Posteriormente la diaminobenzidina oxidada precipita por polimerización y produce un compuesto coloreado insoluble de color marrón. Esta reacción tiene mayor sensibilidad y contraste que la reacción clásica de Perls (Nguyen-Legros et al. 1980).

1.5.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los cortes de tejido se colocan 20 minutos en xileno para desparafinizar. Posteriormente los tejidos se hidratan en soluciones de alcohol de graduación decreciente durante 10 minutos cada uno pasando por alcohol 100%, luego alcohol 96% y finalmente alcohol 50% antes de colocarlo en agua destilada durante 2 minutos.

Se coloca ferrocianuro férrico durante 4 minutos sobre cada corte de tejido y luego se incuba durante 15 minutos con la solución de trabajo que contiene partes iguales de ferrocianuro férrico 10% y ácido clorhídrico 2%.

Luego se bloquea la peroxidasa endógena haciendo dos lavados de 8 minutos cada uno con peróxido de hidrógeno 3%. Finalmente se agregan 50 µL del revelador preparado en buffer que contiene el sustrato H₂O₂ y el cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina), preparado siguiendo las instrucciones del kit (*Cell Marque*).

Luego se lava con agua destilada y se contrastan los núcleos celulares con hematoxilina durante 3 minutos y se colocan en agua corriente durante 5 minutos para producir el viraje del colorante. Luego de la deshidratación en alcoholes de graduación creciente durante 2 minutos cada uno, los cortes se montan utilizando bálsamo de Canadá como medio de montaje.

1.6 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TISULAR

Los tejidos fueron mantenidos a -20 °C luego de su disección para la posterior cuantificación de hierro tisular. Un corte de cada órgano de cada ratón (corazón, hígado, riñón, pulmón, bazo, páncreas, cerebelo y estriado), se secó en estufa durante 8 horas a 105°C.

Luego, se realizó la digestión ácida de cada tejido con Ácido Nítrico 35% a 70°C. Posteriormente, se realizó la determinación colorimétrica adaptando el kit comercial para la determinación de hierro plasmático a la determinación de hierro tisular.

El método consiste en la liberación del Fe³⁺ en medio ácido y su posterior reducción a Fe²⁺ en presencia de un agente reductor, el ácido ascórbico. Seguidamente reacciona con el reactivo de color, ferene, dando un complejo color azul que se mide a 560 nm (*Fer-color, Wiener lab*).

Se corrigen las lecturas con sus blancos correspondientes y se calcula la concentración de hierro en las muestras de tejido seco.

1.7 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

La inmunohistoquímica es la técnica que permite la identificación selectiva de sustancias en tejidos, su localización y cuantía, tiene por objetivo la identificación de componentes biomoleculares presentes en los tejidos por medio de reacciones antígeno-anticuerpo realizadas in situ (Mas Degano y Llompart Ferrer 1993).

1.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Esta técnica permite visualizar antígenos tisulares a través de la reacción específica antígeno-anticuerpo. El sitio de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo el sustrato de la enzima a la que se acopla el anticuerpo, unido a un cromógeno. El producto originado, por acción de la enzima sobre el sustrato, interacciona con el cromógeno y origina un compuesto coloreado. En nuestro caso utilizamos la enzima peroxidasa de rábano y el complejo coloreado se observa de color marrón al reaccionar con su sustrato.

En nuestros estudios se realizó el método indirecto de detección, en el cual el anticuerpo primario se une con el antígeno de interés y se detecta, utilizando un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa dirigido contra el anticuerpo primario. La localización del antígeno de interés se revela mediante el agregado de la solución que contiene el sustrato de la enzima y su cromógeno generando el compuesto coloreado de color marrón, y la posterior observación al microscopio óptico.

1.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los portaobjetos con los cortes de tejido, 3 por cada condición se ubican en cajas de procesamiento histológico y se colocan 20 minutos en xileno para desparafinizar. Posteriormente los tejidos se hidratan en soluciones de alcohol de graduación decreciente durante 10 minutos cada uno pasando por alcohol 100%, luego alcohol 96% y finalmente alcohol 50% antes de colocarlo en PBS 2 minutos.

Luego se incuba con peróxido de hidrógeno 3%, sustrato de la enzima peroxidasa para bloquear la peroxidasa endógena del tejido y evitar interferencias, el tiempo de los 2/3 ciclos dependió de cada tejido de acuerdo a la cantidad de glóbulos rojos presentes en cada uno. Se lava con PBS durante 2 minutos y se incubó con BSA 1% en PBS para bloquear los sitios de unión inespecífica del anticuerpo, para el tejido cerebral se bloqueó con suero de cabra 10% en PBS durante 1 h en lugar de BSA. Finalmente se coloca el anticuerpo primario en la dilución adecuada y se incuba toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se lava 5 minutos en PBS y se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego se lava con PBS y se revela al microscopio óptico determinando el tiempo de revelado que fue diferente para cada tejido y anticuerpo. Para ello se agregan 50 µL del revelador preparado en buffer que contiene el sustrato H₂O₂ y el cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina), preparado siguiendo las instrucciones del kit (*Cell Marque*).

Debido a la gran cantidad de hierro presente en los tejidos en estudio, dado que dos de las condiciones a estudiar presentan sobrecarga de hierro, se procedió a realizar la técnica de doble tinción desarrollada en nuestro laboratorio que se lleva a cabo acoplado la inmunohistoquímica-DAB con la tinción de Perl's. De esta forma, el hierro presente en forma de hemosiderina se visualizará de color azul y no marrón para evitar que se superponga con la marcación de la proteína de interés.

Para contrastar los núcleos celulares se utilizó rojo nuclear y en el caso de cerebro se utilizó hematoxilina.

1.7.3 ESPECIFICIDAD TISULAR DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS ANTICUERPOS: TIEMPO DE REVELADO

TEJIDO	Bloqueo con H ₂ O ₂	Ac 1rio	dilución	Tiempo de revelado
CORAZÓN	2 ciclos de 22' cada uno.	DMT1	1/80	2'
		ZIP14	1/400	3'
		Prohepcidina	1/500	2'
		L-ferritina	1/500	2'
PULMÓN	3 ciclos de 15' cada uno.	DMT1	1/80	2'
		ZIP14	1/400	5'
		Prohepcidina	1/500	3'
		L-ferritina	1/500	2'30"
PÁNCREAS	2 ciclos de 8' cada uno.	DMT1	1/80	1'
		ZIP14	1/400	1'30"
		Prohepcidina	1/500	3'
		L-ferritina	1/500	1'30"
BAZO	2 ciclos de 10' cada uno	DMT1	1/80	1'50"
		ZIP14	1/400	2'
		Prohepcidina	1/500	2'
		L-ferritina	1/500	2'

HÍGADO	2 ciclos de 10´ cada uno	DMT1	1/50	2´
		ZIP14	1/400	1´30´´
		Prohepcidina	1/500	3´
DUODENO	2 ciclos de 10´ cada uno	DMT1	1/50	1´
		ZIP14	1/400	1´30´´
RIÑÓN	2 ciclos de 10´ cada uno	DMT1	1/80	5´
		ZIP14	1/400	2´
		Prohepcidina	1/500	3´
C1	3 ciclos de 15´ cada uno	DMT1	1/80	2´
		ZIP14	1/400	3´
C4	3 ciclos de 15´ cada uno	DMT1	1/80	2´
		ZIP14	1/400	3´

Tabla 1. Tiempos de bloqueo de peroxidasa endógena, dilución de anticuerpo primario empleado en inmunohistoquímica y tiempo de revelado de acuerdo a cada tejido en estudio.

Ac primario	Origen	Ac secundario	Origen	Dilución
DMT1	Rabbit anti mouse Francois Canonne-Hergaux	IgGαR	Goat anti rabbit Millipore	1/100
ZIP14	Rabbit anti mouse	IgGαR	Goat anti rabbit Millipore	1/100
Prohepcidina	Rabbit anti mouse actin	IgGαR	Goat anti rabbit Millipore	1/100
L-ferritina	Rabbit anti mouse RbαMoLF Paolo Santambrogio	IgGαR	Goat anti rabbit Millipore	1/100

Tabla 2. Anticuerpo primario y Dilución de anticuerpo secundario empleados en inmunohistoquímica.

1.8 IMÁGENES TISULARES

La inmunomarcación celular de color marrón, se visualizó utilizando un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara Olympus C7070. Se obtuvieron imágenes fotográficas en 400X y 1000X.

1.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados con el test de ANNOVA seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples, el nivel de significancia estadística se determinó un $p < 0,05$ y $p < 0,01$. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (mean \pm SEM). Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.

2. MODELO CELULAR

2.1 LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).

El neuroblastoma es un tumor infantil derivado de células precursoras o inmaduras del sistema nervioso simpático (Edsjo et al. 2007), se trata de un clon de neuroblastoma humano proveniente de la sublínea celular SK-N-SH que desarrolla morfología de tipo epitelial y crecimiento adherente (Figura 4).

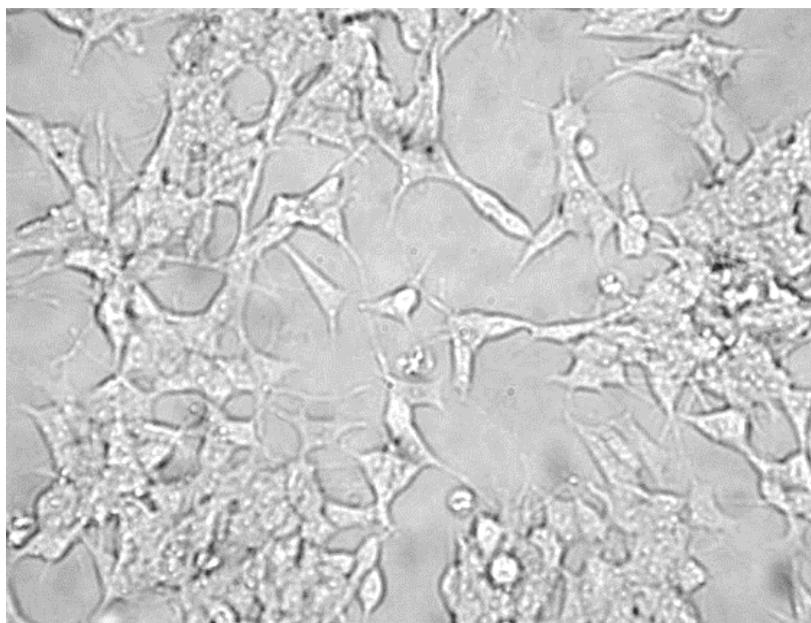


Figura 4. Células SH-SY5Y en cultivo celular, crecimiento adherente.
Aumento 400x. Imagen obtenida en el Laboratorio de Fisiología Humana, UNS año 2016.

2.2 CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO CELULAR

Para conservar las células en estado intacto por largos periodos de tiempo se recurrió al proceso de congelamiento celular en tanques de nitrógeno a muy baja temperatura (-170°C), de esta forma se logró disminuir el metabolismo celular. La temperatura celular descendió de manera gradual gracias a la utilización de dimetil sulfóxido (DMSO).

La suspensión celular a congelar (10^6 - 10^7 células/mL) fue centrifugada a 350g durante 10 min. Luego, al precipitado celular se le adicionó la mezcla congelante (medio de cultivo: SFB: DMSO; 45:45:10; v/v/v). La suspensión celular obtenida fue rápidamente homogeneizada y trasvasada a un criotubo que se colocó en un contenedor en un freezer a -80 °C durante 24 h para que la temperatura descendiera gradualmente. Pasado ese período de tiempo los criotubos se colocaron en un tanque con nitrógeno líquido.

En el momento de utilizar las células las mismas se descongelaron, para ello se introdujeron los criotubos en un baño a 37°C por unos minutos. La solución descongelada se centrifugó con 9 mL de medio de cultivo durante 10 minutos a 200 g. Finalmente se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo con SFB, L-glutamina y antibióticos y se sembró en flask y/o placas de cultivo celular.

2.3 CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

Las células de neuroblastoma humano se cultivaron en flask (Nunc) de 25 cm² de superficie dado que crecen de forma adherente. Cuando el cultivo en monocapa alcanzó entre el 80% y 90% de confluencia, las células fueron desprendidas de la superficie y sembradas.

El medio de cultivo utilizado es MEM : HAM en partes iguales suplementado con suero fetal bovino (Natocore) irradiado e inactivado, L-glutamina y penicilina-estreptomicina (44:44:10:1:1 v/v). Las células SH-SY5Y fueron mantenidas en incubador a 37°C con un 5% de CO₂, el medio de cultivo fue reemplazado cada 48 h.

2.4 TRATAMIENTOS Y PRETRATAMIENTOS CELULARES

2.4.1 TRATAMIENTO CON CITRATO AMÓNICO FÉRRICO (FAC)

En este trabajo se llevó a cabo un modelo celular de sobrecarga de hierro incubando a las células de neuroblastoma humano en una placa de 96 wells (10^4 células por well) con concentraciones crecientes de citrato amónico férrico (FAC Sigma Aldrich) durante diferentes tiempos de incubación

(24, 48 y 72 h). Se utilizaron las concentraciones de FAC (0, 30, 80, 150, 450 y 600 μM) por los diferentes tiempos de incubación, pasado dicho tiempo se evaluó viabilidad celular y se cuantificó hierro en el medio de cultivo para decidir la dosis y el tiempo de incubación de trabajo (Esquema 5).

2.4.2 PRETRATAMIENTO CON N-ACETIL CISTEÍNA

Se realizó el pretratamiento celular 12 h previas a la incubación con FAC con un conocido antioxidante, N-acetil cisteína (NAC Sigma Aldrich) en una concentración de 2 y 4 mM. Luego se evaluó viabilidad celular (Esquema 5).

Por otro lado, se realizó el pretratamiento con NAC (2, 4 y 10 mM) 12 h previas al tratamiento de las células incubadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Esquema 5).

2.4.3 TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

También se realizó un tratamiento con H_2O_2 (100, 200, 300 y 400 μM) durante 6 h. Posteriormente se evaluó viabilidad celular. Las concentraciones fueron elegidas en base a bibliografía de estudios realizados en células de neuroblastoma SH-SY5Y por *Feng et al. (2016)* (Esquema 5).

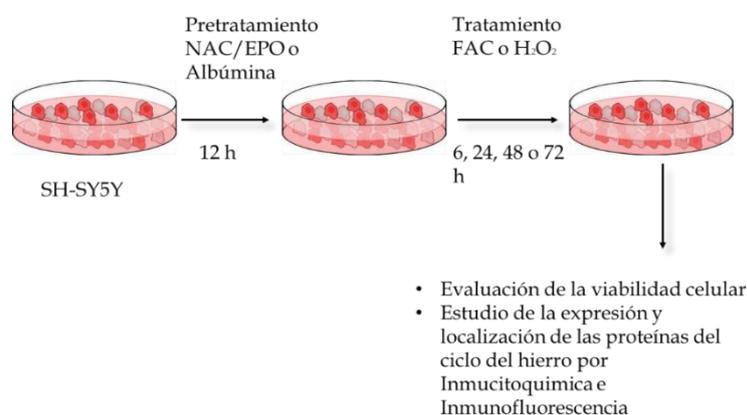
2.4.4 PRETRATAMIENTO CON ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

Diferentes dosis de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) (Hemax) fueron utilizadas como pretratamiento celular (10, 25, 50, 75 y 100 UI/mL) colocándolas 12 h previas al tratamiento con FAC (Esquema 5).

2.4.5 PRETRATAMIENTO CON ALBÚMINA

La rHuEPO presenta un alto contenido de albúmina, por lo tanto, para descartar un falso positivo se realizó un pretratamiento de las células con albúmina como control interno.

De esta forma las células fueron tratadas con igual concentración de albúmina (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sigma Aldrich) que la contenida en la concentración de eritropoyetina seleccionada 12 h previas al tratamiento con FAC. La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul tripán y el ensayo de captación de rojo neutral (Esquema 5).



2.5 VIABILIDAD CELULAR

2.5.1 TÉCNICA DE EXCLUSIÓN CELULAR CON AZUL TRIPÁN

El ensayo de exclusión con azul tripán se utiliza para determinar el número de células viables presentes en un cultivo celular. Esta técnica se basa en el principio de que las células vivas poseen intacta la membrana celular excluyendo colorantes como el azul tripán, eosina o propidio mientras que las células no viables pierden dicha capacidad. Las células viables presentan citoplasma claro y brillante mientras que las no viables presentan citoplasma azulado (Strober W. 2015).

La suspensión celular se mezcló con igual cantidad de colorante. El número de células que captan el colorante azul tripán se determinan por microscopia utilizando una cámara de Neubauer. Se contaron células totales por duplicado de cada triplicado para cada condición y se calculó el porcentaje de viabilidad de acuerdo al total de células contadas.

2.5.2 ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRAL PARA ESTIMAR VIABILIDAD CELULAR

2.5.2.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ensayo de captación celular de rojo neutral permite realizar una estimación cuantitativa del número de células viables en cultivo. Este ensayo es muy utilizado en aplicaciones biomédicas y ambientales y se basa en la capacidad de las células viables de incorporar el colorante supravital en los lisosomas.

2.5.2.2 PROTOCOLO

Las células sembradas en placas de 96 wells luego de ser tratadas con el protocolo adecuado se incuban por 2 h en medio de cultivo MEM : HAM conteniendo rojo neutral y se lavan con PBS.

El colorante captado por las células viables se extrajo con una mezcla de 50% de etanol 96%, 1% de ácido acético glacial y 49% de agua destilada y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

Es un procedimiento rápido y económico (Repetto et al 2008). La determinación se realizó por duplicado de cada triplicado para cada condición.

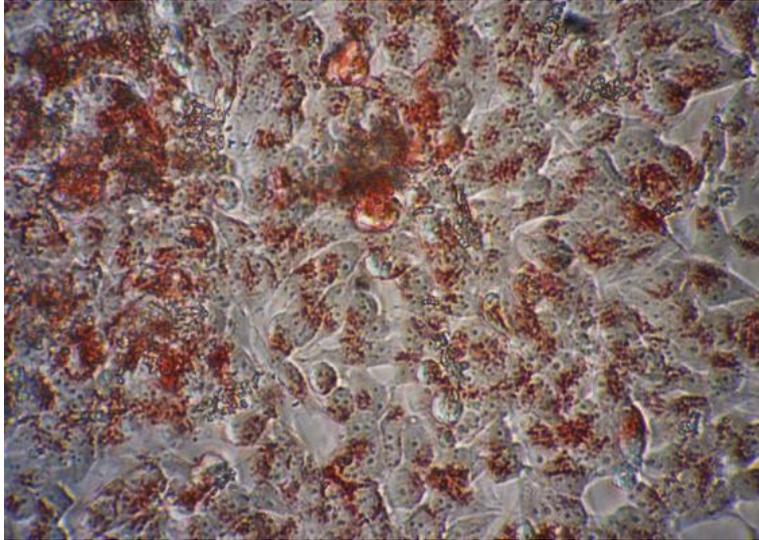


Figura 5. Células viables captando el colorante supravital rojo neutral.
Aumento 400x. Fotografía obtenida en el Laboratorio de Fisiología Humana, UNS año 2017.

2.6 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO

El hierro en el medio de cultivo celular se cuantificó utilizando un kit colorimétrico, FerColor kit, Wiener lab.

Una alícuota de 200 μ L de sobrenadante de medio de cultivo se incubó con 1 mL del reactivo A (solución de ácido cítrico, ácido ascórbico y tensioactivo), se mide la absorbancia a 560 nm y se añaden 200 μ L de reactivo B, reactivo de color ferene. Se lee la absorbancia final. La concentración de hierro se calcula corrigiendo la absorbancia y utilizando un estándar de hierro provisto por el kit de concentración conocida.

2.7 INMUNOCITOQUÍMICA

2.7.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La inmunocitoquímica permite visualizar antígenos celulares de interés mediante la reacción altamente específica antígeno-anticuerpo. El sitio de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo el sustrato de la enzima a la que se acopla el anticuerpo, unido a un cromógeno. El producto originado, por acción de la enzima sobre el sustrato, interacciona con el cromógeno y origina un compuesto coloreado. En nuestro caso, como marcador enzimático, se usó la enzima peroxidasa de rábano, de acuerdo a Nakane y Pierce (1966).

Utilizamos el método indirecto de detección, que consiste en la unión del anticuerpo primario con el antígeno de interés y la posterior detección, utilizando un anticuerpo secundario acoplado a

la enzima peroxidasa dirigido contra el anticuerpo primario. La localización del antígeno de interés se revela mediante el agregado de la solución que contiene el sustrato de la enzima y su cromógeno generando el compuesto coloreado de color marrón, y la posterior observación al microscopio óptico.

2.7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este estudio se realizaron inmunocitoquímicas seguidas de tinción con hematoxilina para contrastar los núcleos celulares.

Las células se cultivaron en placas de cultivo p35 sobre un cubreobjetos previamente esterilizado mediante radiación uv como superficie adherente.

Se cultivaron 3 placas para cada condición o tratamiento. Finalizado el tiempo de incubación se descartó el medio de cultivo y se lavó con PBS. Luego las células se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA) durante 30 a 40 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS, luego se permeabilizó la membrana celular con Tritón 0,1% en PBS durante 20 minutos y se lavó con PBS. Luego se bloquean los sitios de unión inespecíficos incubando a las células con albúmina sérica bovina 1% en PBS (BSA). Después se incubó con el anticuerpo primario *overnight* a 4°C.

Luego se lavó con PBS y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se volvió a lavar con PBS y se reveló la marcación con el kit de diaminobenzidina (DAB). Finalizado el tiempo correspondiente de revelado para cada anticuerpo se frenó con agua destilada, luego se añadió el colorante hematoxilina durante 2 minutos y se colocó en agua corriente por 5 minutos dado que por su pH básico produce el viraje del colorante. Finalmente se monta el cubreobjetos sobre un portaobjetos con glicerol para poder observar la marcación al microscopio óptico.

2.7.3 ANTICUERPOS Y TIEMPOS DE REVELADO

Anticuerpo Primario	Origen	Dilución utilizada	Anticuerpo secundario	Origen	Dilución utilizada	Tiempo de revelado
DMT1	Rabbit anti mouse Francois Canonne -Hergaux	1/50	IgGαR	Goat anti rabbit Millipore	1/100	3'

ZIP 14	Rabbit anti mouse	1/400	IgG α R	Goat anti rabbit Millipore	1/100	7'
RTf1	Mouse anti human CD71 (3B82A1) SC-32272 Santa Cruz	1/70	m-IgGkBP-HRP	Anti mouse SC51610 2 Santa Cruz	1/70	2' 30"
Prohepcidina	Rabbit anti mouse actin Santa Cruz Tomas Ganz	1/500	IgG α R	Goat anti rabbit Millipore	1/100	1'
L-ferritina	Rabbit anti mouse R β MoL F Paolo Santambrogio	1/400	IgG α R	Goat anti rabbit Millipore	1/100	3'
FLVCR1	C-4: SC-390100 Santa Cruz	1/50	m-IgGkBP-HRP	Anti mouse SC51610 2Santa Cruz	1/70	5'
HCP1	B-4: sc-393460 Santa Cruz	1/50	m-IgGkBP-HRP	Anti mouse SC51610 2Santa Cruz	1/70	1:30'

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunocitoquímica, diluciones utilizadas y tiempos de revelado.

2.8 INMUNOFLUORESCENCIA

2.8.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Esta técnica se utilizó por primera vez en 1942 (Coons et al.) para demostrar la presencia del antígeno tisular del neumococo utilizando anticuerpos específicos unidos a una sustancia fluorescente.

Este método utiliza la especificidad de reacción antígeno-anticuerpo sin embargo el anticuerpo primario o secundario, se encuentra acoplado a un fluoróforo que emite una señal fluorescente y se observa en microscopio de fluorescencia.

2.8.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Las células se cultivaron en placas de cultivo p35 con un cubreobjetos previamente esterilizado mediante radiación uv como superficie adherente, se cultivaron 3 placas para cada condición o tratamiento. Finalizado el tiempo de incubación se descartó el medio de cultivo y se lavó con PBS, luego las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 30 a 40 minutos, luego se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente se permeabilizó la membrana celular con Tritón 0,1% en PBS durante 20 minutos y se lavó con PBS.

Después se incubó con el anticuerpo primario *overnight* a 4°C en cámara húmeda, al otro día se lavó con PBS para eliminar el anticuerpo primario que no se unió y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en este caso unido a un fluoróforo.

En nuestro caso para observar colocalización se incubó primero con el anticuerpo primario anti RTf2 y luego con su respectivo anticuerpo secundario fluorescente (verde). Luego, se incubó con el anticuerpo primario anti HFE *overnight* y posteriormente con el anticuerpo secundario fluorescente (rojo).

Pasado este tiempo se lavó con PBS y se incubó con DAPI (1/10000) 10 minutos, para marcar los núcleos celulares (azul). Finalmente se montó el cubreobjetos sobre un portaobjetos con glicerol y se observó al microscopio de fluorescencia.

2.8.3 ANTICUERPOS Y DILUCIONES UTILIZADAS

Anticuerpo Primario	Origen	Dilución utilizada	Anticuerpo Secundario	Origen	Dilución utilizada
H-ferritina	B-12: sc-376594 Santa Cruz	1/50	IgG-fluoresceína	horse anti-mouse sc-2359 Santa Cruz	1/200
RTf2	3B8 2A1 : sc 32272 Santa Cruz	1/50	IgG-fluoresceína	horse anti-mouse sc-2359 Santa Cruz	1/200
HFE	Robert E. Fleming	1/50	IgG-PE SC 3753	Mouse anti rabbit	1/100

				SC 3753 Santa Cruz	
--	--	--	--	-----------------------	--

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia, y diluciones utilizadas.

2.9 OBTENCIÓN DE IMÁGENES FOTOGRÁFICAS CELULARES

La inmunomarcación celular de color marrón, se visualizó utilizando un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara Olympus C7070 con la que se obtuvieron imágenes fotográficas en 400X y 1000X para mayor detalle celular con alta resolución.

La inmunofluorescencia fue detectada mediante la utilización de microscopio fluorescente Olympus Q Color 3.

2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados con el test de ANNOVA seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples, el nivel de significancia estadística se determinó un $p < 0,05$ y $p < 0,01$. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (mean \pm SEM). Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.

Capítulo 1

Modelo Animal

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

El Bazo murino

órgano eritropoyético extramedular

EVALUACIÓN DE LA ERITROPOYESIS EN UN MODELO ANIMAL DE SOBRECARGA DE HIERRO

1. INTRODUCCIÓN

El bazo murino es un tejido con actividad eritropoyética en el ratón adulto, esta característica funcional lo convierte en un modelo animal para su estudio.

Estudios de Bozzini et al. (1970) demostraron que la esplenectomía reducía la masa eritrocitaria circulante originando anemia, hemorragia o hipoxia aumentando la captación de hierro. Estos estudios mostraron la producción de eritrocitos en sitios extramedulares (Bozzini et al. 1970).

El bazo se localiza en la cavidad abdominal en la región izquierda. El tejido esplénico se divide en pulpa roja y pulpa blanca. La pulpa roja se encarga de filtrar la sangre y eliminar desechos y eritrocitos dañados, y es el sitio de depósito de hierro (Cesta, 2006). Los macrófagos de la pulpa roja continuamente fagocitan y remueven eritrocitos senescentes.

La hematopoyesis extramedular es común en la pulpa roja esplénica de roedores además, en esta región se evidencia un conjunto de células eritroides, mieloides y megacariocitos. El bazo también es un órgano linfoide que contiene un gran número de linfocitos e inicia la respuesta antigénica.

El metabolismo del hierro y la eritropoyesis se encuentran estrechamente relacionados, es por eso que en el proceso dinámico de la eritropoyesis se requiere un adecuado equilibrio en el metabolismo del hierro para evitar desórdenes como sobrecarga o deficiencia de hierro (D'Anna, Giorgi y Roque 2011, D'Anna y Roque 2013.)

Para clarificar dudas sobre la captación, movilización y acumulación de hierro diseñamos un modelo animal combinado de sobrecarga de hierro y eritropoyesis inducida con eritropoyetina.

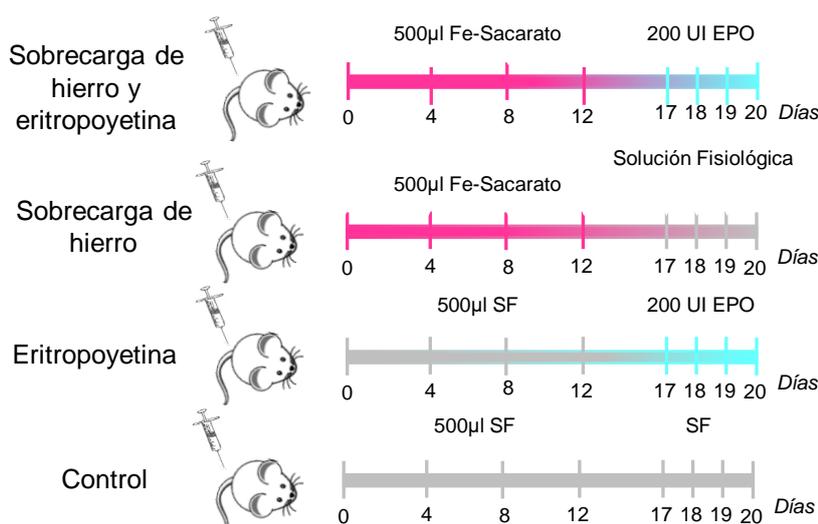
Este capítulo del trabajo de tesis comprende el estudio de la eritropoyesis y el manejo de la sobrecarga de hierro mediante estudios hematológicos y estudios tisulares sobre el bazo dado que es el principal órgano eritropoyético extramedular en roedores.

Sobre el tejido esplénico se realizaron diferentes estudios como la tinción de hematoxilina y eosina, la expresión de las proteínas del ciclo del hierro (DMT1, ZIP14, prohepcidina y L-ferritina) por inmunohistoquímica, se cuantificó el contenido de hierro esplénico y se observaron los depósitos de hemosiderina mediante tinción de Perls.

2. DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL

Para llevar a cabo los estudios de la captación, movilización y acumulación de hierro se desarrolló un Modelo animal de ratones (cepa CF1) con la inducción de sobrecarga de hierro y de la actividad eritropoyética siguiendo el diseño experimental del esquema 1 detallado en Materiales y Métodos.

Luego de finalizado el protocolo experimental, se extrajo sangre a cada grupo mediante la técnica de extracción sanguínea del plexo submandibular para luego realizar determinaciones hematológicas. Posteriormente los animales se sacrificaron para la obtención, recolección y preparación de los órganos de interés.



Esquema 1. Tratamientos con hierro sacarato y eritropoyetina en el Modelo Animal.

3. INMUNOEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESPLÉNICAS DEL CICLO DEL HIERRO

3.1 Expresión del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1)

DMT1 se localizó en el citoplasma celular y mostró una intensa marcación en el grupo de sobrecarga de hierro respecto al grupo control (Figuras 1 B y 2 B), lo que podría indicar que DMT1 contribuye a la captación de hierro esplénico y su acumulación en estados de exceso. En la condición de eritropoyetina su marcación fue muy leve (Figura 1 C y 2 C) mientras que en el grupo combinado su expresión disminuyó respecto al grupo de sobrecarga de hierro siendo nuevamente similar al control (Figuras 1 D y 2 D) indicando que la señal predominante es la de eritropoyetina sugiriendo una menor captación de hierro vía DMT1 en bazo y una menor acumulación por parte de los macrófagos para estar biodisponible y ser utilizado en la eritropoyesis.

Resultados

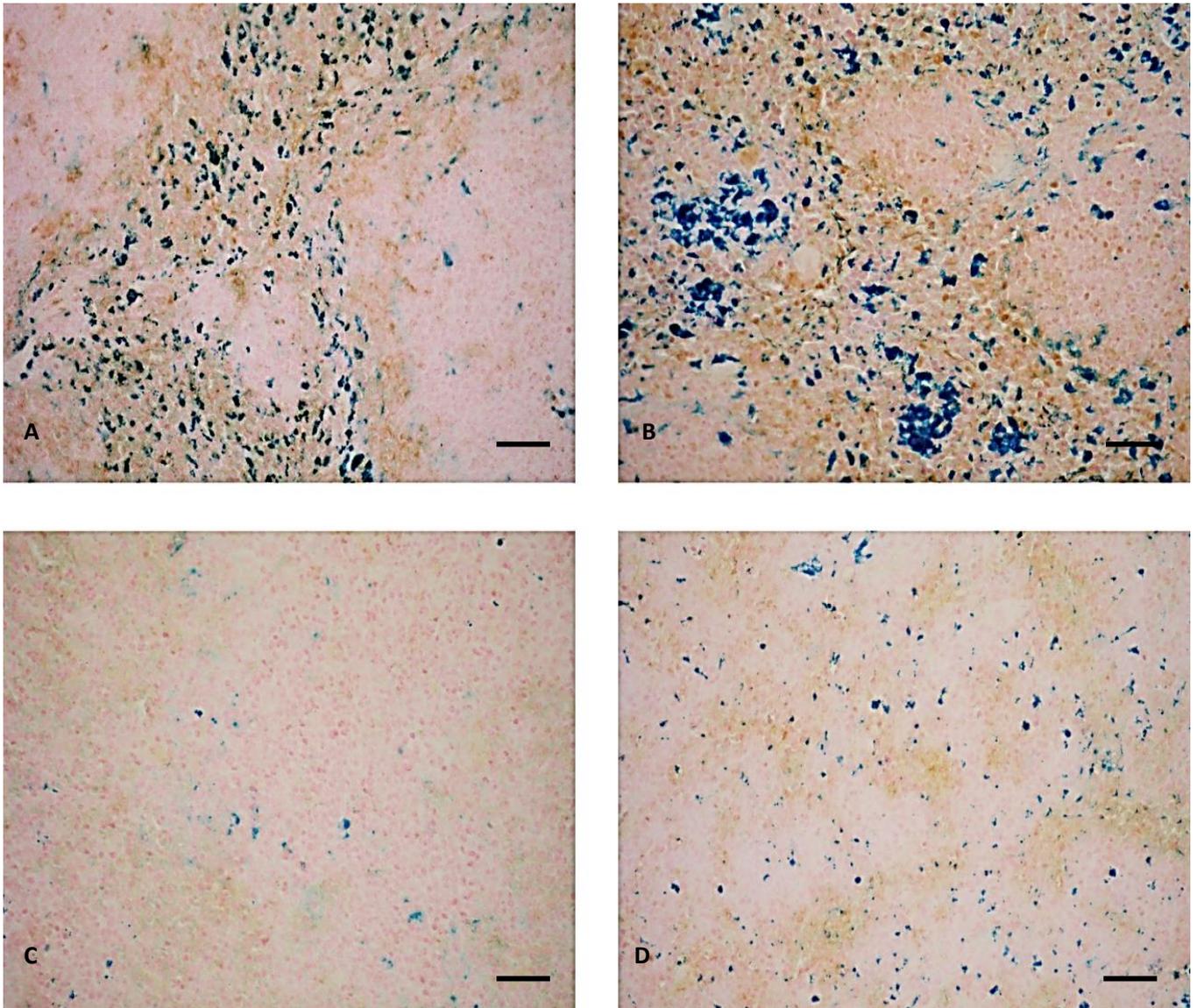


Figura 1. Inmunomarcación de DMT1 en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

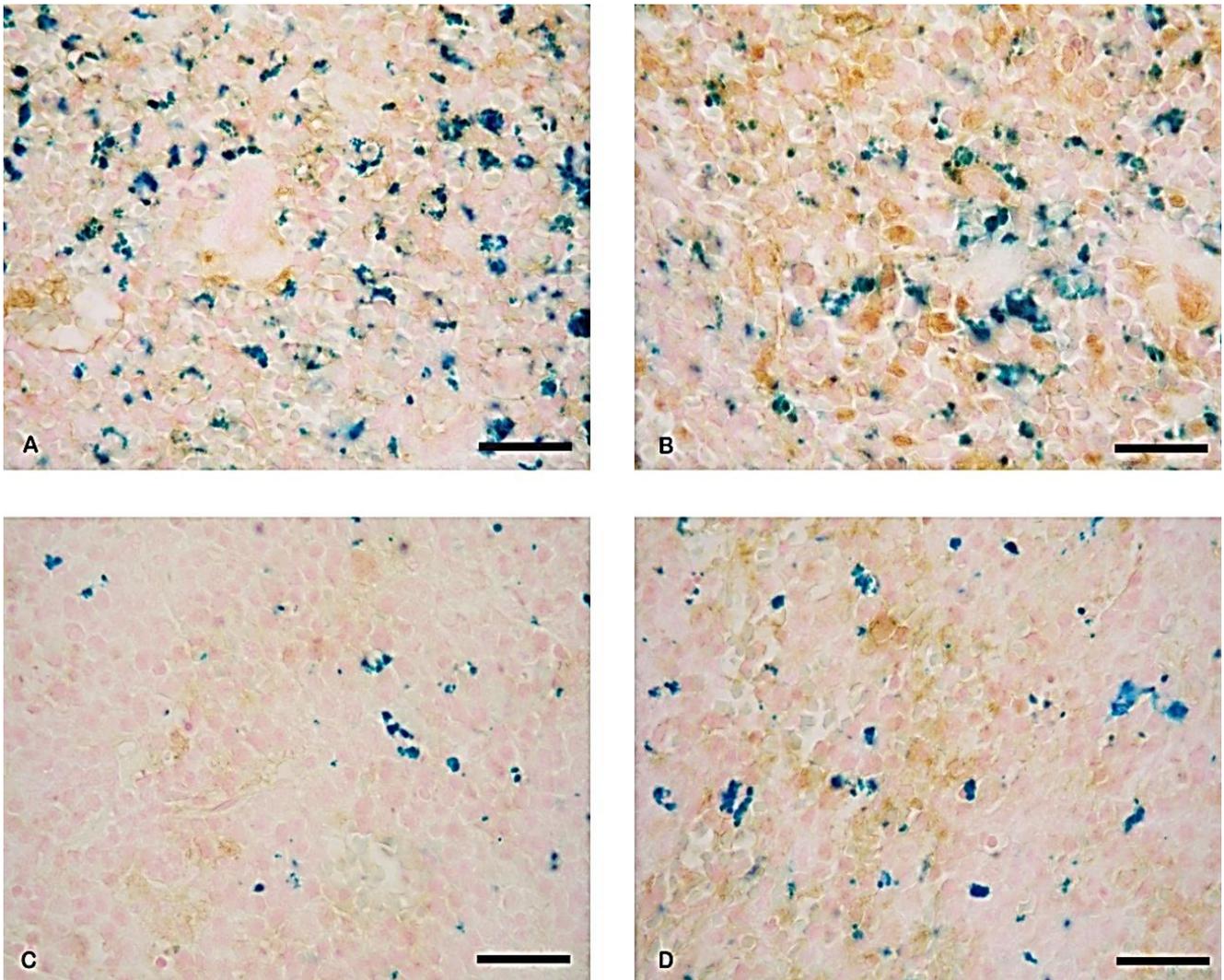


Figura 2. Inmunomarcación de DMT1 en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

3.2 Expresión del Transportador ZIP14

Se observó un aumento de la expresión de ZIP14 en el estado de sobrecarga de hierro respecto al control (Figuras 3 B y 4 B) mientras que en presencia de eritropoyetina su expresión fue indetectable (Figuras 3 C y 4 C), siendo ésta la señal predominante en el grupo combinado (Figuras 3 D y 4 D).

Resultados

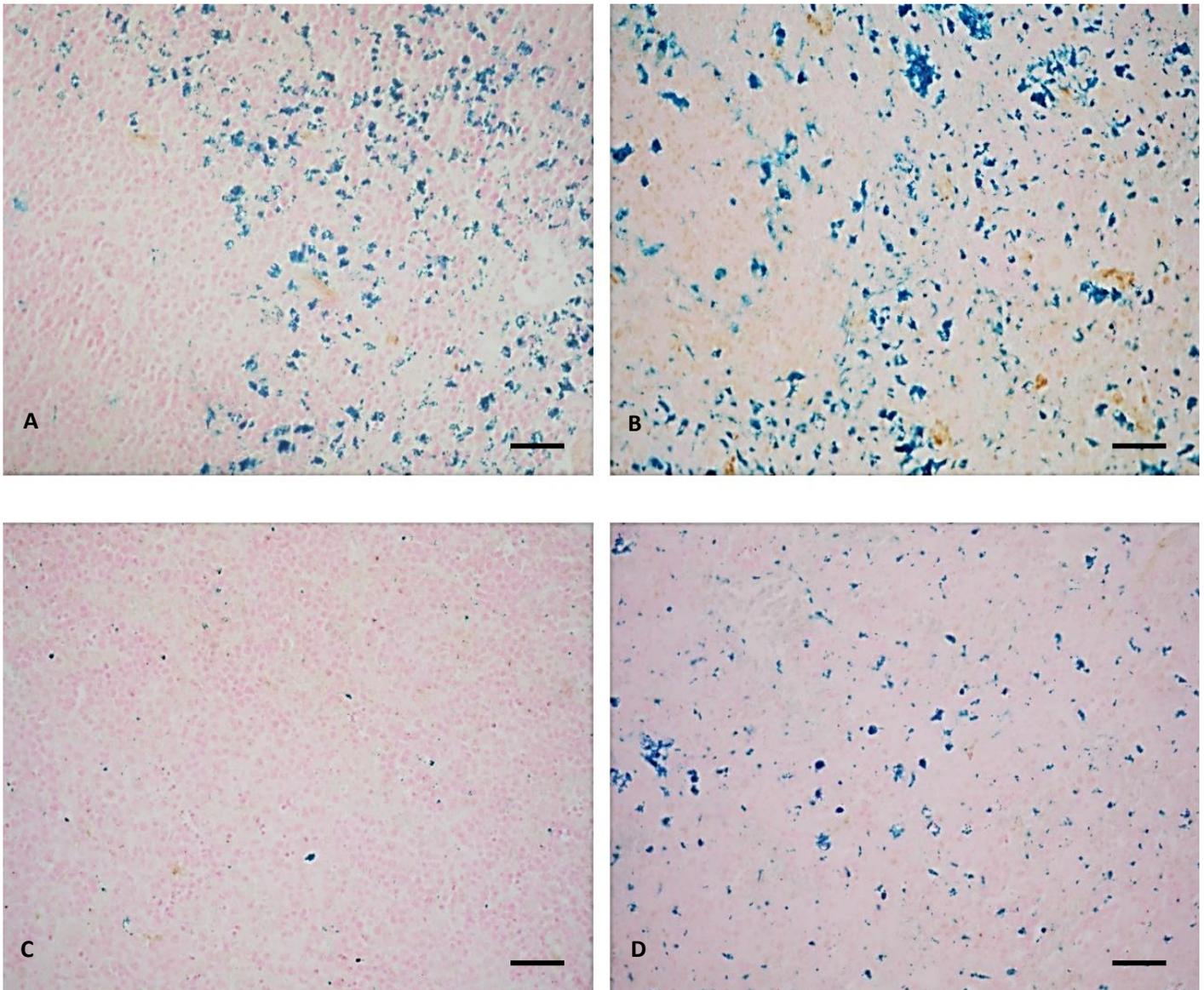


Figura 3. Inmunomarcación de ZIP14 en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

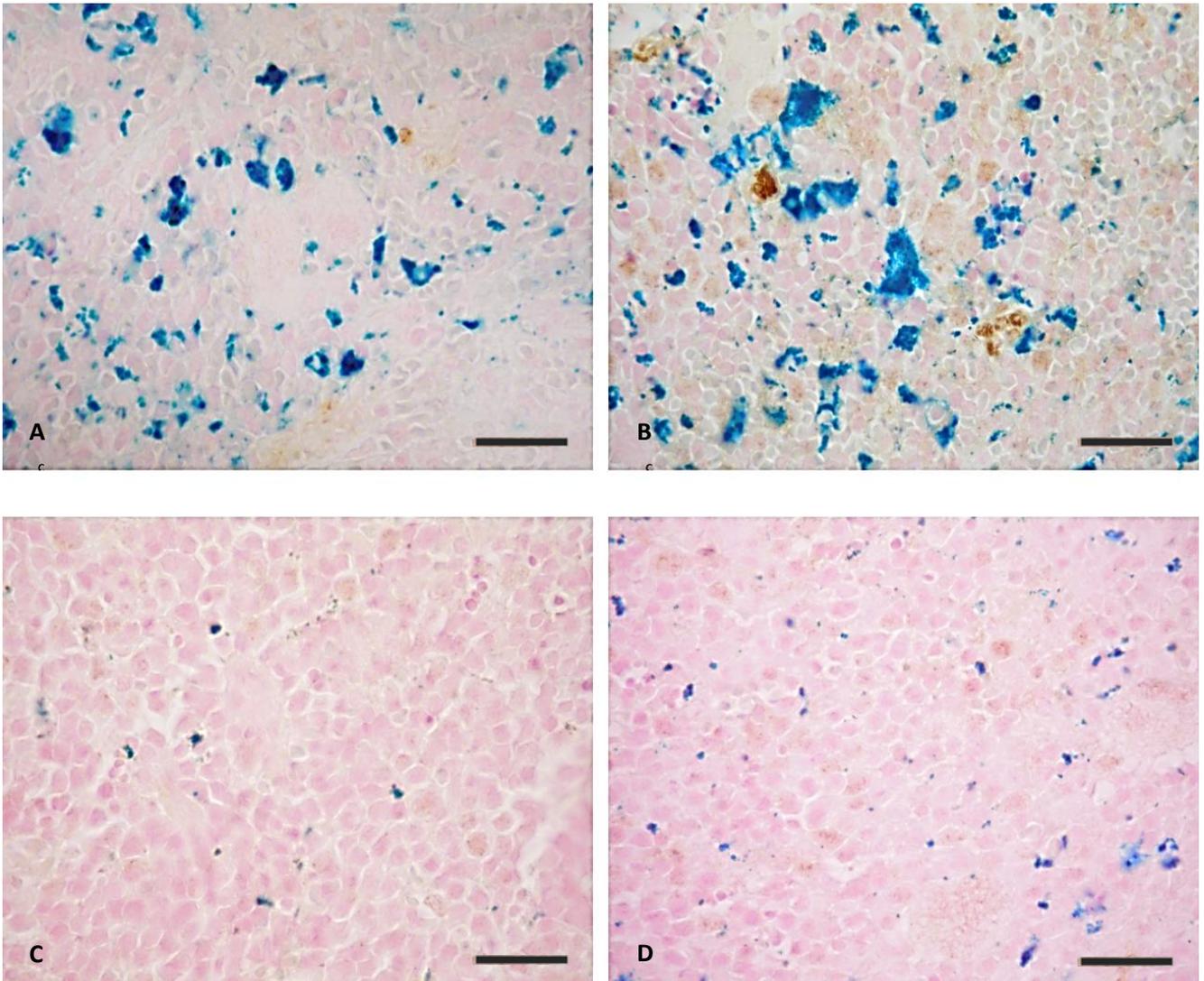


Figura 4. Inmunomarcación de ZIP14. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

3.3 Expresión de L-ferritina

L-ferritina aumentó su expresión en el Grupo de sobrecarga de hierro (Figuras 5 y 6 B) respecto al Grupo Control (Figuras 5 y 6 A), observándose en la pulpa roja de manera similar a los depósitos de hierro en forma de hemosiderina.

En el Grupo EPO la expresión de L-ferritina fue leve (Figuras 5 y 6 C) siendo la señal EPO predominante en el Grupo combinado (Figuras 5 y 6 D) respecto al Grupo Control (Figuras 5 y 6 A).

Resultados

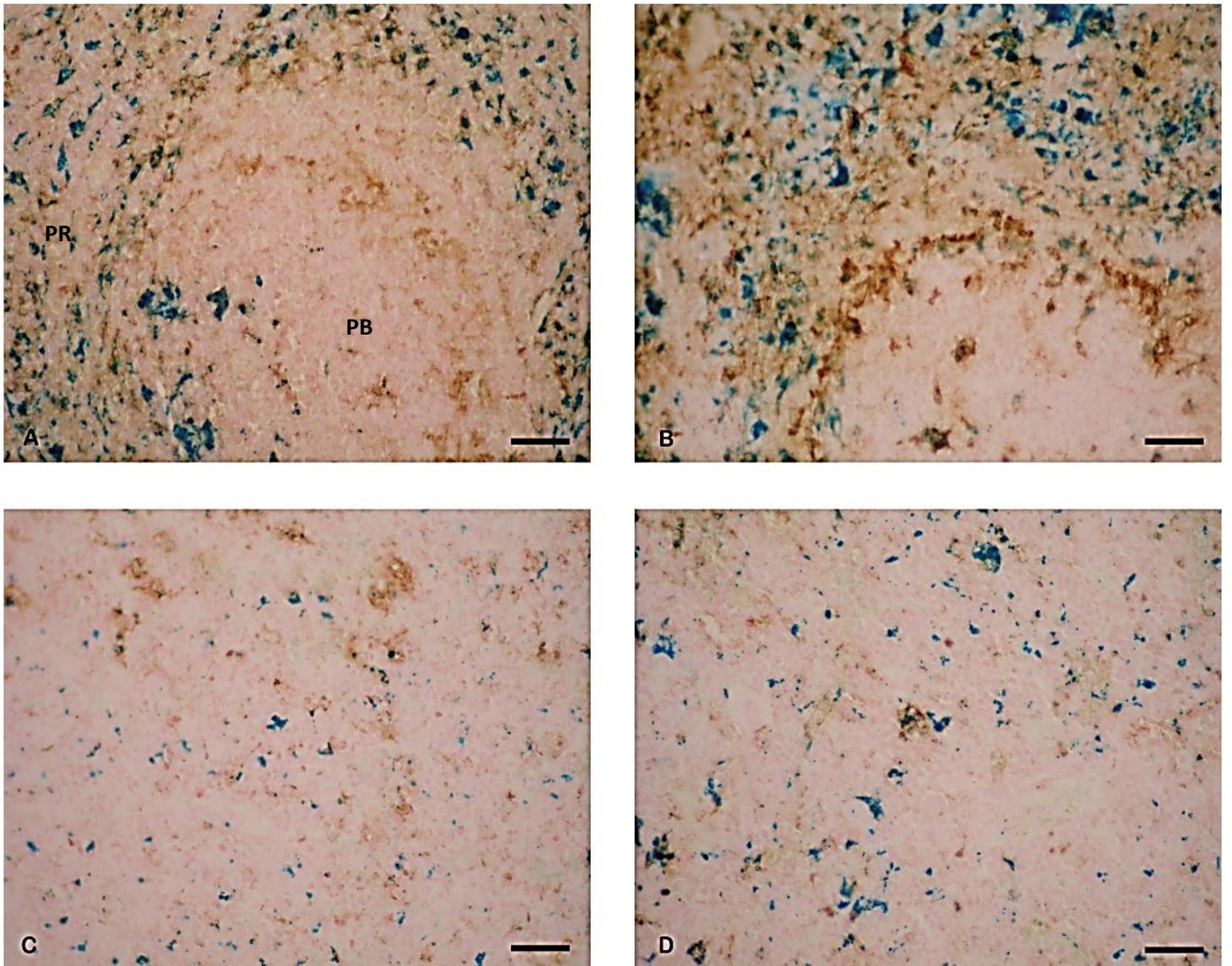


Figura 5. Inmunomarcación de L-ferritina en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron por inmunomarcación con el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

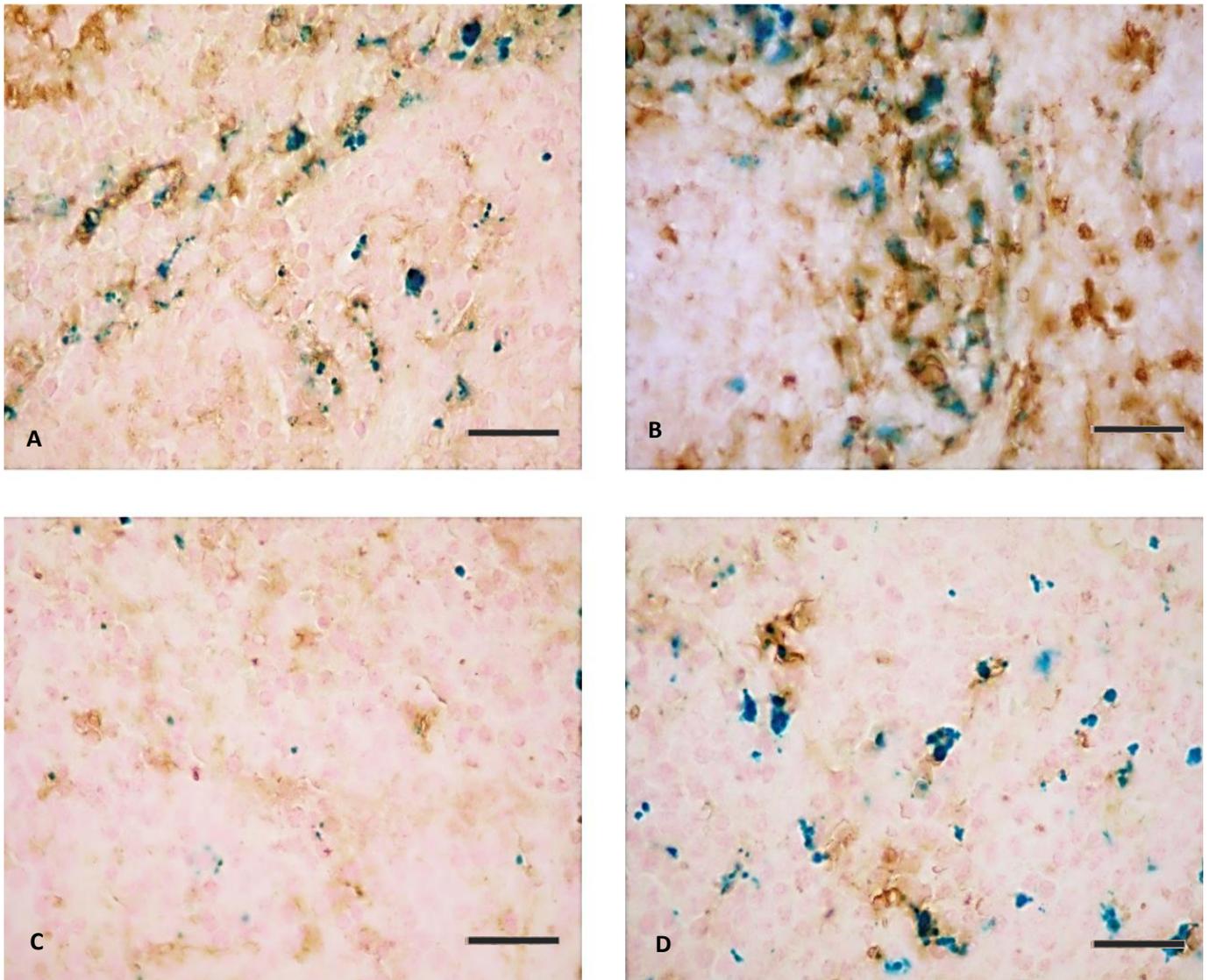


Figura 6. Inmunomarcación de L-ferritina en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en *Materiales y Métodos* (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

3.4 Expresión de Prohepcidina

Se observó una marcada expresión del propéptido de Hecpidina en el Grupo Sobrecarga de Hierro (Figura 7 B) y una leve marcación en el Grupo EPO (Figura 7 C) respecto al Grupo Control (Figura 7 A). En el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO la señal destacada fue EPO (Figura 7 D).

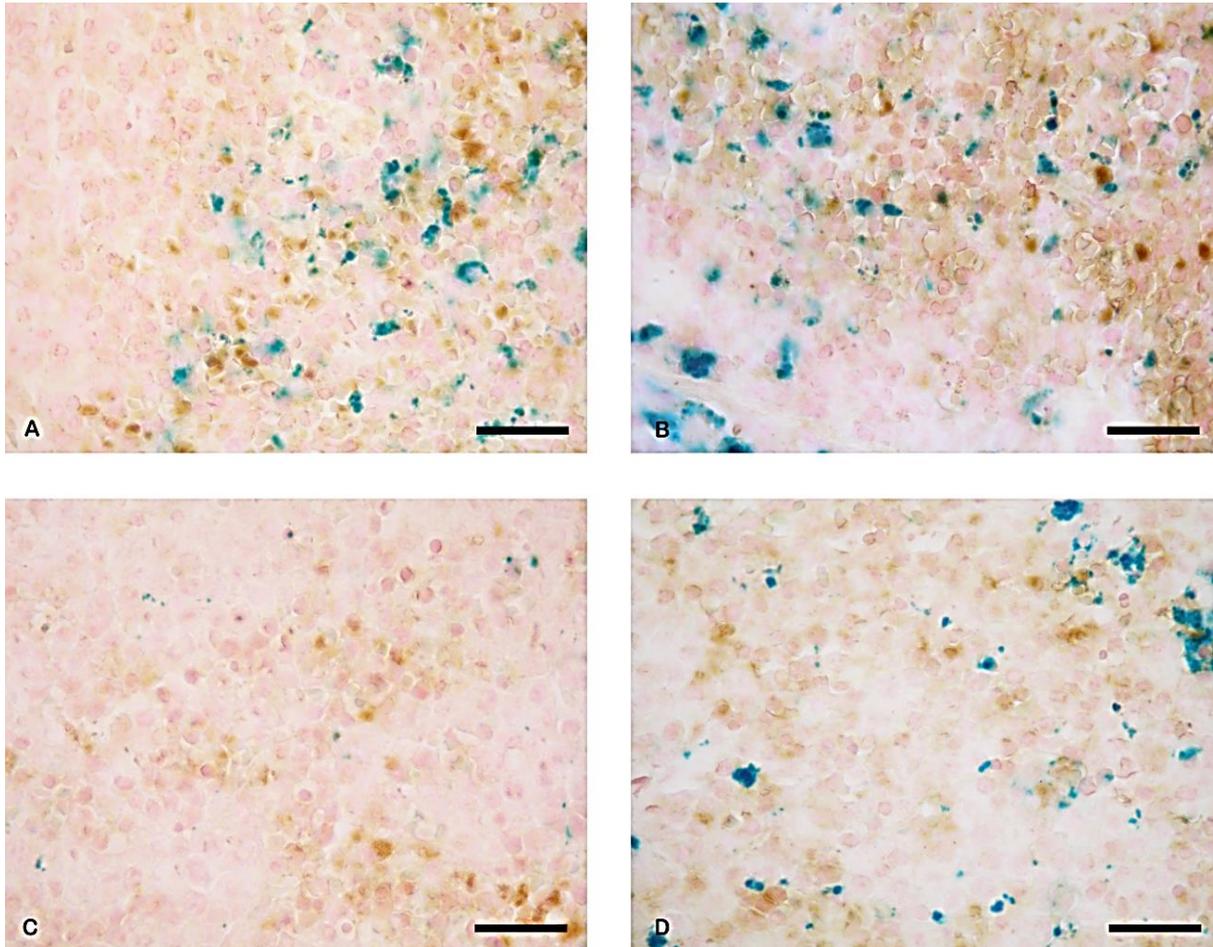


Figura 7. Inmunomarcación de prohepcidina en bazo. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

3.5 Control negativo

El control negativo de la inmunomarcación para las proteínas estudiadas incubado únicamente con PBS en lugar del anticuerpo primario mostró ausencia de marcación (Figura 8).

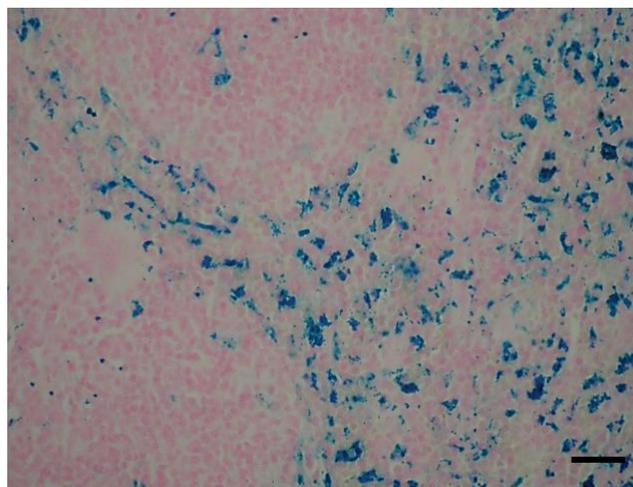


Figura 8. Control esplénico negativo. El tejido se procesó para IHQ utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS

4.1 Nivel de Hemoglobina

Se determinaron los niveles de hemoglobina en los grupos control y experimental. No hubo diferencias significativas entre los Grupos Control ($15,5 \pm 0,48$ g/dL) y Sobrecarga de Hierro ($14,8 \pm 0,23$ g/dL) y se observó un aumento significativo del valor de hemoglobina en el Grupo EPO ($17,1 \pm 0,75$ g/dL) y el Grupo Hierro + EPO ($16,8 \pm 0,38$ g/dL) respecto al Grupo Control (Figura 9).

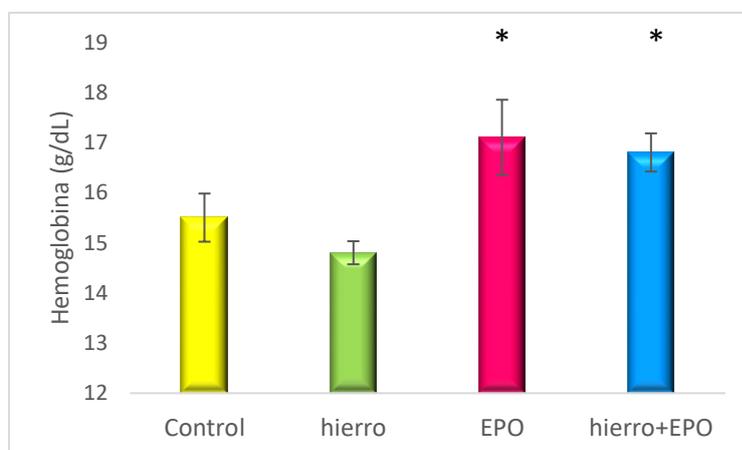


Figura 9. Determinación de hemoglobina en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores de hemoglobina expresados en g/dL * $p < 0,05$

4.2 Hematocrito

El hematocrito se determinó en muestras sanguíneas por el método del microhematocrito y se observó que los grupos de ratones inyectados con EPO presentaban un hematocrito mayor respecto a los Grupos Control y Sobrecarga de Hierro (Figura 10). En el Grupo Control el hematocrito fue de $49 \pm 1\%$, en Sobrecarga de Hierro fue de $45 \pm 1\%$ sin diferencias respecto a condiciones basales, en el Grupo EPO el hematocrito fue de $56 \pm 2\%$ y en el de Sobrecarga de Hierro + EPO de $54 \pm 2\%$ (Figura 10) siendo significativamente superior a los 2 primeros grupos.

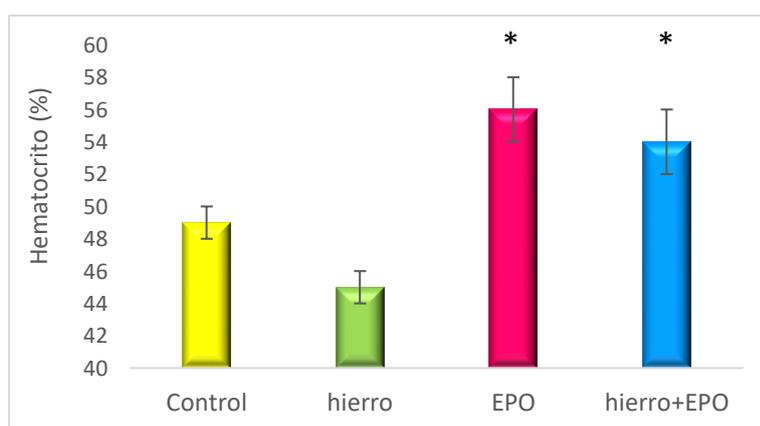


Figura 10. Determinación de hematocrito en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.

Valores de hematocrito expresados en %. * $p < 0,05$

Resultados

4.3 Fórmula Leucocitaria Relativa

La fórmula leucocitaria dentro de valores de referencia indicó el estado de salud de los animales y descartó procesos infecciosos.

La especie murina posee la fórmula leucocitaria relativa invertida respecto a los humanos presentando un mayor porcentaje de leucocitos mononucleares respecto a los polimorfonucleares. Valores de referencia para ratón: mononucleares 75-85% polimorfonucleares: 15-25%. En caso de observar un animal con la fórmula leucocitaria relativa alterada se debe excluir de la experiencia.

En nuestro modelo animal no se observaron diferencias en la fórmula leucocitaria relativa en ninguna de las cuatro condiciones (tabla 1). La serie eritrocitaria del Grupo Control y el Grupo Sobrecarga de Hierro presentaban normocitosis y normocromía (coloración y tamaño normal) mientras que los grupos tratados con EPO, con y sin hierro, mostraban macrocitosis (aumento de tamaño) y policromasia (tinción con colorantes ácidos y básicos) (Figura 11 C y D), indicando una mayor actividad eritropoyética en estos grupos.

GRUPO	FÓRMULA LEUCOCITARIA	OBSERVACIÓN DE LA SERIE ERITROCITARIA
CONTROL	PMN: 10±2 MN: 90±2	Normocitosis normocromía
HIERRO	PMN: 18±8 MN: 82±8	Normocitosis normocromía
EPO	PMN: 13±3 MN: 87±3	Macrocitosis policromasia
HIERRO+ EPO	PMN: 22±3 MN: 78±3	Macrocitosis policromasia

Tabla 1. Fórmula leucocitaria relativa en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.

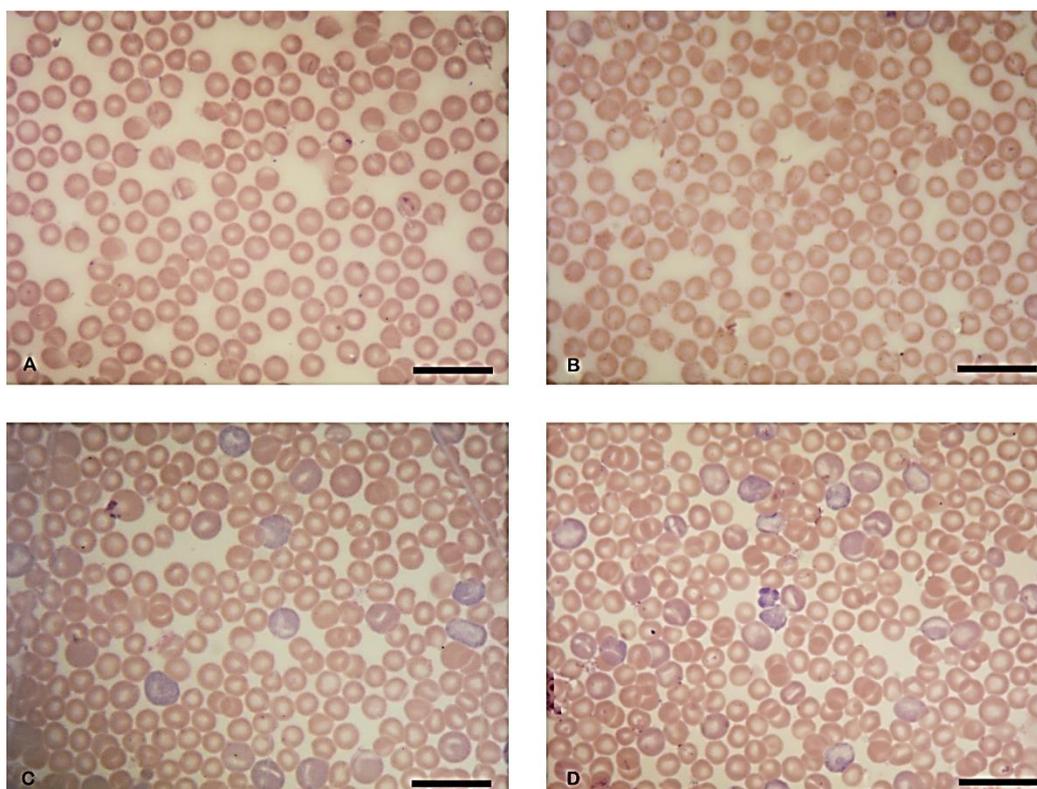


Figura 11. Observación de la serie eritrocitaria. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los extendidos sanguíneos se procesaron para tinción con May Grünwald-Giemsa según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.4 Recuento de Reticulocitos

En el modelo animal se observó un marcado aumento el número de reticulocitos en los grupos inyectados con EPO ($13,6 \pm 0,4\%$) y con hierro y EPO ($15,9 \pm 0,5\%$) respecto al Grupo Control ($4,3 \pm 0,1\%$) y al Grupo Sobrecarga de Hierro ($4,4 \pm 0,1\%$) (Figuras 12 y 13 C y D) indicando un aumento de la actividad eritropoyética. Valor de referencia en ratón: 1-5%

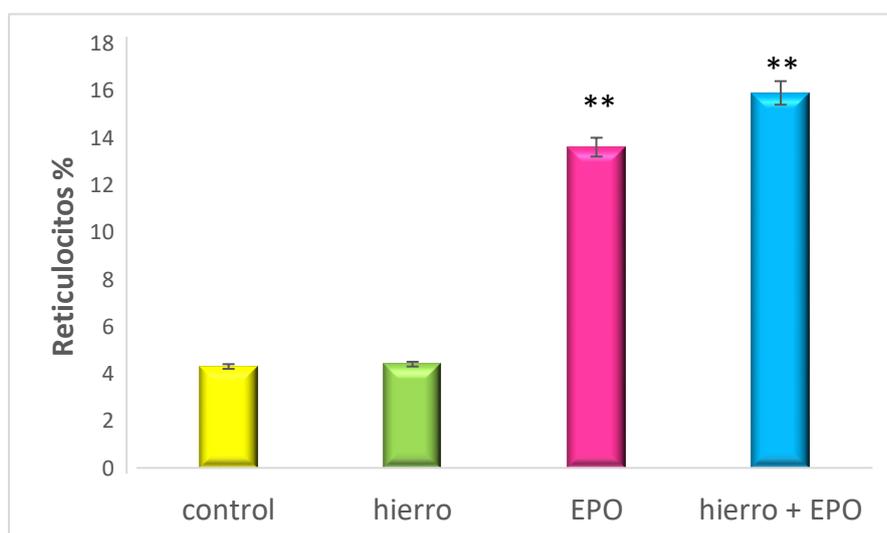


Figura 12. Recuento de reticulocitos. Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en %. $**p<0,01$

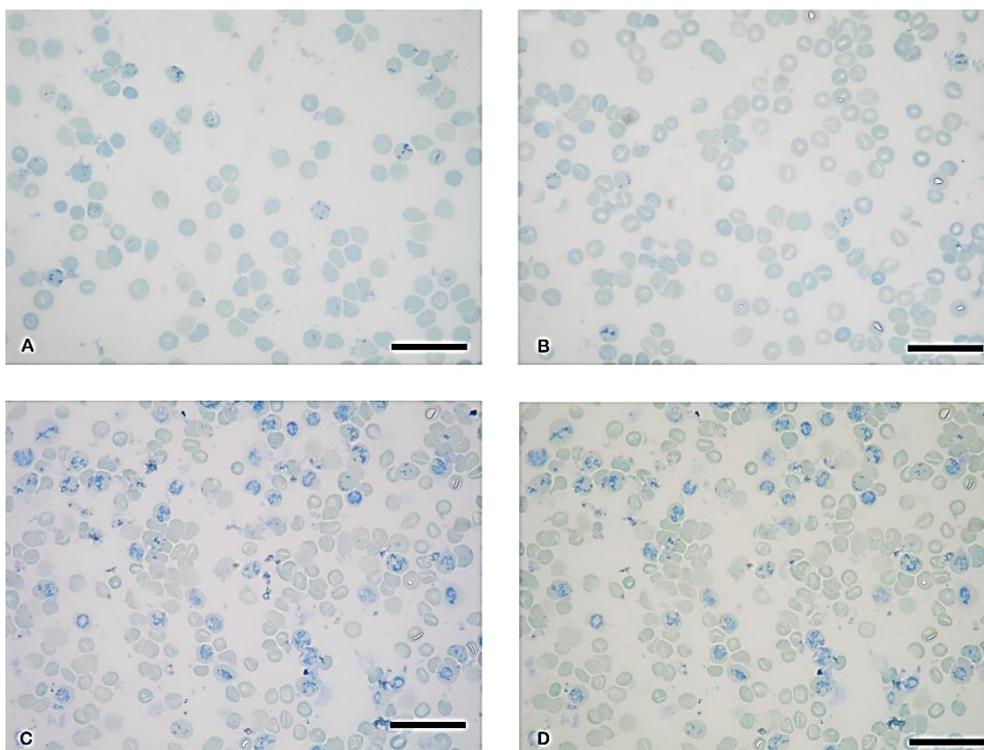


Figura 13. Observación de reticulocitos. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Las muestras sanguíneas se procesaron para tinción con Azul Brillante de Cresilo según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

5. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO SISTÉMICO

El aumento significativo de hierro sistémico en los grupos con hierro sacarato mostró la eficiencia de nuestro modelo animal de Sobrecarga de Hierro.

En este modelo observamos un aumento significativo en el nivel de hierro circulante en el Grupo Sobrecarga de Hierro ($591\pm 76\ \mu\text{g/dL}$) respecto al Grupo Control (SF) ($328\pm 57\ \mu\text{g/dL}$) (Figura 14).

Por otro lado, en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO el nivel de hierro circulante fue significativamente menor ($335\pm 65\ \mu\text{g/dL}$) respecto al Grupo Sobrecarga de Hierro siendo similar al Grupo Control.

En el Grupo EPO el nivel de hierro fue similar ($382\pm 61\ \mu\text{g/dL}$) al cuantificado en el Grupo Control.

Resultados

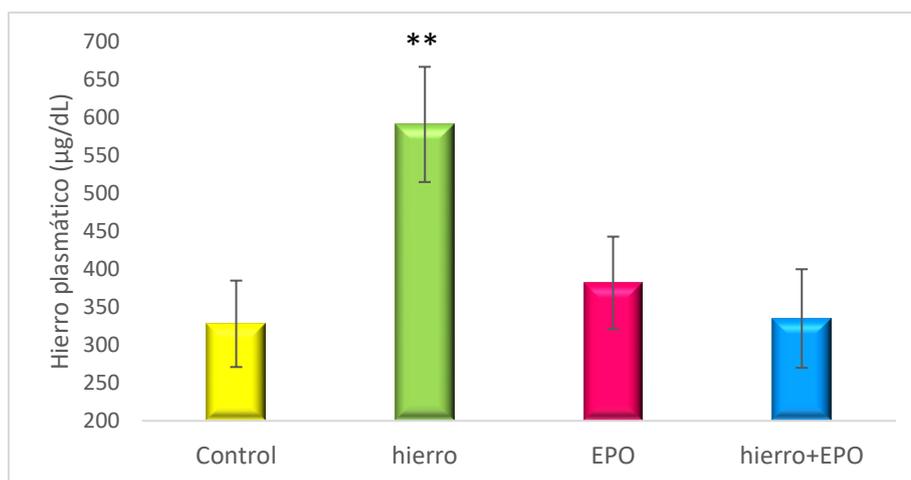


Figura 14. Cuantificación de hierro circulante. Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en µg/dL. ** $p < 0,01$

6. EVALUACIÓN DEL BAZO COMO ÓRGANO ERITROPOYÉTICO MURINO

6.1 Análisis del tamaño del Bazo

Para comprobar que el bazo es un órgano eritropoyético en el ratón se trata a los animales con eritropoyetina exógena. Luego del sacrificio, se realizó la necropsia y se extrajo el bazo. Cuando se comparó el tamaño del bazo se observó un aumento significativo de este órgano en las condiciones descritas respecto a los Grupos Control y Sobrecarga de Hierro (Figura 15 C y D). Estos resultados muestran una activa función eritropoyética en concordancia con estudios previos de nuestro laboratorio (Roque et al. 2008).

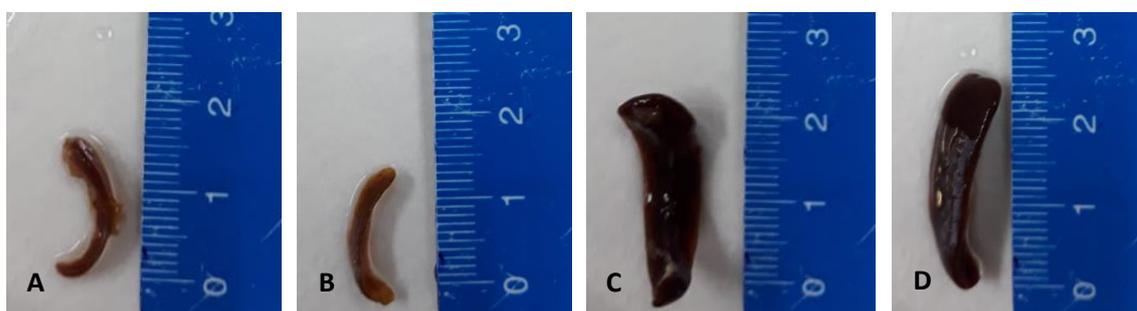


Figura 15. Observación macroscópica del bazo murino. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D).

6.2 Observación microscópica de la histología esplénica

Como ya se mencionó, el tejido esplénico se divide en dos grandes regiones, la pulpa blanca y la pulpa roja. La pulpa blanca contiene vainas linfáticas periarteriales o aglomerados de linfocitos T, que rodean la arteria central, y nódulos linfáticos o centros germinativos, formados por linfocitos B. La pulpa roja está formada por sinusoides y cordones, donde se visualizan fibras reticulares y

Resultados

amplia celularidad (eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, megacariocitos y granulocitos).

Nuestros resultados muestran una clara distribución y organización de las pulpas en el Grupo Control y Grupo Sobrecarga de Hierro; mientras que en los Grupos EPO y Sobrecarga de Hierro + EPO estas se encontraban desordenadas seguramente debido a la elevada eritropoyesis (Figura 16 C y D), (Roque et al. 2008).

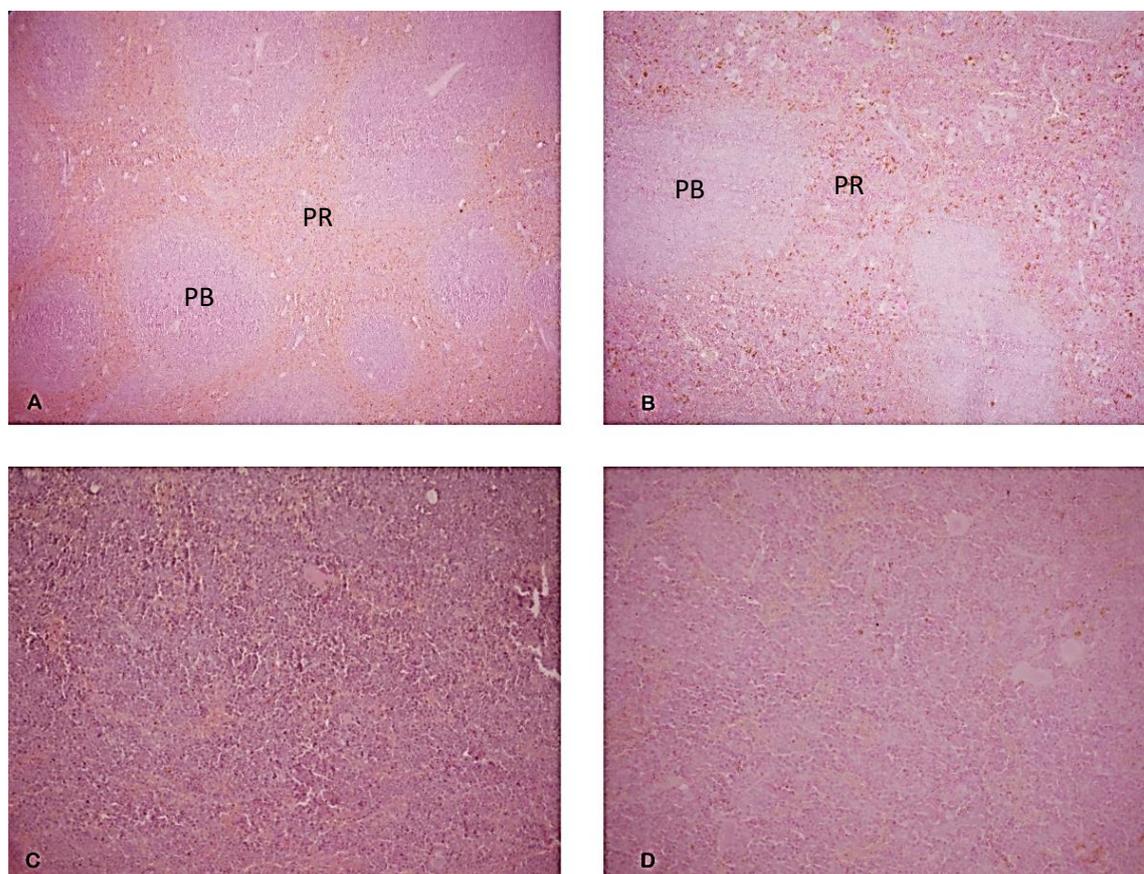


Figura 16. Histología esplénica. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). Aumento total 100x. PB: pulpa blanca, PR: pulpa roja.

6.3 Cuantificación de Hierro Tisular

Se observó que el Grupo Sobrecarga de Hierro presentó un aumento significativo del contenido de hierro ($5900,94 \pm 337,60 \mu\text{moles/gr}$ de tejido) respecto al Grupo Control ($1057,68 \pm 458,82 \mu\text{moles/gr}$ de tejido). El Grupo EPO mostró una disminución del contenido de hierro ($305,53 \pm 103,97 \mu\text{moles/gr}$ de tejido) respecto al Grupo Control (Figura 17), mostrando que la eritropoyesis disminuye los depósitos de hierro esplénicos. El Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO mostró un nivel de hierro similar al Grupo Control ($1163,22 \pm 227,38 \mu\text{moles/gr}$ de tejido) (Figura 17). Concluimos

Resultados

que en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO se estarían utilizando activamente los depósitos de hierro para participar en la eritropoyesis activa.

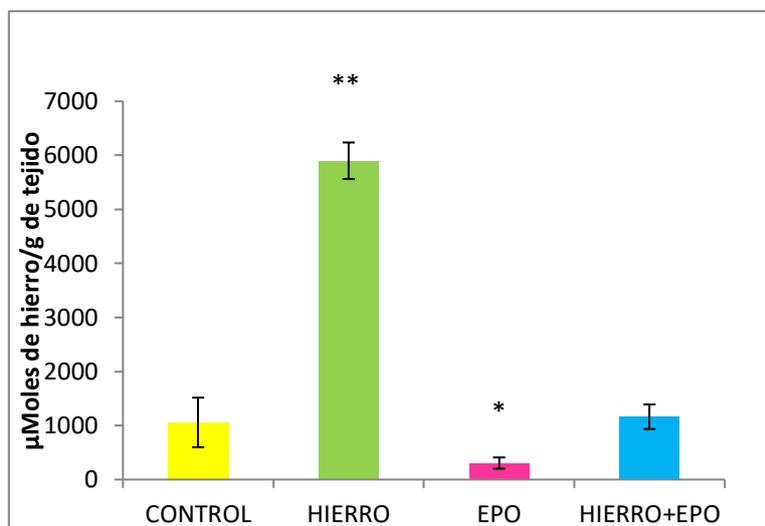


Figura 17. Cuantificación de hierro esplénico. Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en μ Moles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

6.4 Semicuantificación de Hierro Tisular

La hemosiderina es una forma de depósito de hierro férrico que se acumula principalmente en los macrófagos. Este pigmento puede ser detectado por la tinción de Perl's al formar el azul de prussia en presencia de ferrocianuro de potasio en medio ácido.

La semicuantificación microscópica de hemosiderina se realizó utilizando un score de 0 (ausencia) a 3 (presencia) (Figura 18).

En el Grupo Sobrecarga de Hierro se observó abundante hemosiderina comparado con el Grupo Control en donde se encontraba en forma moderada (Figura 19 B), en el Grupo EPO se observó escasa hemosiderina respecto al Grupo Control (Figura 19 C) y en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO se encontró similar hemosiderina que en el Grupo Control indicando una disminución respecto al grupo con hierro (Figura 19 D).

Resultados

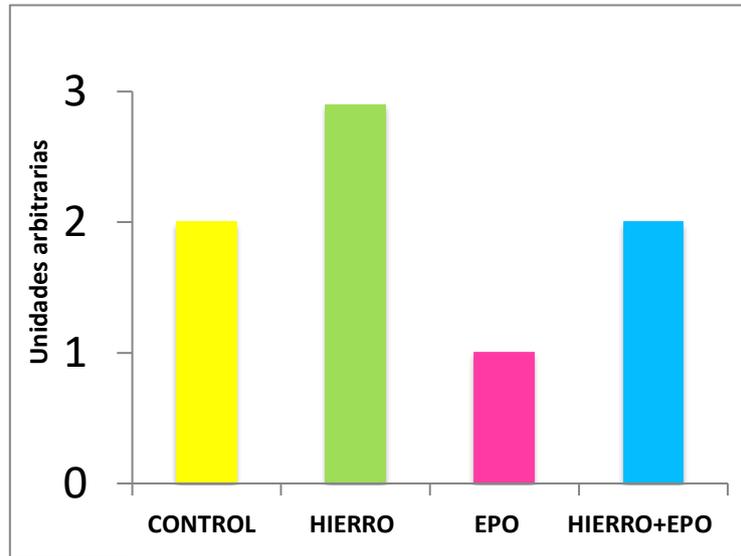


Figura 18. Semicuantificación de depósitos de hierro esplénico. Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en unidades arbitrarias.

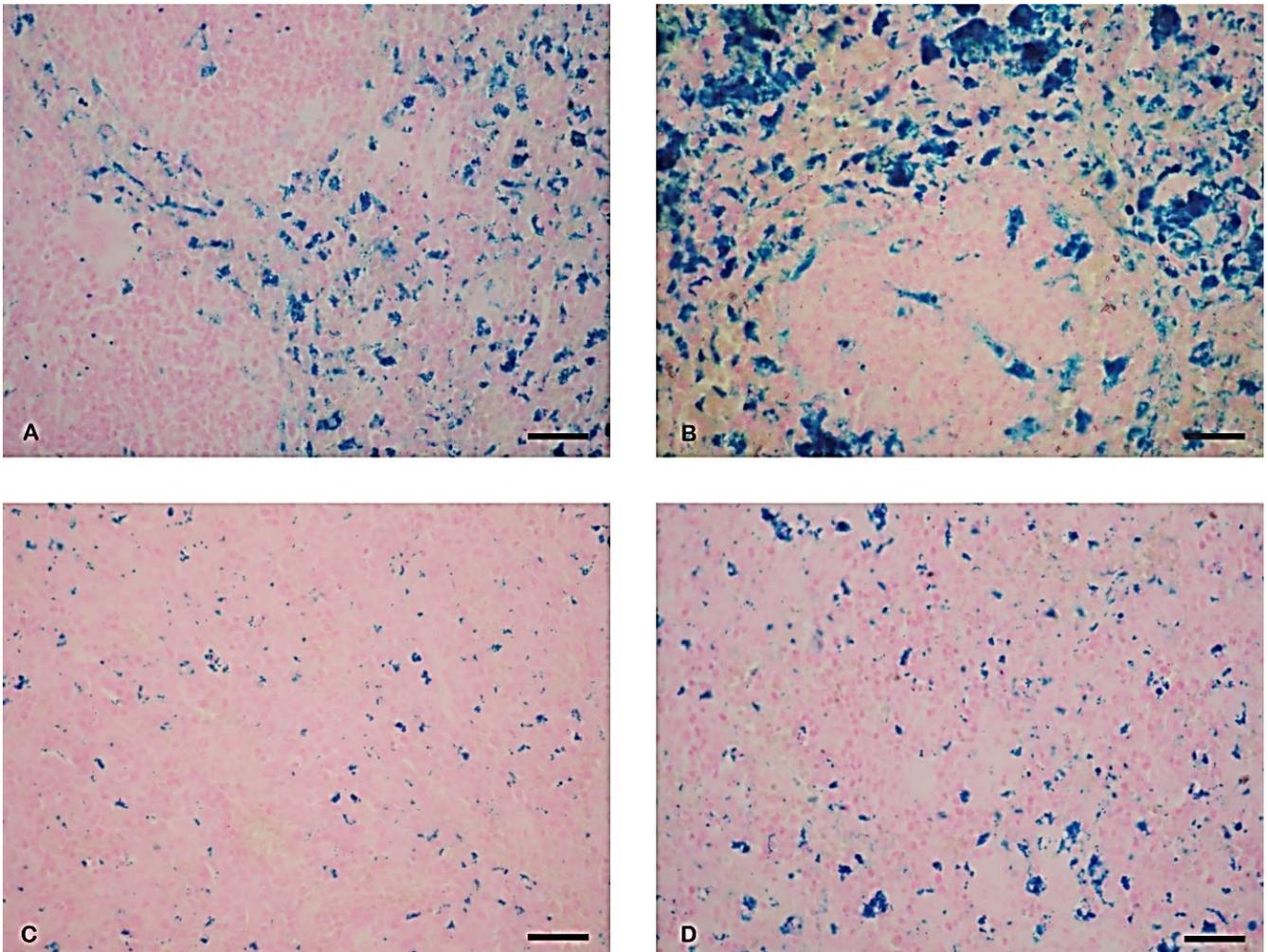


Figura 19. Observación de hemosiderina esplénica. Grupo basal o control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

1. ERITROPOYESIS

La eritropoyesis estimula la absorción de hierro y su liberación por parte de los macrófagos y los depósitos hepáticos (Ganz, 2018).

En condiciones normales la reutilización del hierro reciclado de las células senescentes conforma el mayor flujo de hierro en humanos (Ganz y Nemeth, 2015).

Los macrófagos del sistema reticuloendotelial, distribuido en distintos tejidos como bazo, hígado y médula fagocitan a los eritrocitos senescentes o dañados. Durante este proceso degradan la hemoglobina liberando al grupo hemo por la acción de la enzima hemo oxigenasa (HO) se libera el hierro que retornará al plasma sanguíneo (Poss y Tonegawa, 1997).

Nuestros estudios muestran que la eritropoyesis está estimulada en los animales inyectados con EPO. Además, la alta producción eritrocítica requiere mayor consumo de hierro por los órganos eritropoyéticos, reduciendo los niveles de hierro plasmático.

Estos resultados sugieren que en presencia de EPO el hierro circulante estaría siendo utilizado en el proceso eritropoyético.

A partir del efecto de EPO sobre el hierro plasmático, nos propusimos estudiar si EPO podría tener un rol protector frente a estados de exceso del biometal disminuyendo el hierro plasmático, y evitando su acumulación tisular y reduciendo su toxicidad.

2. NIVEL DE HIERRO

En nuestro modelo animal se evaluó la eficiencia de la sobrecarga de hierro por el aumento de hierro plasmático en el Grupo Sobrecarga de Hierro basándonos en estudios previos de nuestro laboratorio (D'Anna y Roque 2013, Giorgi y Roque 2014). Además, observamos la disminución de los niveles de hierro plasmático en presencia de eritropoyetina demostrando la eritropoyesis activa, que se evidencia en presencia de EPO.

3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Por otra parte, nuestros resultados mostraron una leve disminución en los valores de Hb y HTO en exceso de hierro respecto a condiciones basales, en concordancia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Giorgi y Roque, 2014).

4. ERITROPOYESIS ESPLÉNICA

Cabe destacar que en humanos el bazo posee una función eritropoyética en la vida fetal y solo en condiciones patológicas en la vida adulta (Han et al. 1997).

Por el contrario, el bazo es el principal órgano eritropoyético extramedular en roedores. Esta función clave del bazo en la producción de eritrocitos explica los altos niveles de hierro esplénico que detectamos en condiciones basales.

Además, en nuestro modelo de sobrecarga de hierro, demostramos que en exceso de hierro los macrófagos de la pulpa roja se sobrecargan de hierro en forma de L-ferritina y hemosiderina, convirtiéndose en un órgano de depósito.

En este sentido, Whittaker et al. (1996) observaron hemosiderina en los macrófagos de los sinusoides esplénicos de ratas tratadas con una dieta con carbonilo de hierro, siendo más abundante a mayores dosis.

Por otro lado, el aumento macroscópico del tamaño del bazo y la pérdida de la arquitectura microscópica en los grupos tratados con EPO reflejarían la incrementada eritropoyesis esplénica.

En este sentido Roque et al. (2008) reportaron esplenomegalia y reducción de hemosiderina en un modelo murino de anemia hemolítica inducida con fenilhidrazina. Nuestros resultados reflejan la conocida función esplénica en el suministro del hierro requerido para la eritropoyesis activa demostrado por la disminución de hemosiderina y L-ferritina en los grupos con EPO.

Whittaker et al. (1996) observaron atrofia esplénica en presencia de hierro con una pérdida celular afectando la zona marginal de la pulpa blanca, en un modelo de ratas tratadas con exceso de hierro dietario.

En concordancia con nuestros resultados, Fenjves et al. (2003) demostraron aumento del número de eritrocitos, hemoglobina y plaquetas asociado a esplenomegalia en un modelo de ratones que sobreexpresan EPO.

Ganz (2018) demostró que al inyectar ratones con EPO o exponerlos a una pérdida sanguínea la concentración de hepcidina y su ARNm disminuyen.

5. PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

5.1 PROTEÍNAS IMPORTADORAS Y DE DEPÓSITO DE HIERRO

En nuestro modelo animal reportamos a los importadores DMT1 y ZIP14 como los responsables de la captación de hierro esplénica en exceso cuya expresión aumentó significativamente en respuesta al exceso de hierro.

Theurl et al. (2005) observaron la disminución de la expresión del ARNm de DMT1 en bazo en respuesta al exceso de hierro, esta diferencia en los resultados podría explicarse por la alta presencia de la isoforma no IRE de DMT1 en bazo.

La mayor captación de hierro observada en sobrecarga de hierro coincide con su mayor acumulación intracelular en forma de L-ferritina y hemosiderina, sumada a la menor exportación del biometal por FPN (eje hepcidina-FPN) estudiado previamente en nuestro laboratorio (D'Anna y Roque 2013).

En presencia de EPO la disminución de la expresión de DMT1 y ZIP14 indicaría que la pulpa roja no captaría grandes cantidades de hierro, sino que el biometal sería utilizado en el proceso de eritropoyesis.

La señal de EPO fue la preponderante en el modelo combinado de sobrecarga de hierro y eritropoyesis.

5.2 PROTEÍNA REGULATIVA HEPCIDINA

En este trabajo pudimos demostrar que en ratones con dosis ip. De EPO la expresión de hepcidina disminuye vía el eje eritropoyetina-hepcidina-ferroportina de acuerdo a estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio (D'Anna y Roque 2013).

Este resultado podría conducir a un aumento de la expresión de FPN inducido por la disminución de la expresión de hepcidina y en consecuencia una mayor liberación de hierro por parte de los macrófagos esplénicos para ser utilizado en la eritropoyesis activa.

En presencia de hierro la expresión de prohepcidina sugeriría una mayor síntesis de hepcidina que interactúa con el exportador FPN induciendo su internalización y degradación como fue demostrada por Nemeth et al. (2004).

De esta manera, la alta expresión de hepcidina en los ratones con sobrecarga de hierro podría reducir la exportación de hierro favoreciendo el aumento observado en los depósitos del biometal.

En este sentido, en un modelo combinado de sobrecarga de hierro e hipoxia en ratón desarrollado previamente en nuestro laboratorio, se demostró que en estados de hipoxia

aumentaban los niveles de EPO y disminuía prohepcidina hepática (D'Anna y Roque, 2013). Por otro lado, en el bazo aumentó la expresión del exportador de hierro FPN (D'Anna y Roque, 2013).

En condiciones basales, FPN se identificó en el citoplasma y en la membrana plasmática de macrófagos esplénicos (D'Anna, Giorgi and Roque 2011).

5.3 RESPUESTA DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO A EPO

En nuestros estudios demostramos que en bazo las proteínas del ciclo del hierro responden a eritropoyetina como señal predominante al igual que el hígado y el corazón como se describirá más adelante en capítulos posteriores.

De esta forma, se asegura una adecuada liberación de hierro desde los macrófagos mediada por FPN y su biodisponibilidad para el proceso eritropoyetico.

En nuestros estudios demostramos la disminución de la expresión de los importadores de hierro DMT1 y ZIP14 en presencia de EPO en bazo disminuyendo la captación de hierro lo que conduce a una menor acumulación del mismo en forma de L ferritina y hemosiderina.

En este sentido Kong et al. (2008) observaron que al tratar ratas con EPO (3 D/500UI/día subcutáneo) disminuía la expresión de DMT1 e incrementaba la de FPN en macrófagos peritoneales. Estos resultados sugieren una disminución de hierro en macrófagos del sistema reticuloendotelial para aportar a la medula ósea en el proceso de eritropoyesis.

6. CONCLUSIONES

Los estudios presentados en este capítulo nos permitieron caracterizar y optimizar el modelo animal combinado de Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis, como el Modelo biológico utilizado para el desarrollo del Trabajo de Tesis.

El modelo de ratón nos permitió comprobar que la administración de eritropoyetina exógena tiene un efecto favorable disminuyendo la sobrecarga de hierro en ratones. Como se desprende de las vías de regulación (Esquema 1), podemos concluir que la regulación negativa de la expresión de las proteínas del ciclo del hierro por EPO aumentó la biodisponibilidad de hierro para la eritropoyesis activa.

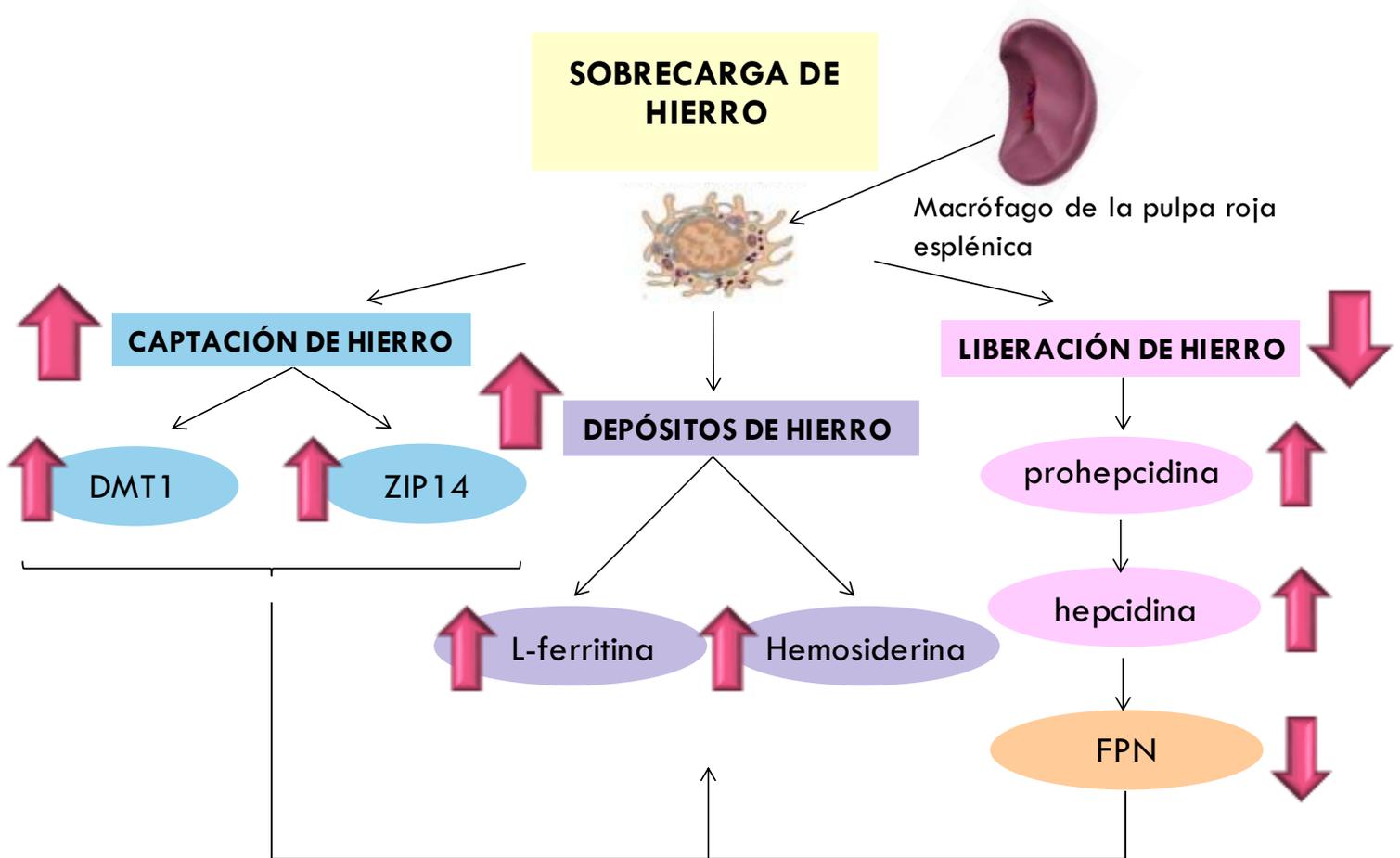
Además, concluimos que la señal predominante en este modelo combinado es la de eritropoyetina.

En este contexto, el hallazgo a destacar en este trabajo es que reportamos por primera vez que la eritropoyetina podría presentar un rol protector en estados de sobrecarga de hierro disminuyendo

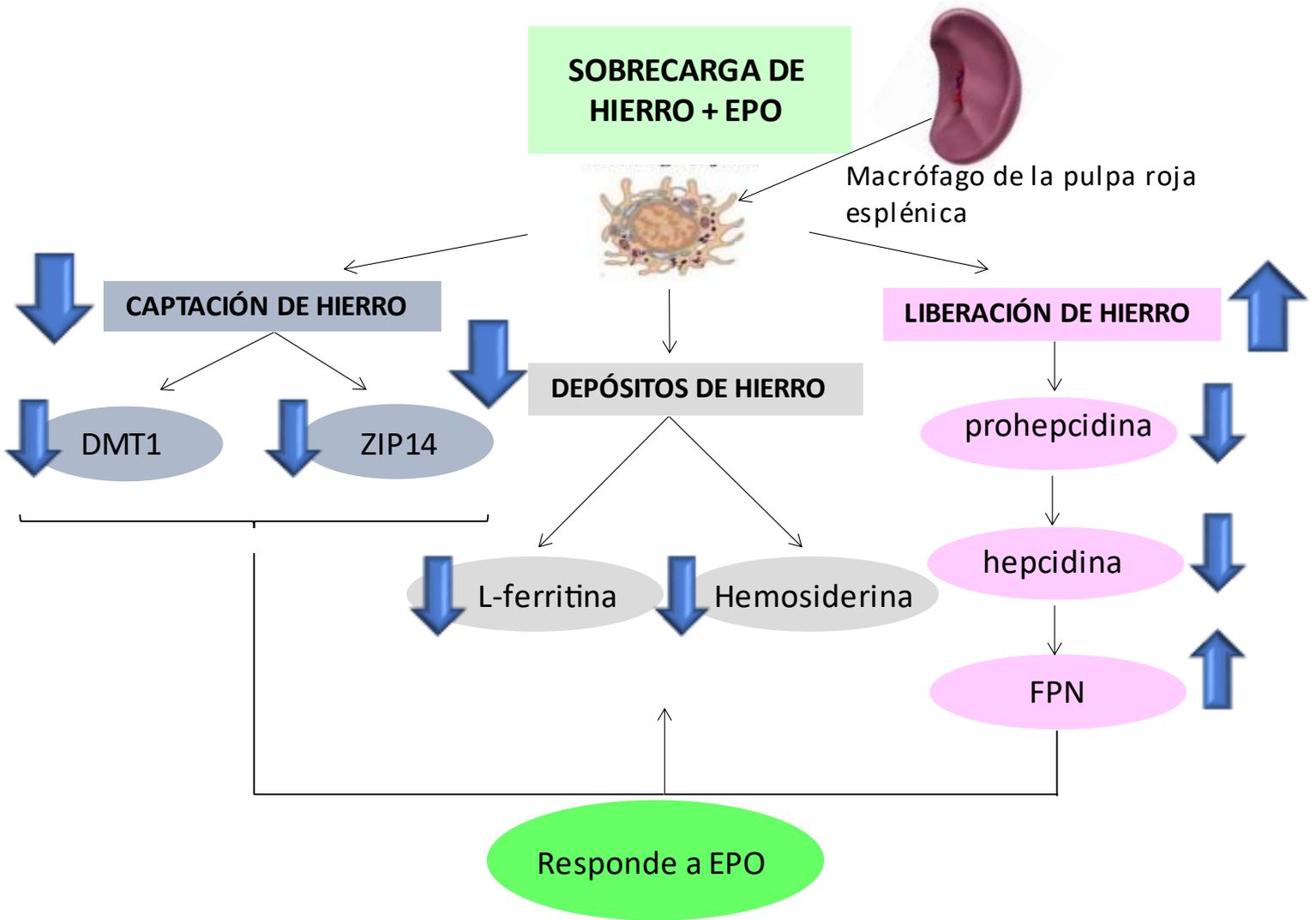
Discusión

el exceso de hierro circulante y los depósitos esplénicos, evitando así que el biometal se deposite en órganos susceptibles.

Estos resultados le adjudicarían a la EPO un rol en el tratamiento terapéutico en patologías originadas por exceso de hierro.



A



B

Esquema 1. Manejo del hierro esplénico por los macrófagos de la pulpa roja en estados de Sobrecarga de Hierro (A), y Sobrecarga de Hierro + EPO (B). En el esquema se muestra como aumenta o disminuye la expresión de los transportadores de hierro DMT1 y ZIP14, los depósitos del biometal como L-ferritina y hemosiderina y la liberación de hierro por la vía mediada por el eje hepcidina-FPN. Se muestra como en el modelo combinado la señal de EPO resulta ser la señal preponderante.

Capítulo 2

Modelo Animal

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

***Absorción y movilización
celular de hierro***

Duodeno

Hígado

Riñón

1. INTRODUCCIÓN

Si bien es ampliamente conocido que el hierro es absorbido a nivel intestinal en los enterocitos de las vellosidades intestinales del duodeno y el yeyuno proximal (Frazer y Anderson, 2005), los mecanismos de absorción y la transferencia hacia el principal sitio de depósito, el hígado, en estados de exceso del biometal son poco comprendidos.

El transportador DMT1 se localiza en el borde en cepillo de los enterocitos duodenales y transporta hierro en estado ferroso hacia el interior celular (Frazer y Anderson, 2005). Canonne-Hergaux et al. (1999) demostraron la reducción de la expresión de DMT1 cuando se ingieren dietas ricas en hierro.

En nuestro laboratorio se reportó el cambio en la expresión y localización del importador de hierro duodenal DMT1 en estados de sobrecarga de hierro (Giorgi y Roque, 2014).

El exportador FPN se localiza en la membrana basolateral del enterocito y la proteína hepcidina es el principal regulador de los depósitos de hierro mediante la degradación de FPN y la regulación del eflujo de hierro duodenal.

Es bien conocido que el hígado es el principal órgano de depósito de hierro en estados de exceso y que hepcidina es sintetizada principalmente por este órgano (Park et al. 2001).

El hígado y el duodeno participan en el control de la biodisponibilidad del hierro a través de la regulación de las vías de su movilización celular.

El riñón además de ser el sitio de síntesis de la eritropoyetina es un importante órgano en la regulación del ciclo del hierro.

La presencia de transportadores de hierro como DMT1 y RTf1 en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal sugieren la reabsorción de hierro proveniente del filtrado (Zhang et al. 2007; Smith-Thevenod 2009; Canonne-Hergaux y Gros 2002).

El exceso de hierro ha sido asociado con daño renal, aumento de la reabsorción de transferrina y acumulación tisular de hierro (Smith-Thevenod 2009).

El hierro en exceso induce la formación de ROS en las células del túbulo proximal y contribuye a la progresión de proteinuria y enfermedad renal crónica (Shah et al. 2007).

Estudios recientes han demostrado otra función no eritropoyética de la EPO revelando el rol de la citoquina en la regeneración hepática y renal tanto en estudios in vitro como in vivo (Kim et al. 2020; Vesey et al. 2004).

En este contexto Kim et al. (2020) coadministraron hierro y eritropoyetina a un modelo animal de ratas y observaron la regeneración hepática.

La actividad citoprotectora de EPO también ha sido observada en otros tejidos como páncreas, pulmón y en neuronas (Fenjves et al. 2003; Bany-Mohammed et al. 1996; Pregi et al. 2006).

Este capítulo se focaliza en el estudio de la captación, depósito y manejo del hierro por el duodeno, hígado y riñón en estados de sobrecarga de hierro y en un modelo combinado de sobrecarga de hierro y eritropoyesis con el fin de evaluar si EPO presenta un rol protector sobre estos órganos cuando ambos estímulos coexisten.

Dilucidar la coordinación funcional entre estos órganos es un aspecto central para el estudio de enfermedades asociadas a alteraciones del ciclo del hierro.

1. TEJIDO DUODENAL

2.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA INTESTINAL

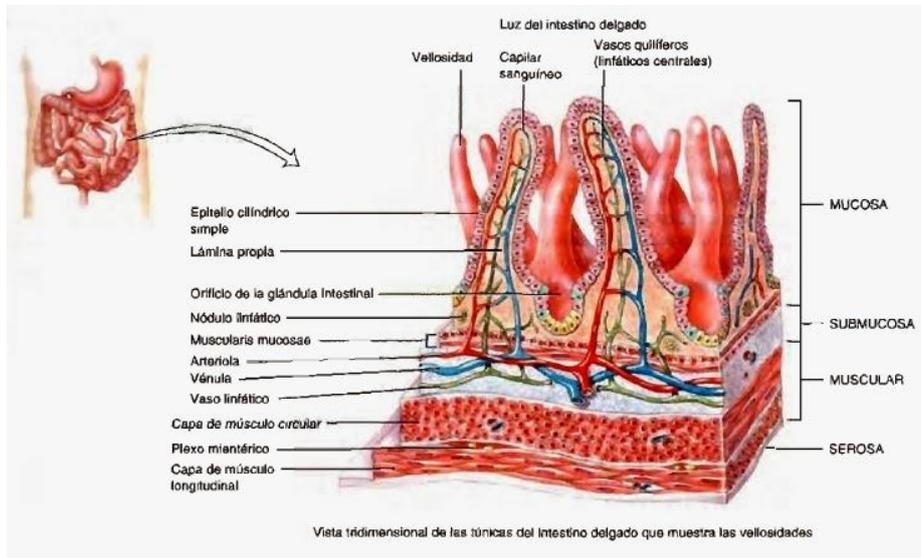
La relación entre estructura y función revela una amplia superficie absortiva formada por pliegues circulares de la mucosa y submucosa y por plegamientos de la mucosa o vellosidades y de la membrana de los enterocitos o microvellosidades.

La vellosidad se proyecta hacia la luz intestinal y está cubierta por un epitelio cilíndrico simple compuesto principalmente por enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas.

Los enterocitos son células cilíndricas que actúan en la digestión y en la absorción de agua y nutrientes.

El epitelio de la base de las vellosidades se invagina hacia el lado opuesto de la luz tubular formando las criptas de Lieberkühn, que se abren a la luz intestinal a través de poros. La base de la cripta intestinal contiene células de Paneth, que secretan moléculas antibacterianas, y células madres, que se dividen por mitosis para renovarse a sí mismas y para producir las células diferenciadas de la mucosa intestinal (Esquema 1).

Resultados



Esquema 1. Histología duodenal. Principios de Anatomía y Fisiología.
Tortora

En el modelo animal no observamos diferencias en la arquitectura duodenal entre los cuatro grupos estudiados (Figura 1), observando una histología conservada en los 4 estados por la tinción de hematoxilina y eosina. De color marrón se observó abundante hierro en ambos grupos que contenían hierro.

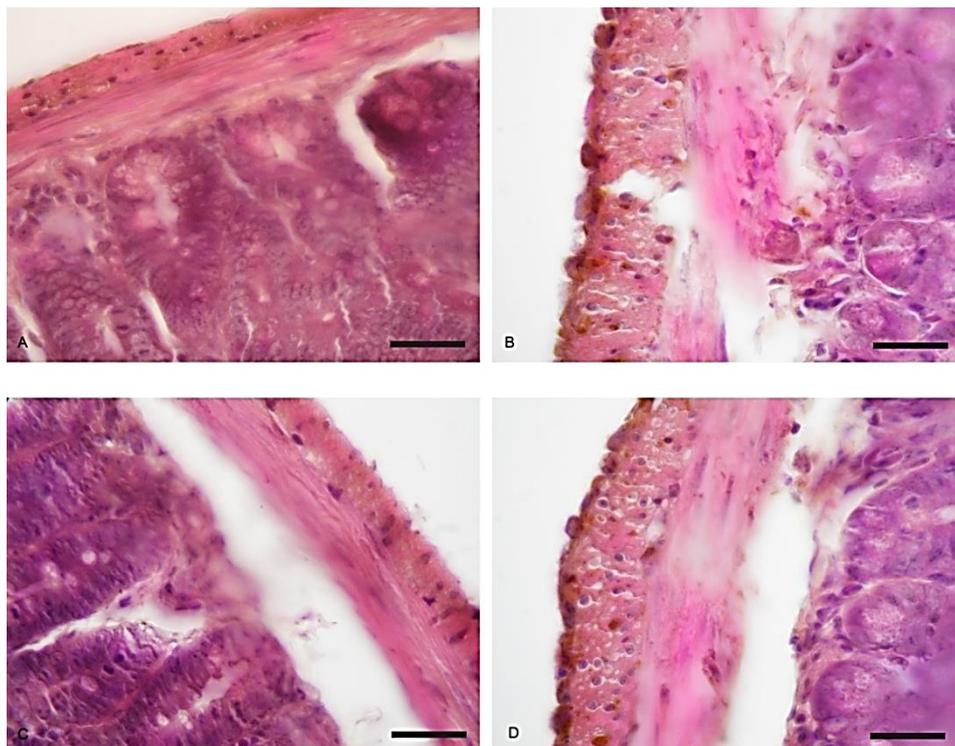


Figura 1. Histología duodenal en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro y EPO. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3$ /grupo). La barra representa 20 μ m.

2.2 EVALUACIÓN DEL HIERRO TISULAR

Semicuantificación de Hemosiderina

Observamos presencia de abundante hierro en forma de hemosiderina en el tejido conectivo externo del duodeno en ambos grupos inyectados con hierro (Figura 2 B y D). Dicho pigmento se encontraba ausente en el grupo control y en el de EPO (Figura 2 A y C).

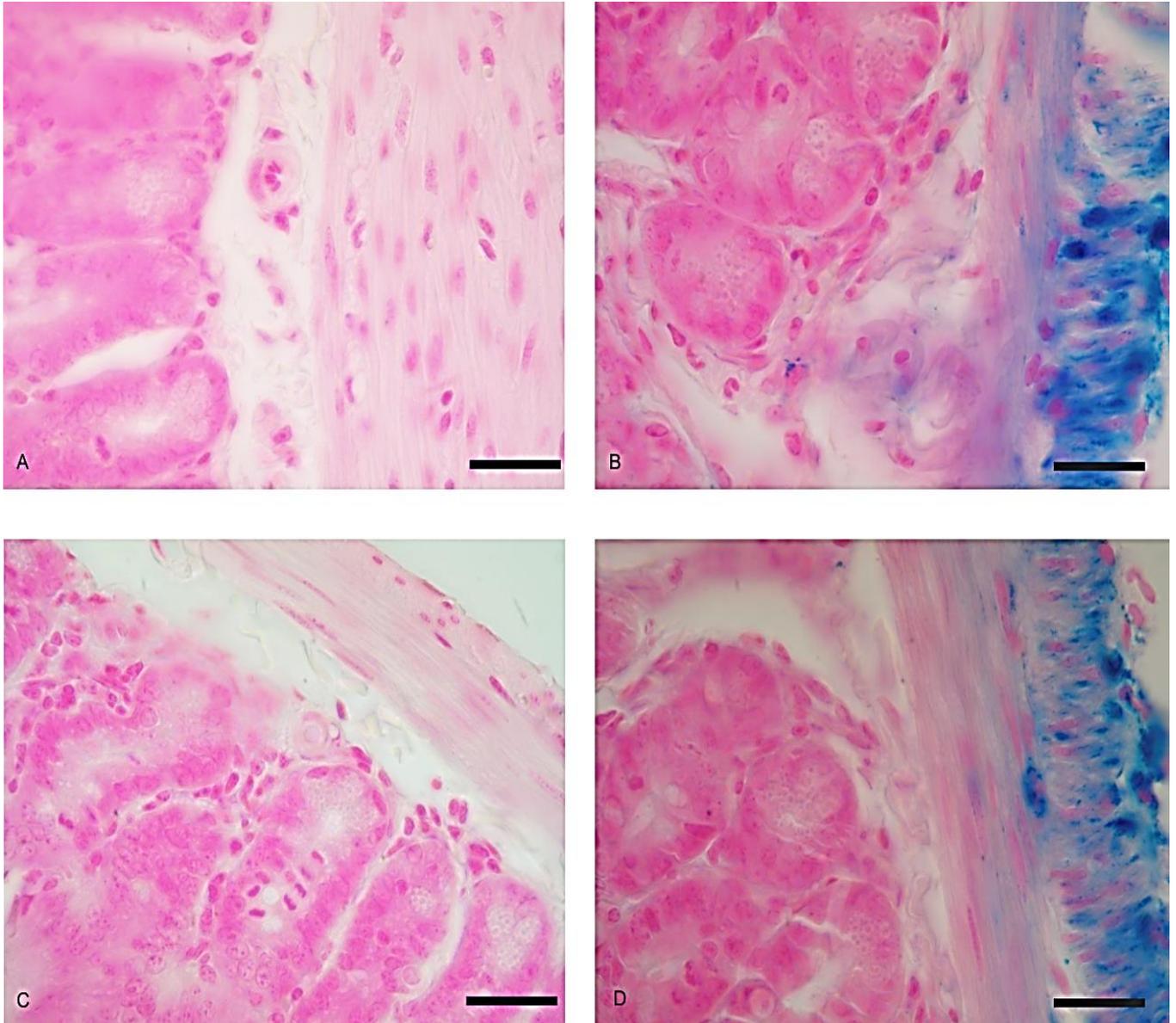


Figura 2. Hemosiderina duodenal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

2.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO DUODENALES

2.3.1 Transportador de Metales Divalentes 1

En adecuado hierro se observó que DMT1 se inmunolocaliza en el citoplasma de enterocitos con una distribución homogénea, mientras que en sobrecarga de hierro la expresión citoplasmática de DMT1 se identificó en la zona perinuclear (Figura 3 B). En presencia de eritropoyetina se observó el cambio de localización del importador de forma membranánea, siendo ésta la señal predominante en el grupo combinado (Figura 3 D) sugiriendo una mayor captación de hierro duodenal.

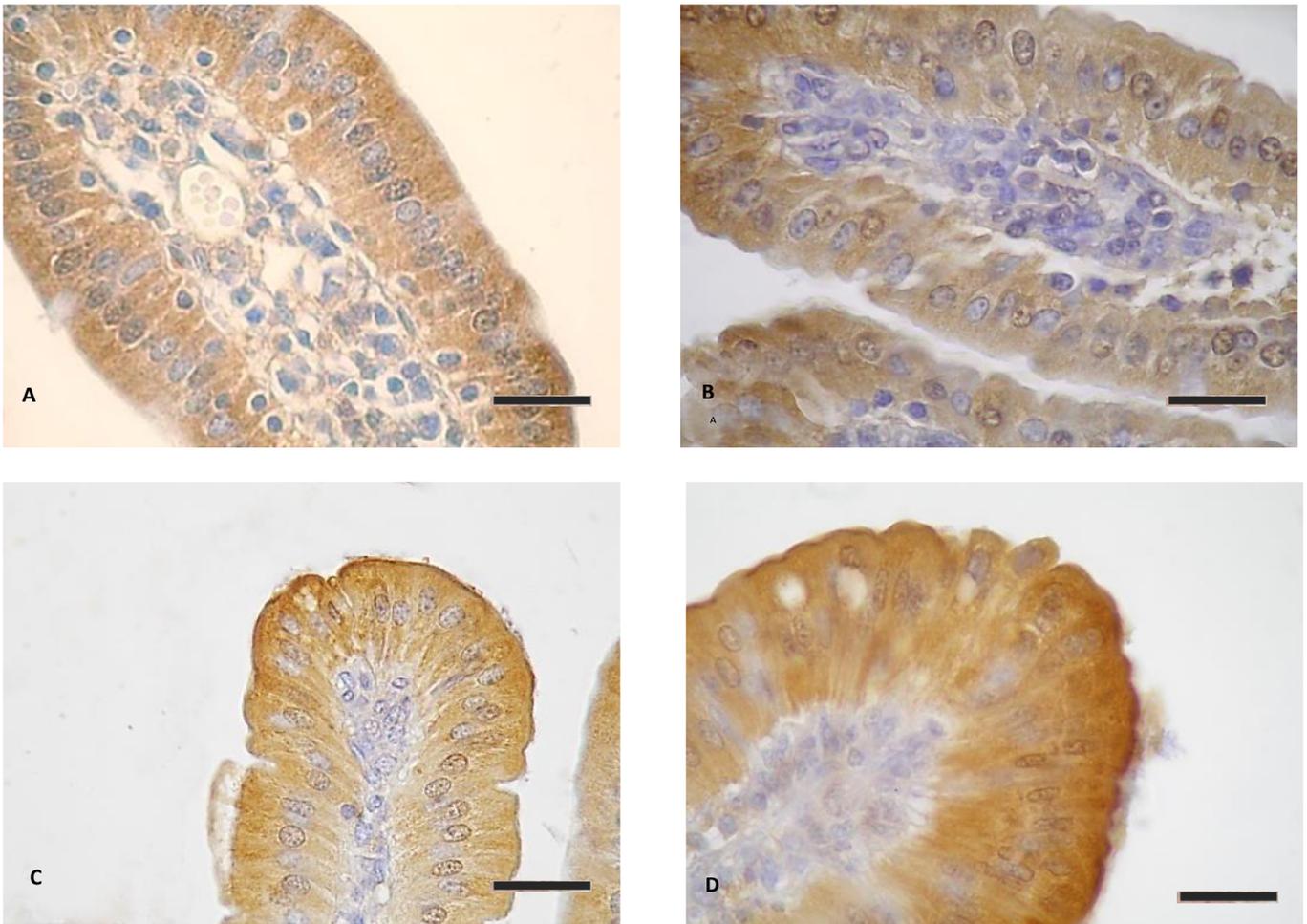


Figura 3. Inmunomarcación de DMT1 duodenal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de hematoxilina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μm .

Resultados

2.3.2 Transportador ZIP14

En condiciones basales y en presencia de EPO se observó una marcada expresión de ZIP14 localizado en la membrana celular del enterocito y en el citoplasma celular (Figura 4 A y C).

En ambos grupos con hierro se observó una marcada disminución de la expresión de ZIP14 (Figura 4 B y D) que nos conduce a hipotetizar la presencia de un mecanismo protector en exceso de hierro para disminuir la captación celular.

La señal de hierro es la señal predominante en el grupo combinado.

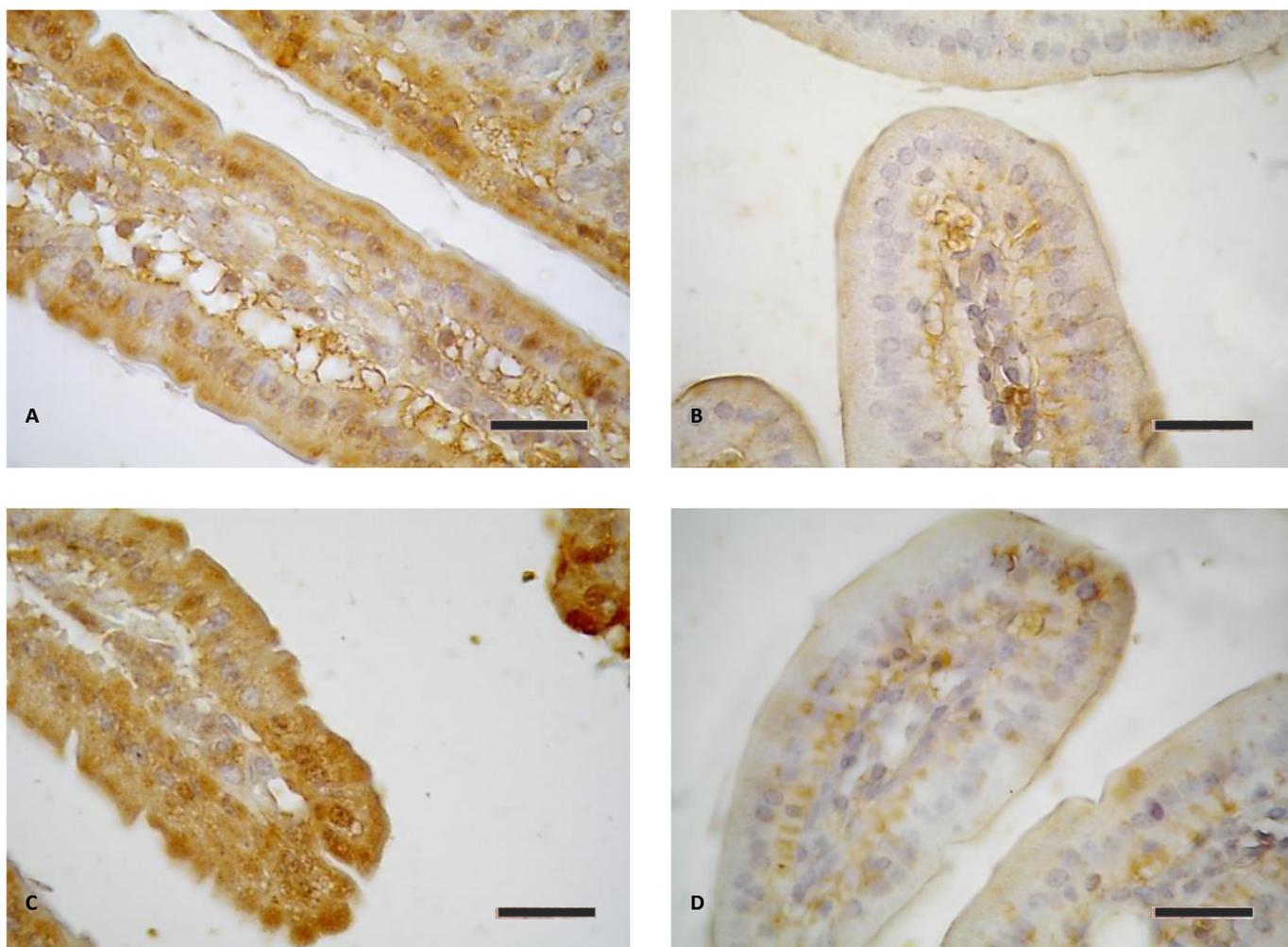


Figura 4. Inmunomarcación de ZIP14 duodenal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de hematoxilina lo descrito en materiales y métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

2.3.3. Control negativo de inmunomarcación

El control negativo duodenal para las proteínas clave del ciclo del hierro estudiadas no mostró marcación al ser incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario (Figura 5).



Figura 5. Control negativo duodenal. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de hematoxilina según lo descrito en *Materiales y Métodos*. La barra representa 20 μm .

3. HÍGADO

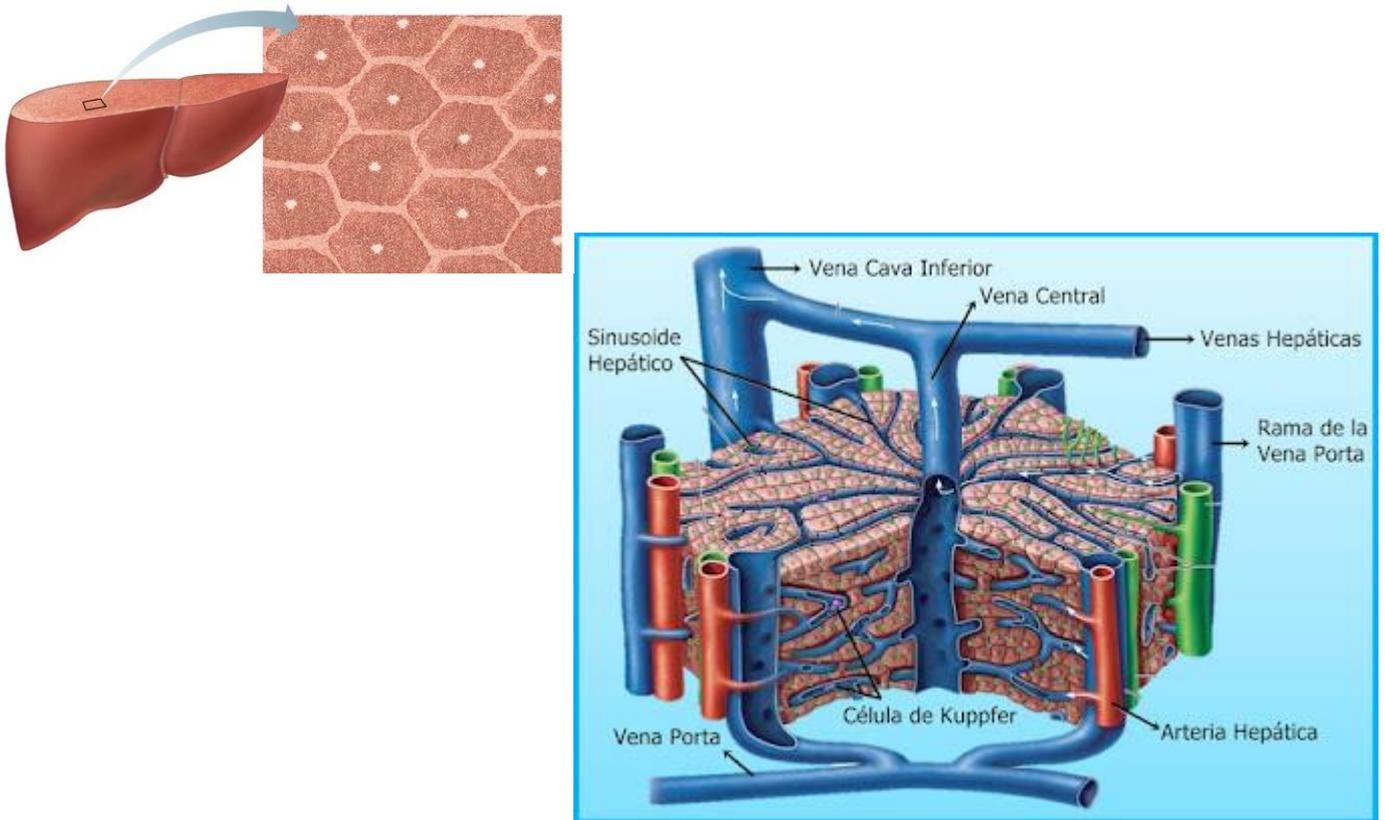
3.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano de depósito de hierro por excelencia, que se sitúa en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, por debajo del diafragma y por encima del estómago, riñón derecho y del intestino.

El hígado cumple múltiples funciones basadas en sus características estructurales y en el aporte de la sangre desde la circulación sistémica y la circulación portal desde la vena porta. Los lóbulos hepáticos están formados por unidades más pequeñas llamadas lobulillos, llamados unidades funcionales hepáticas.

Resultados

Los lobulillos tienen una estructura hexagonal característica con una vena lobulillar central. En los vértices del hexágono se localiza la tríada portal formada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (Esquema 2).



Esquema 2. Histología hepática.

No observamos diferencias con la tinción de hematoxilina y eosina en ninguna de las 4 condiciones evaluadas en el modelo animal estudiado (Figura 6). Se observa coloración marrón por la presencia de hierro los macrófagos hepáticos, células de Kupffer, en ambas condiciones inyectadas con hierro (Figura 6 B y D).

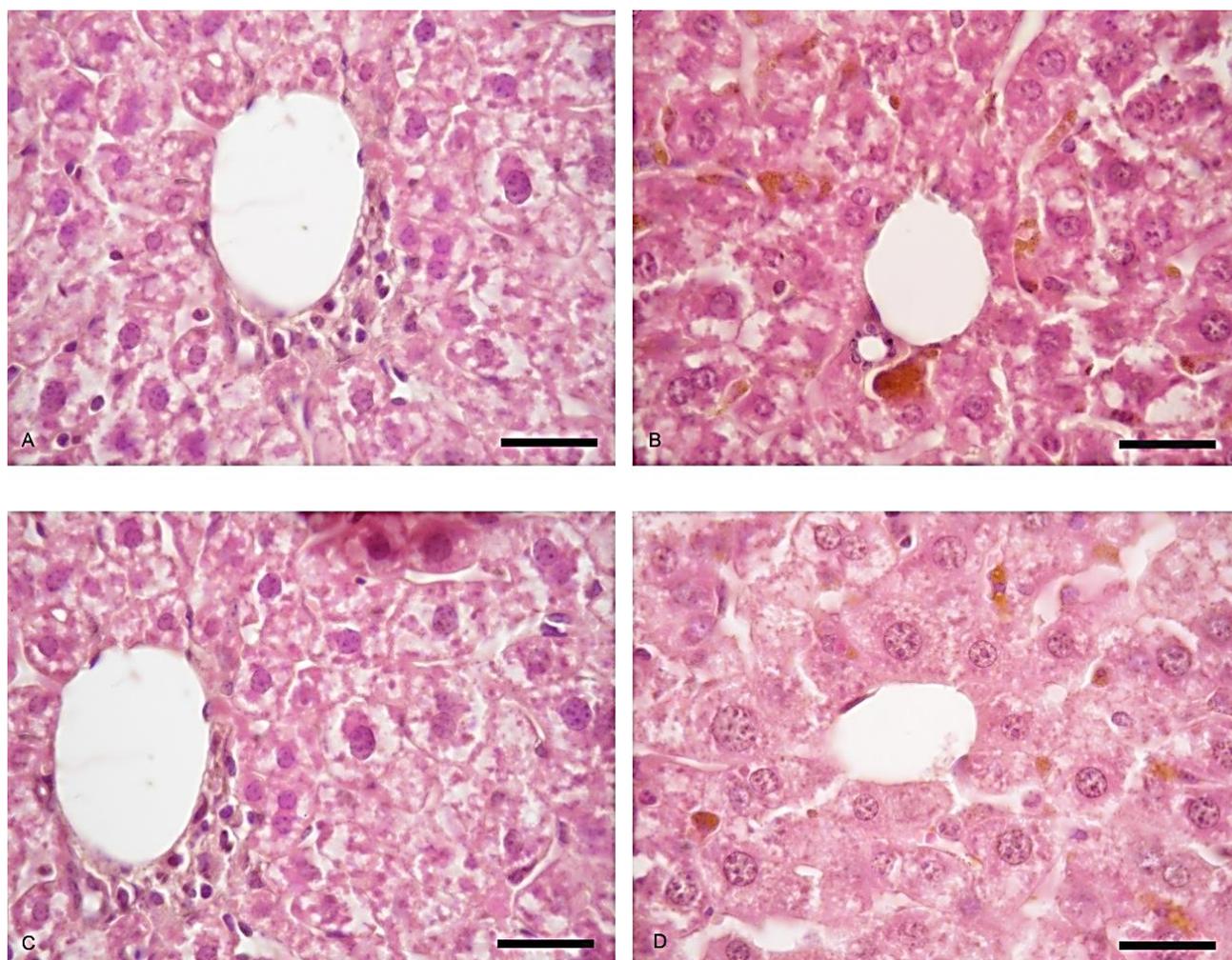


Figura 6. Histología hepática en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro y EPO. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de hierro+ EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

3.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO HEPÁTICO

3.2.1 Cuantificación de hierro tisular

Como se muestra en la figura 7 se detectó un aumento significativo del nivel de hierro tisular en el grupo de animales inyectado con hierro ($839 \pm 133\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) respecto al grupo control ($52 \pm 17,2\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) y al de EPO ($28,8 \pm 12\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) indicando la eficiencia de la sobrecarga de hierro.

En el grupo combinado ($535 \pm 40,6\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) observamos una disminución significativa del nivel de hierro respecto al grupo de sobrecarga de hierro (Figura 7) sugiriendo el rol protector de EPO que se manifiesta disminuyendo los depósitos de hierro hepáticos en estados de exceso.

Resultados

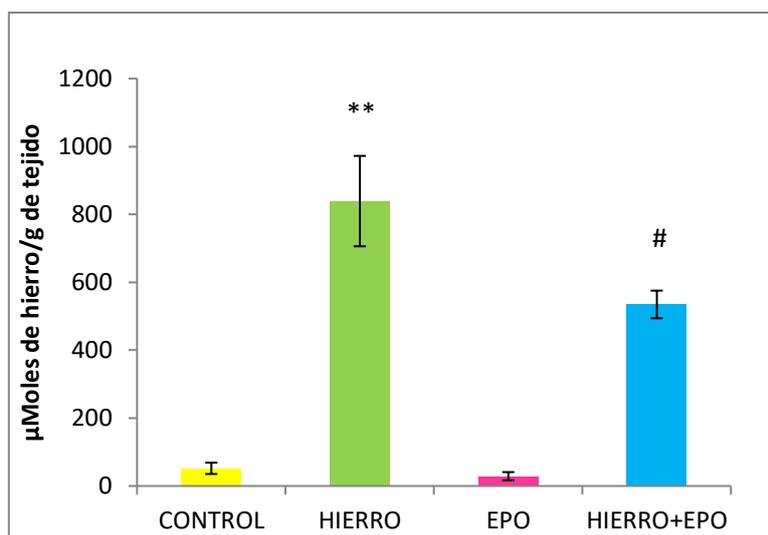


Figura 7. Cuantificación de hierro hepático. Valores expresados en μ Moles de hierro/g de tejido. ** $p < 0.01$ # $p < 0.05$

3.2.2 Semicuantificación de Hemosiderina

En el grupo control y en el grupo de EPO observamos ausencia del pigmento hemosiderina (Figura 9 A y C) reflejando los grandes depósitos de hierro en el grupo de sobrecarga de hierro se observó abundante hemosiderina.

En el grupo combinado observamos una disminución del pigmento respecto a la condición de sobrecarga (Figura 9 B y D). Los depósitos de hierro en forma de hemosiderina se semicuantificaron utilizando una escala arbitraria (de 0 a 3) en donde 0 indica ausencia de hemosiderina y 3 abundante hemosiderina (Figura 8).

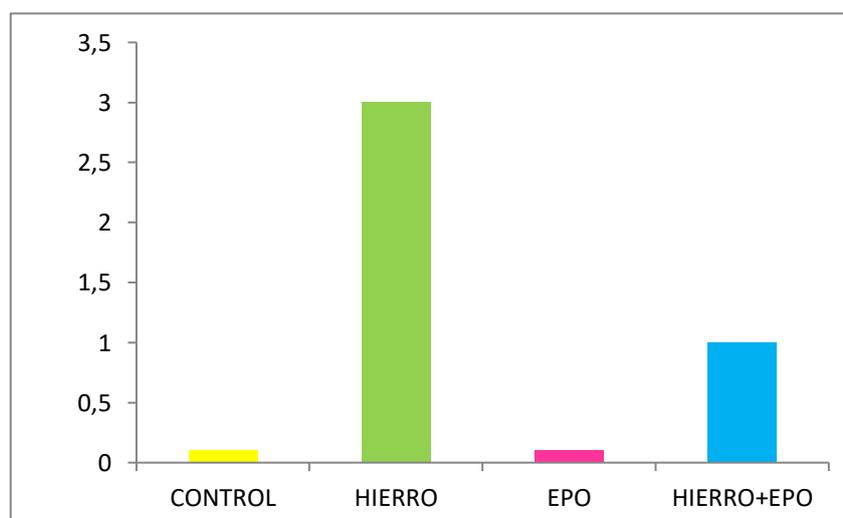


Figura 8. Semicuantificación de depósitos de hierro hepático como hemosiderina. Valores expresados en unidades arbitrarias.

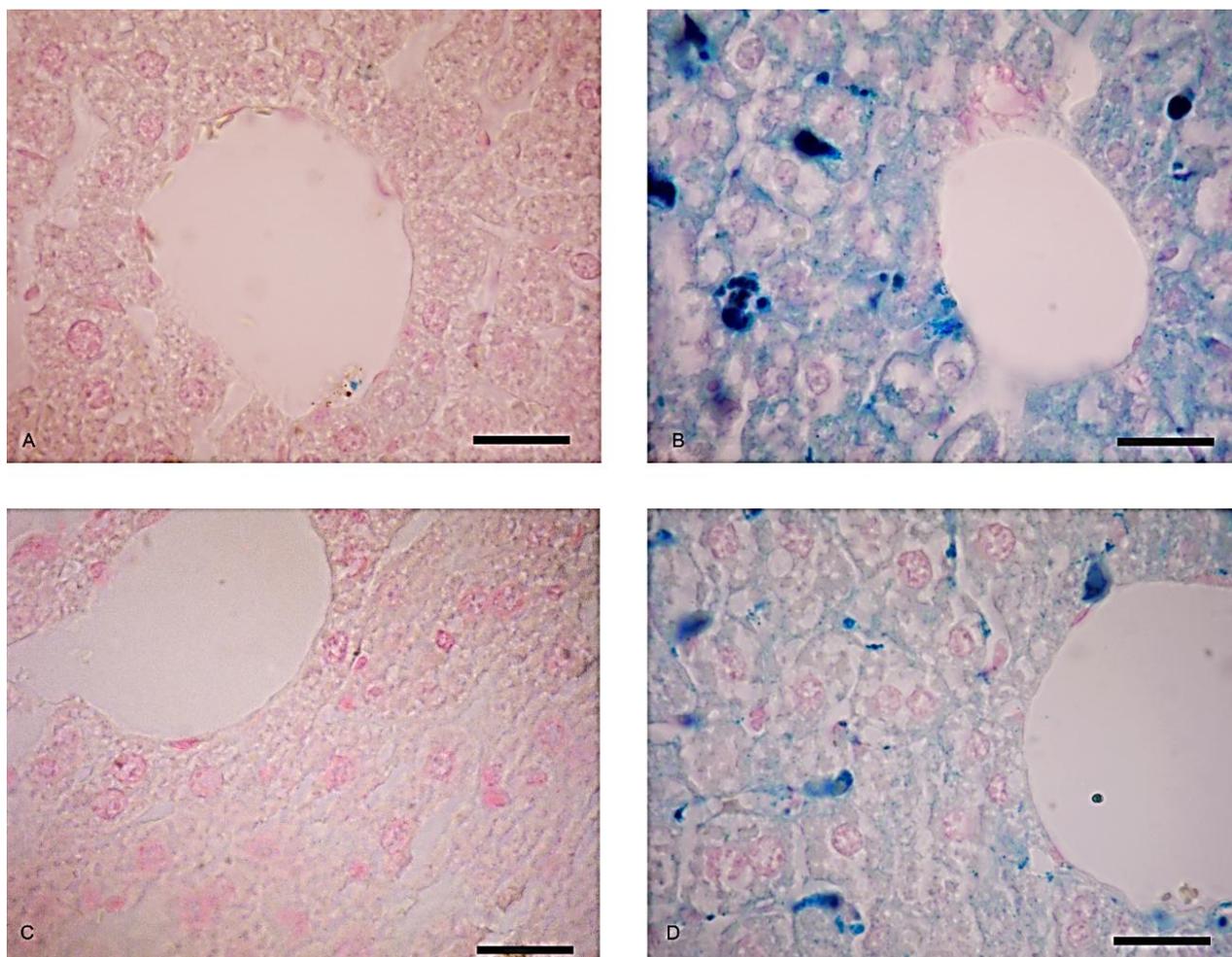


Figura 9. Observación de hemosiderina hepática. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

3.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO HEPÁTICAS

3.3.1 Transportador de Metales Divalentes 1

En condiciones basales detectamos moderada inmunomarcación del transportador de metales divalentes distribuida de manera homogénea en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 10 A).

En presencia de hierro el transportador DMT1 no fue detectado, sugiriendo un mecanismo protector para disminuir la captación celular del biometal mediante este transportador (Figura 10 B).

De manera contraria la señal de eritropoyetina aumentó su expresión citoplasmática y también se expresó en la membrana celular indicando una mayor captación celular de hierro (Figura 10 C). La señal predominante en el grupo combinado fue la señal de hierro (Figura 10 D).

Resultados

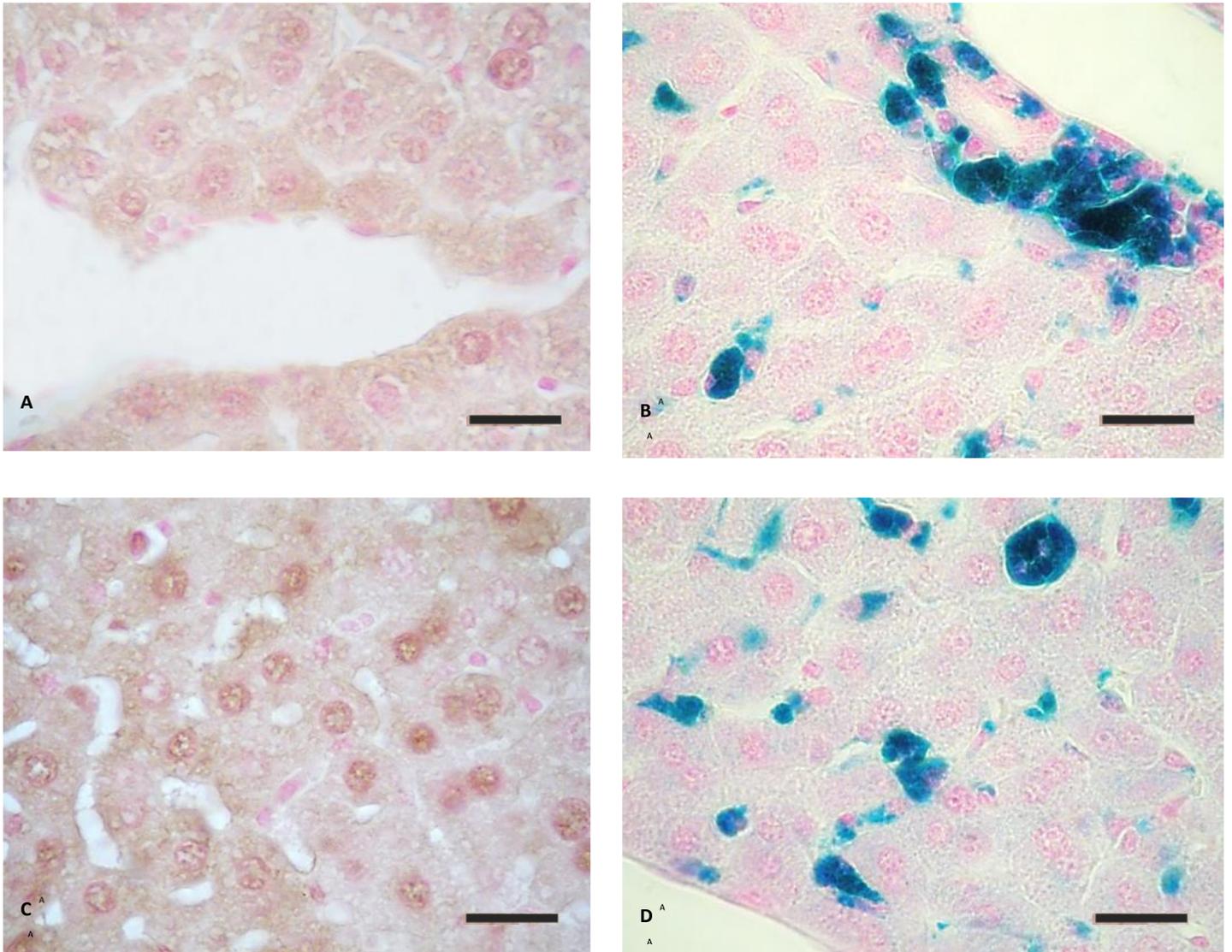


Figura 10. Inmunomarcación de DMT1 en hígado. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

3.3.2 Transportador ZIP14

Tanto en condiciones basales como en el grupo inyectado con eritropoyetina no se observó expresión del transportador ZIP14 (Figura 11 A y C) sugiriendo que ZIP14 en estas condiciones no cumpliría un rol predominante en la captación de hierro en el hepatocito.

En ambos grupos con hierro se observó una marcada expresión de ZIP14 (Figura 11 B y D) indicando que ZIP14 sería el transportador responsable de la sobrecarga de hierro hepática. La señal de hierro fue la señal preponderante.

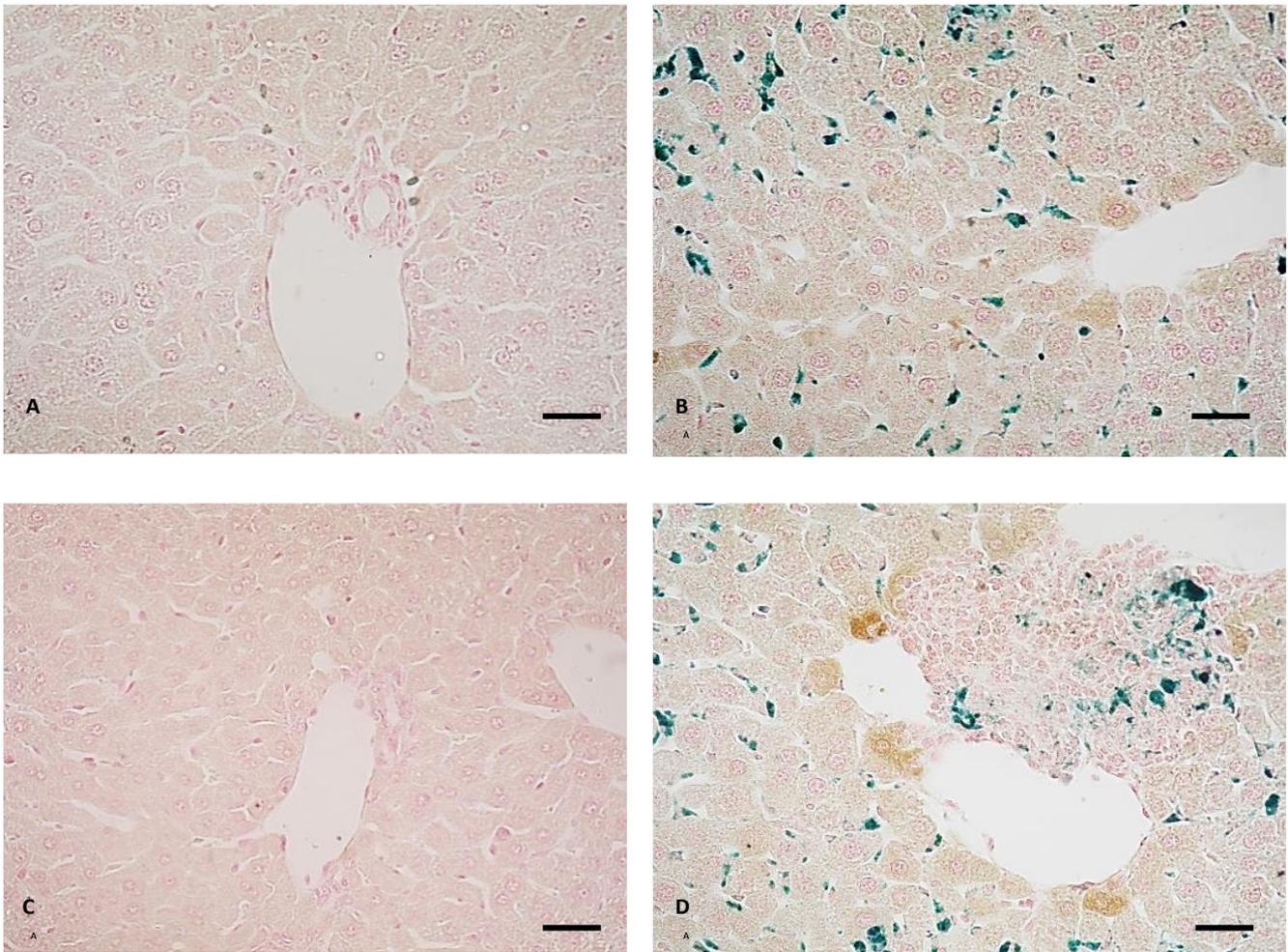


Figura 11. Inmunomarcación de ZIP14 hepático. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μm .

3.3.3 Proteína de depósito L-ferritina

En los hepatocitos del grupo control se observó una moderada marcación citoplasmática de L-ferritina (Figura 12 A) demostrando los depósitos de hierro hepáticos en condiciones basales. La señal de eritropoyetina condujo a la disminución de la expresión de esta proteína (Figura 12 C) sugiriendo

Resultados

la depleción de los depósitos de hierro hepático frente a la eritropoyesis activa. Por el contrario, el exceso de hierro condujo a un aumento de la expresión de L-ferritina (Figura 12 B) siendo su marcación muy intensa reflejando el aumento en los depósitos del biometal. En el grupo combinado la señal predominante fue la de EPO (Figura 12 D).

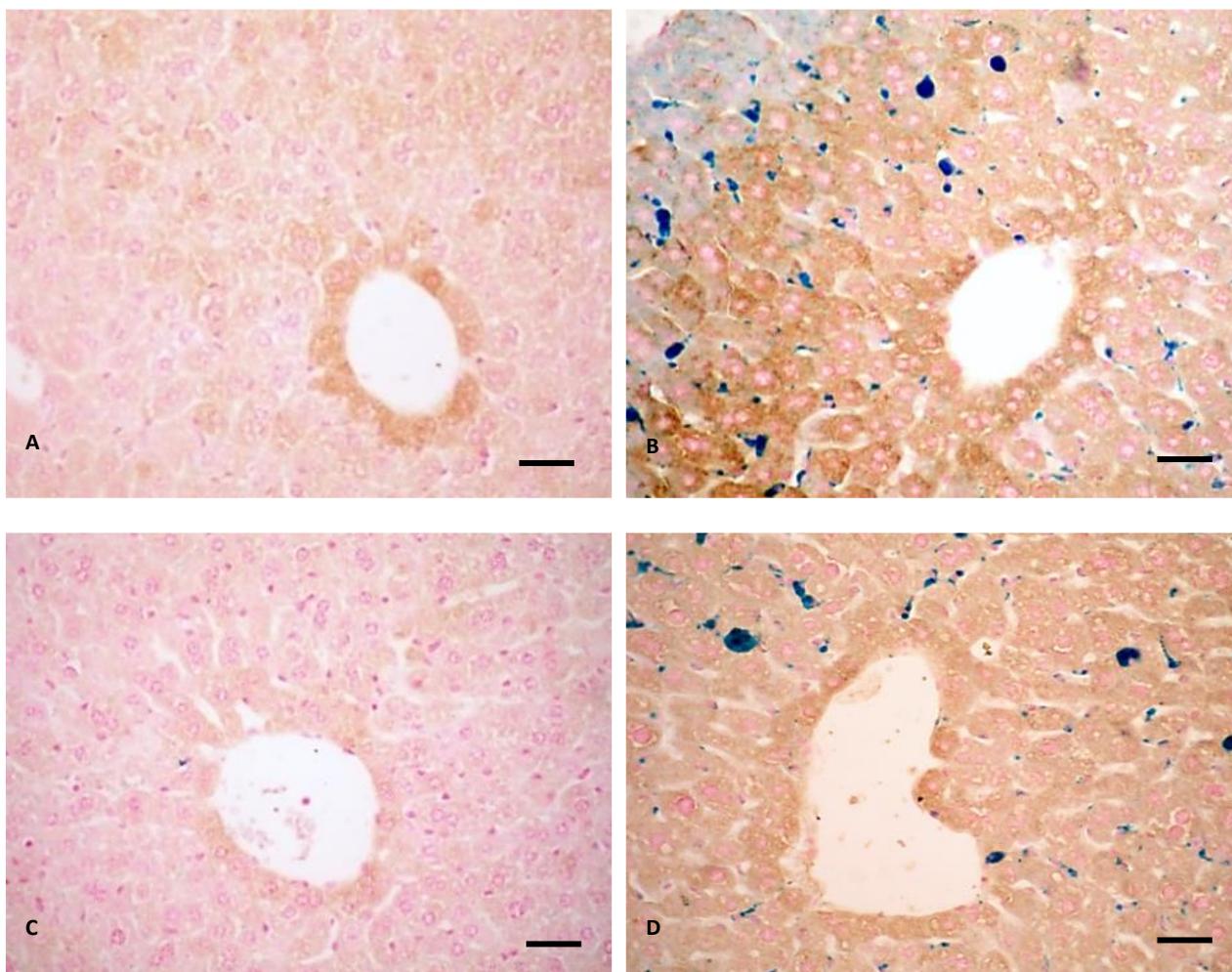


Figura 12. Inmunomarcación de L-ferritina hepática. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

3.3.4 Prohepcidina

En 1998 Ganz et al. llamaron hepcidina a una nueva molécula de 25 aminoácidos debido a que su ARNm estaba altamente expresado en hígado y presentaba actividad microbicida in vitro. Hepcidina se sintetiza en hepatocitos como un largo péptido inactivo pre-prohepcidina compuesto por un péptido señal y prohepcidina de 60 aminoácidos. Prohepcidina es posteriormente clivada por la furina convertasa para generar la hepcidina madura.

Resultados

En el modelo combinado de sobrecarga de hierro y eritropoyetina determinamos la expresión de prohepcidina hepática por inmunohistoquímica. Observamos una leve expresión de prehepcidina en condiciones basales (Figura 13 A) y un aumento de su expresión en hepatocitos en presencia de hierro (Figura 13 B). En presencia de EPO prohepcidina disminuye su expresión y en el grupo combinado la señal de EPO es la predominante (Figura 13 C y D).

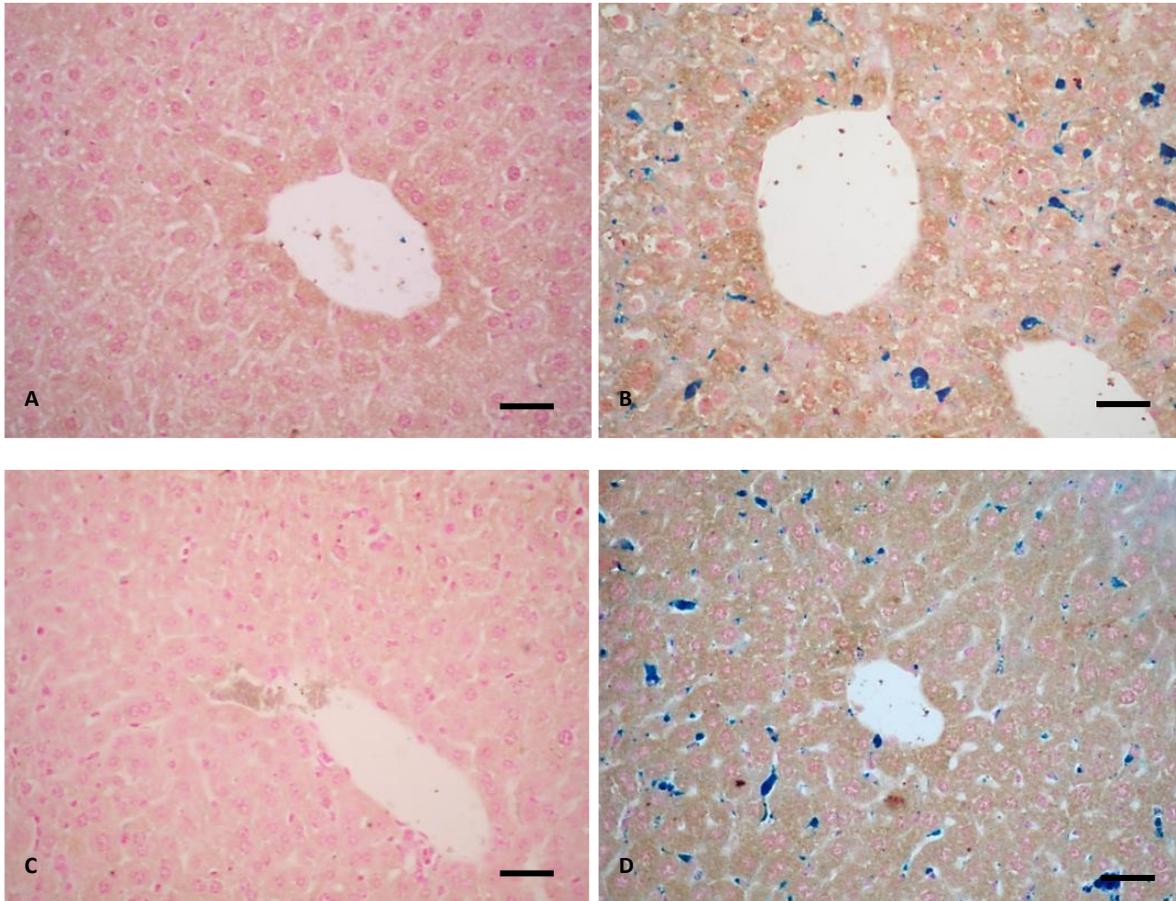


Figura 13. Inmunomarcación de prohepcidina hepática. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

3.3.5 Control negativo de inmunomarcación

El control negativo de inmunomarcación de las proteínas clave del ciclo del hierro generado incubando a las secciones de tejido hepático con PBS en lugar del anticuerpo primario no mostró marcación (Figura 14)

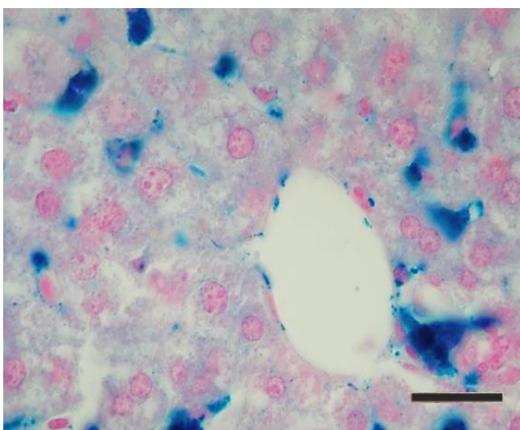


Figura 14. Control negativo hepático. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

4. RIÑÓN

4.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA RENAL

Los riñones son órganos pares que se localizan en la pared abdominal por detrás del peritoneo. La cara medial de cada riñón presenta una hendidura o hilio a través del cual pasan la arteria y la vena renal, los nervios, el uréter y la pelvis.

El corte transversal del riñón muestra dos regiones, una externa o corteza y una interna o médula, formadas por la disposición organizada de las nefronas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios.

La médula se divide en áreas denominadas pirámides renales. La base de la pirámide se origina en la zona corticomedular y el ápice termina en una papila que drena la orina en los cálices menores y, posteriormente, en los cálices mayores que terminan en la pelvis renal, que se continúa con el uréter que lleva la orina desde la pelvis renal a la vejiga urinaria.

La nefrona es la unidad funcional renal y se compone de un corpúsculo renal o glomérulo, túbulo proximal, asa de Henle ascendente y descendente, túbulo distal y sistema de túbulos colectores (Esquema 3).

El glomérulo está formado por los capilares y la cápsula de Bowman. Cada segmento tubular está formado por células que realizan funciones de transporte específicas. Las células del túbulo proximal tienen una membrana apical amplificada por vellosidades, o borde en cepillo, que está solo presente en este túbulo. La membrana basolateral (lado sanguíneo de estas células) presenta numerosas invaginaciones con mitocondrias.

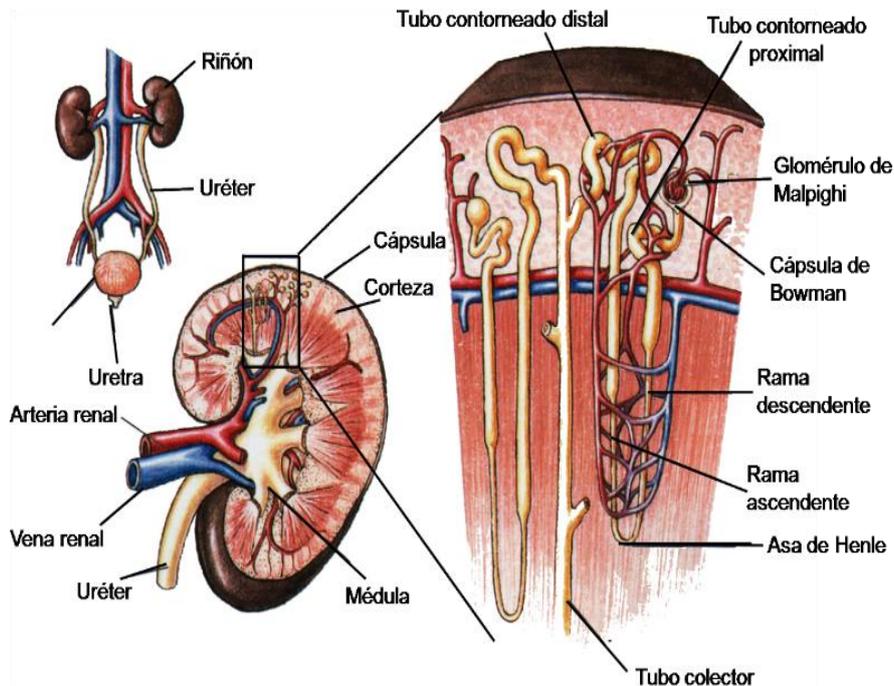
En nuestros estudios, las estructuras tubulares corticales fueron identificadas aplicando criterios morfológicos basados en las características celulares del epitelio tubular renal.

El túbulo proximal fue identificado por su epitelio característico de células cúbicas y su distribución principalmente en la corteza renal. Para diferenciar los segmentos S1, S2 y S3 del túbulo proximal nos basamos en su epitelio y en su ubicación. Los segmentos S1 y S2 proximales se localizan mayoritariamente en la corteza cercanos a la zona glomerular y el segmento S3 se ubica en el límite entre la corteza y la zona externa medular. Las características histológicas también nos permitieron diferenciar los distintos segmentos proximales por el diámetro de su luz tubular, porque en los segmentos S1 y S3 es característico un menor lumen tubular que en el segmento S2 (Wolff et al. 2011).

Las ramas descendentes y ascendentes delgadas del asa de Henle, presentan superficies apicales y basolaterales escasamente desarrolladas y con escasas mitocondrias. Las células del túbulo ascendente grueso de Henle y distal tienen abundantes mitocondrias y extensos plegamientos en la membrana basolateral.

Resultados

El 80 % de las nefronas, denominadas “nefronas superficiales”, están en la corteza renal y el 20 % restante, llamadas “nefronas yuxtamedulares”, están en la médula interna. El glomérulo de las nefronas yuxtamedulares se localiza en la corteza adyacente a la médula. Ambos subtipos de nefronas difieren anatómicamente en aspectos con relevancia funcional, en las yuxtaglomerulares el asa de Henle es más larga que en las superficiales y la arteria eferente forma los vasos rectos además de los capilares peritubulares.



Esquema 3. Estructura funcional renal

En nuestro modelo animal no observamos diferencias en la arquitectura renal en corteza (Figura 15), ni en médula (Figura 16) en ninguna de las 4 condiciones estudiadas al observar a los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina.

Resultados

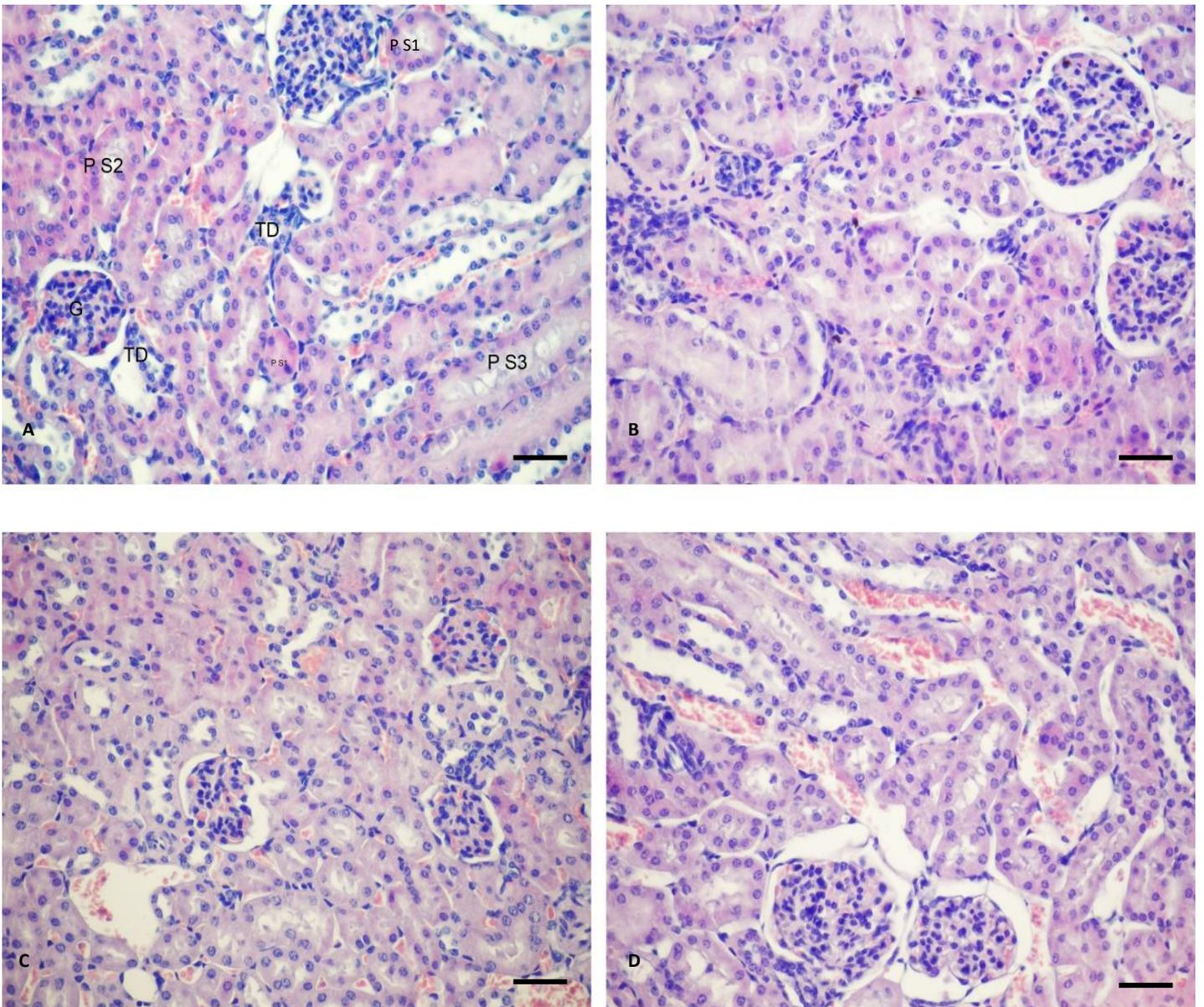


Figura 15. Histología de la corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$. G: glomérulo, TD: túbulo distal, P S1: túbulo proximal segmento S1, P S2: túbulo proximal segmento S2; P S3: túbulo proximal segmento S3.

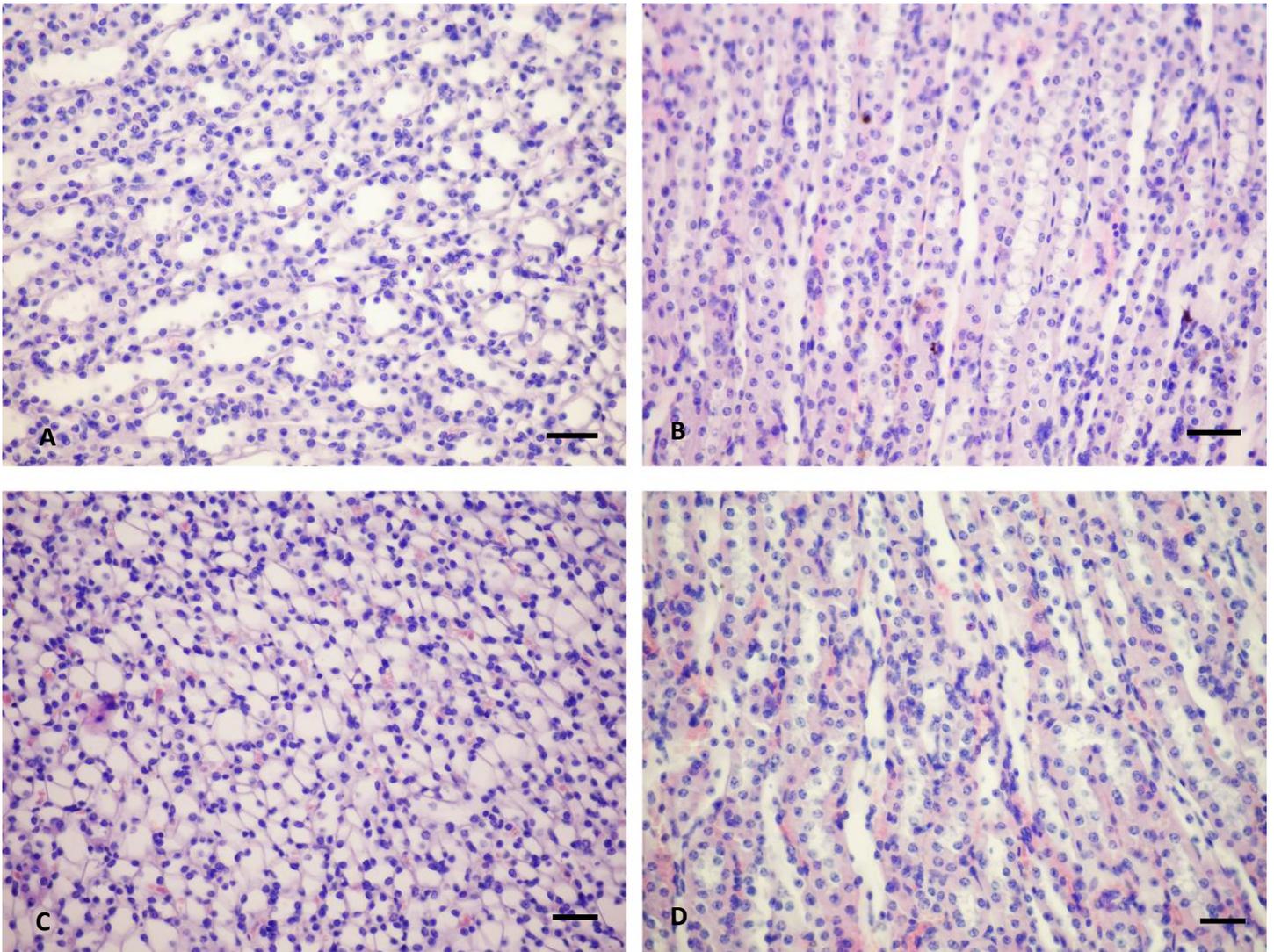


Figura 16. Histología de la médula renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO RENAL

4.2.1 Cuantificación de hierro tisular

Al cuantificar el nivel de hierro tisular renal observamos un aumento significativo en el grupo de sobrecarga de hierro ($9,06 \pm 0,98\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) y en el de sobrecarga de hierro y EPO ($8,47 \pm 0,60\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) respecto a las condiciones basal ($1,82 \pm 0,78\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) y EPO ($2,35 \pm 1,36\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) (Figura 17) indicando el estado de exceso del biometal.

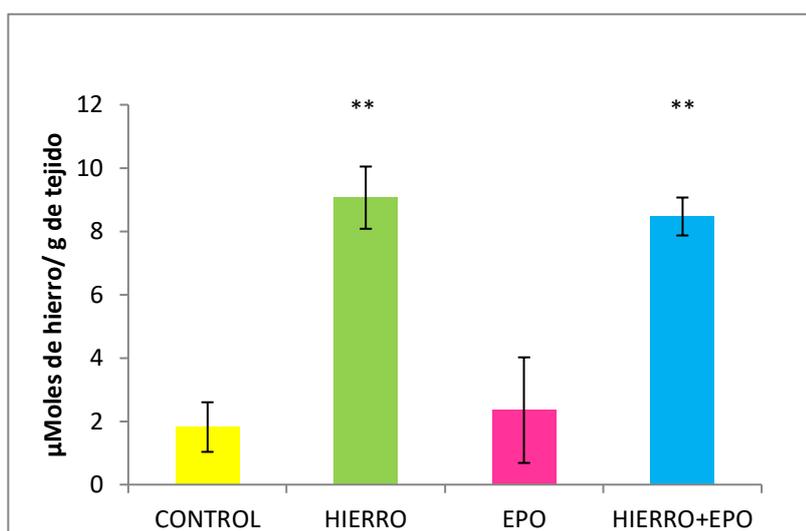


Figura 17. Cuantificación de hierro renal. Valores expresados en μ Moles de hierro/g de tejido. ** $p < 0,01$

4.2.2 Semicuantificación de hierro tisular como Hemosiderina

En los grupos control y EPO observamos escasa hemosiderina (Figura 19 A y C) mientras que la misma fue abundante en el grupo de sobrecarga de hierro localizándose a nivel glomerular y a nivel del túbulo proximal en los segmentos S1, S2 y S3 encontrándose ausente en el túbulo distal (Figura 19 B). En el grupo combinado observamos una disminución de presencia de hemosiderina mediante la semicuantificación por un score (Figura 18). En ambos grupos con hierro se observó también presencia de hemosiderina en médula (Figura 20 B y C).

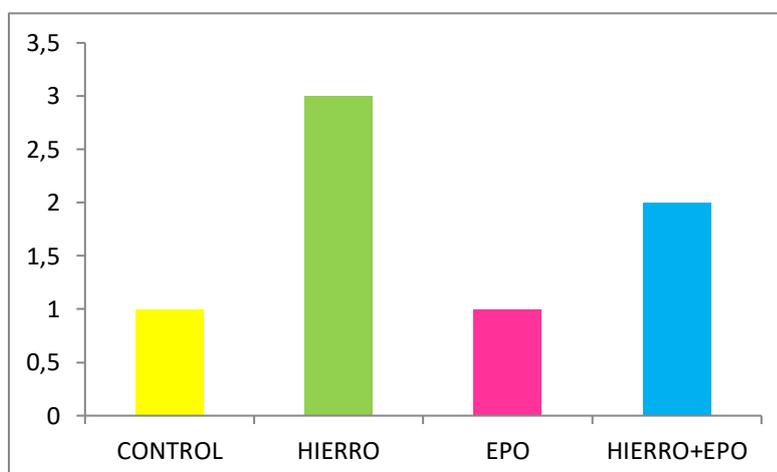


Figura 18. Semicuantificación de depósitos de hierro renal como hemosiderina. Valores expresados en unidades arbitrarias.

Resultados

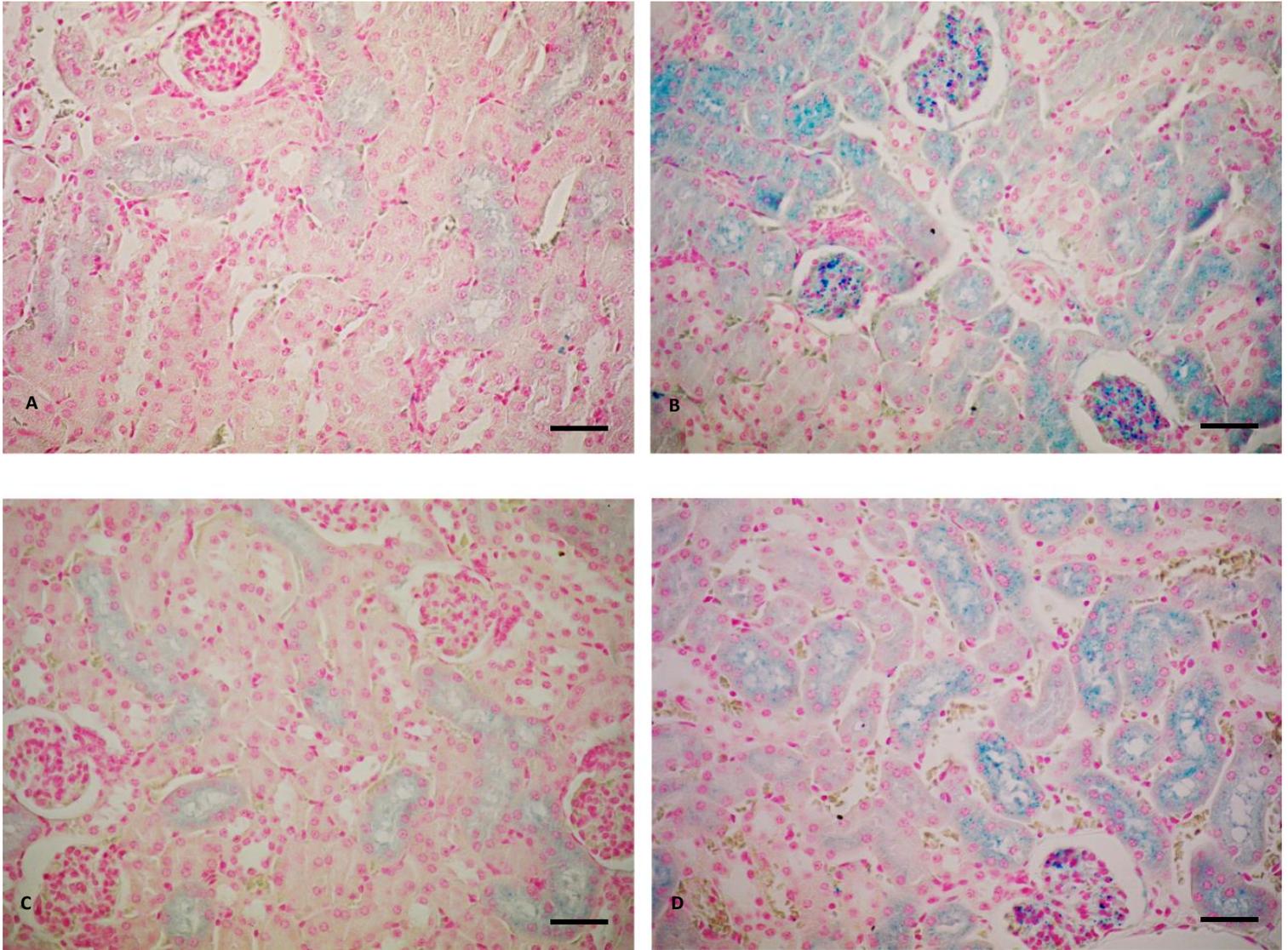


Figura 19. Observación de hemosiderina en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

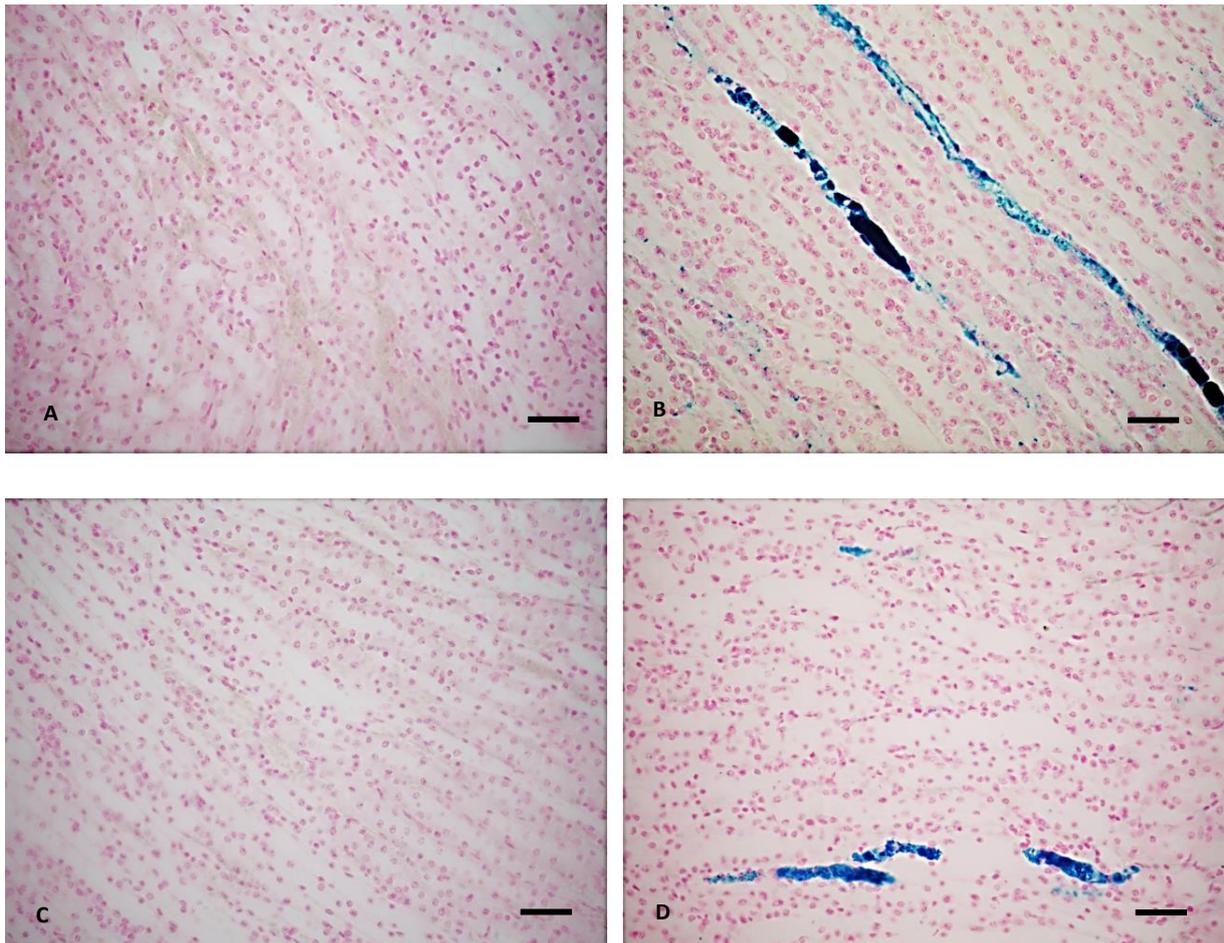


Figura 20. Observación de hemosiderina en médula renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO RENALES

4.3.1 Transportador de Metales Divalentes 1

En el grupo basal y en EPO se observó la expresión intracitoplasmática de DMT1 de manera homogénea en el túbulo proximal principalmente en el segmento S2 de la corteza renal (Figura 21 A y C). En ambos grupos con hierro se observó una disminución de la marcación de DMT1 en estos segmentos sugiriendo una menor captación de hierro en estados de exceso favoreciendo su eliminación en la orina y protegiendo a las células renales (Figura 21 y 22 B y D).

Además, se observó marcación del importador en médula renal en condiciones basales y en EPO y el mismo patrón de disminución fue registrado en presencia de hierro (Figura 23).

Resultados

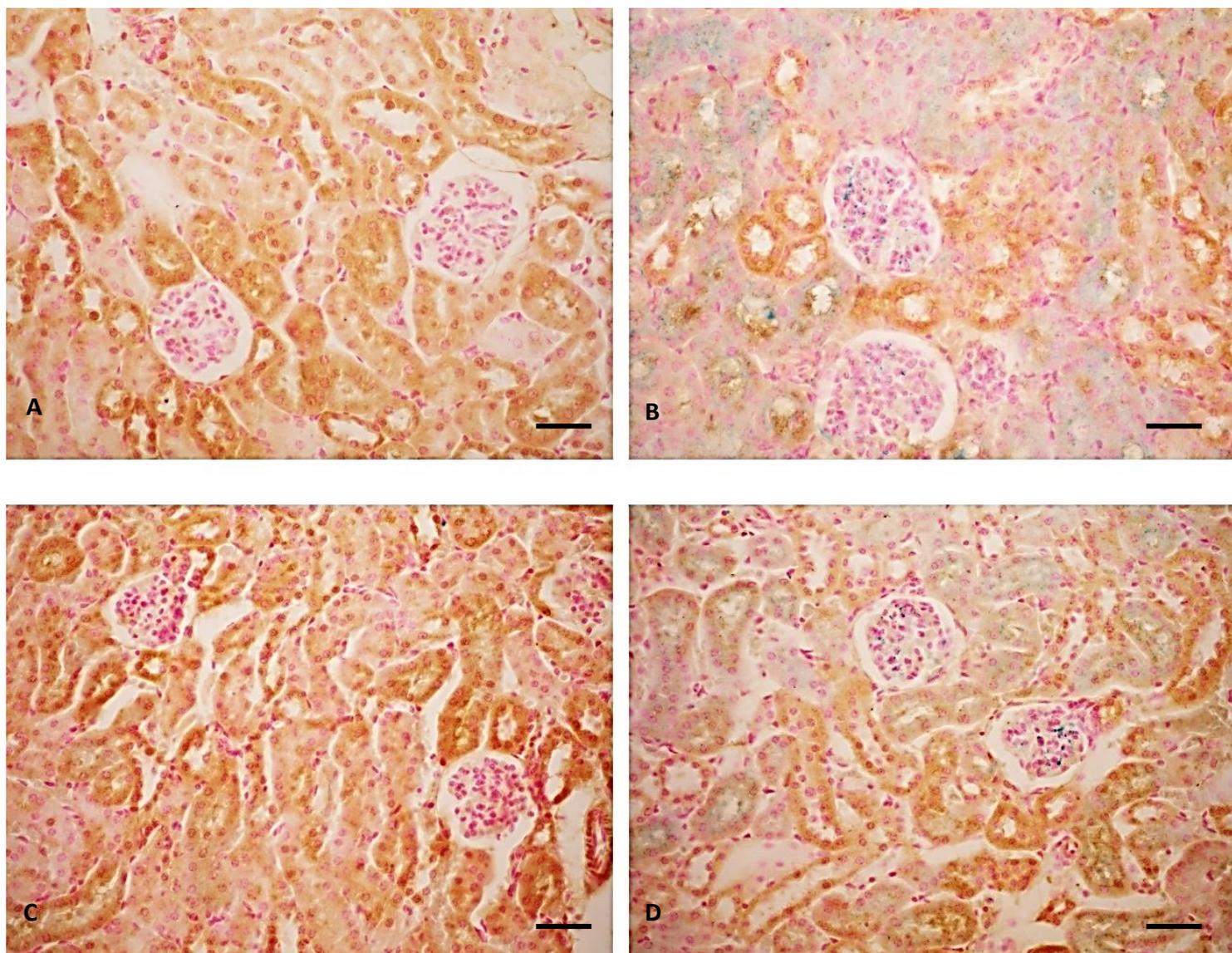


Figura 21. Inmunomarcación de DMT1 en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se utilizaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

Resultados

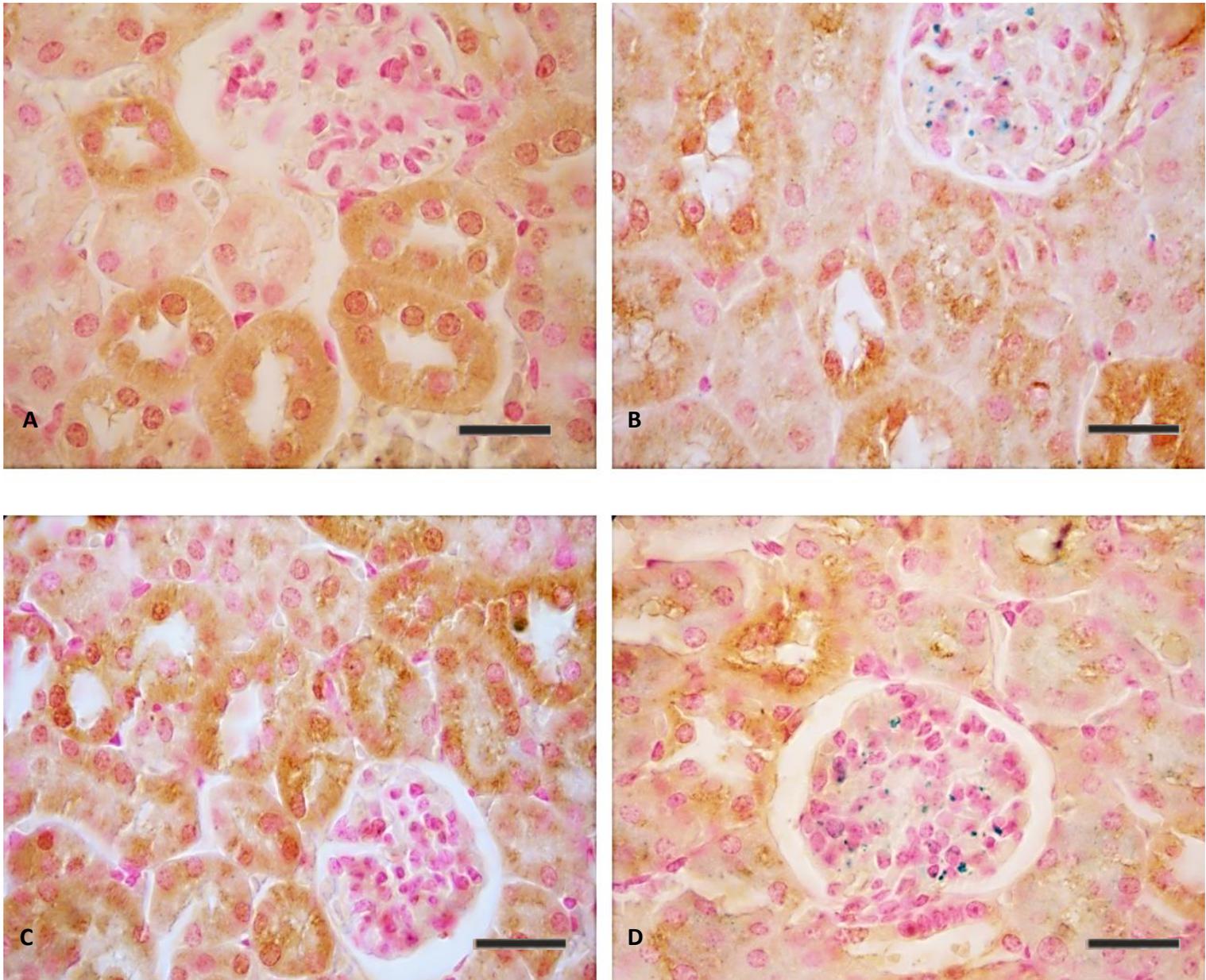


Figura 22. Inmunomarcación de DMT1 en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en materiales y métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

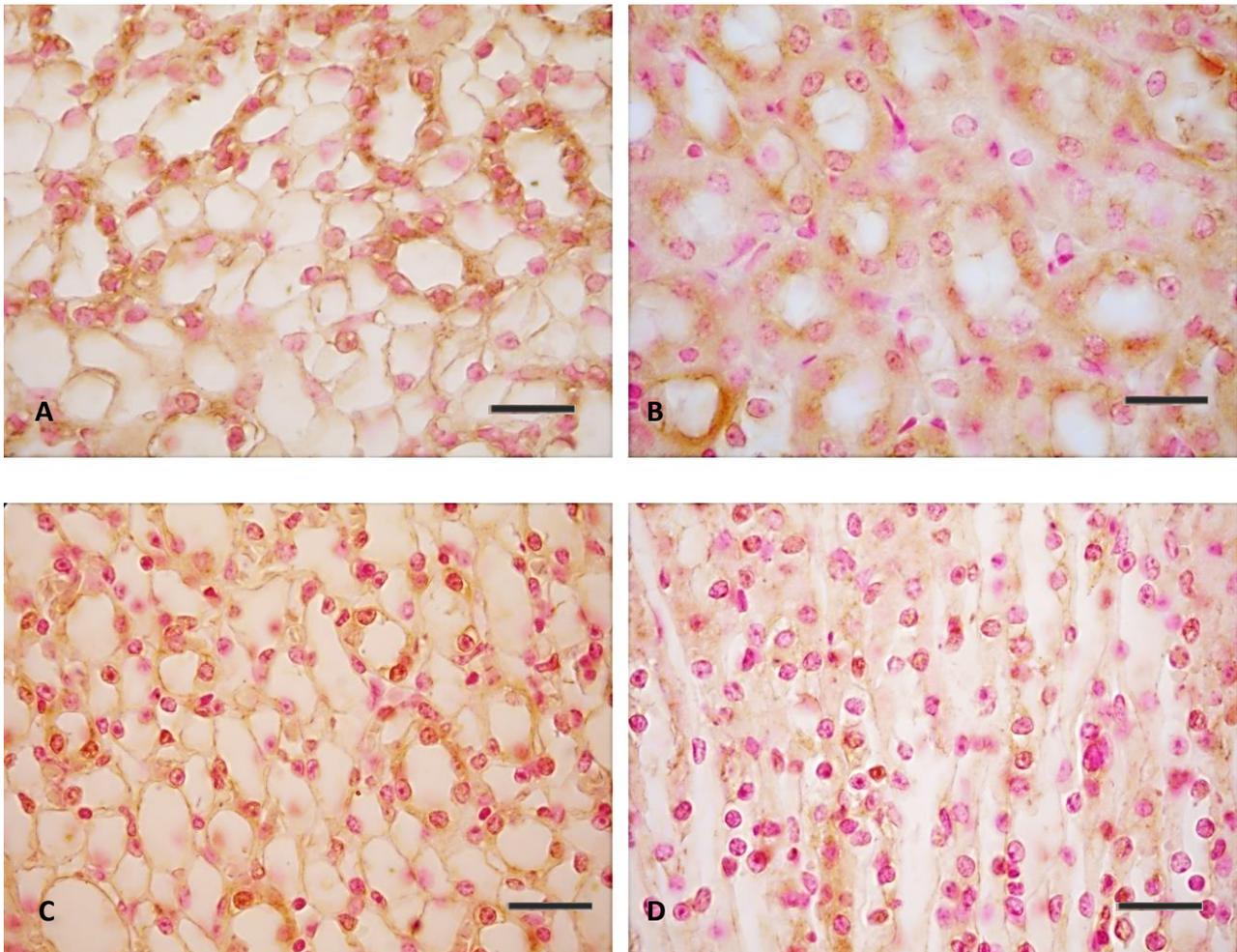


Figura 23. Inmunomarcación de DMT1 en médula renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.2 Expresión de ZIP14

En el grupo control se observó una leve marcación del importador en la corteza renal con distribución homogénea en el citoplasma del túbulo proximal sobre todo en el segmento S2 (Figura 26 A), siendo en presencia de EPO muy tenue (Figura 26 C). En presencia de hierro ZIP14 aumentó su expresión encontrándose intensamente marcado en los mismos segmentos de la corteza indicando una mayor captación de hierro desde el filtrado vía ZIP14 (Figura 24 B y 25 B). También se lo encontró en médula (Figura 26 B).

En el grupo combinado la señal predominante fue la de eritropoyetina sugiriendo una menor captación celular de hierro por ZIP14 y su mayor eliminación en la orina (Figura 26 D).

Resultados

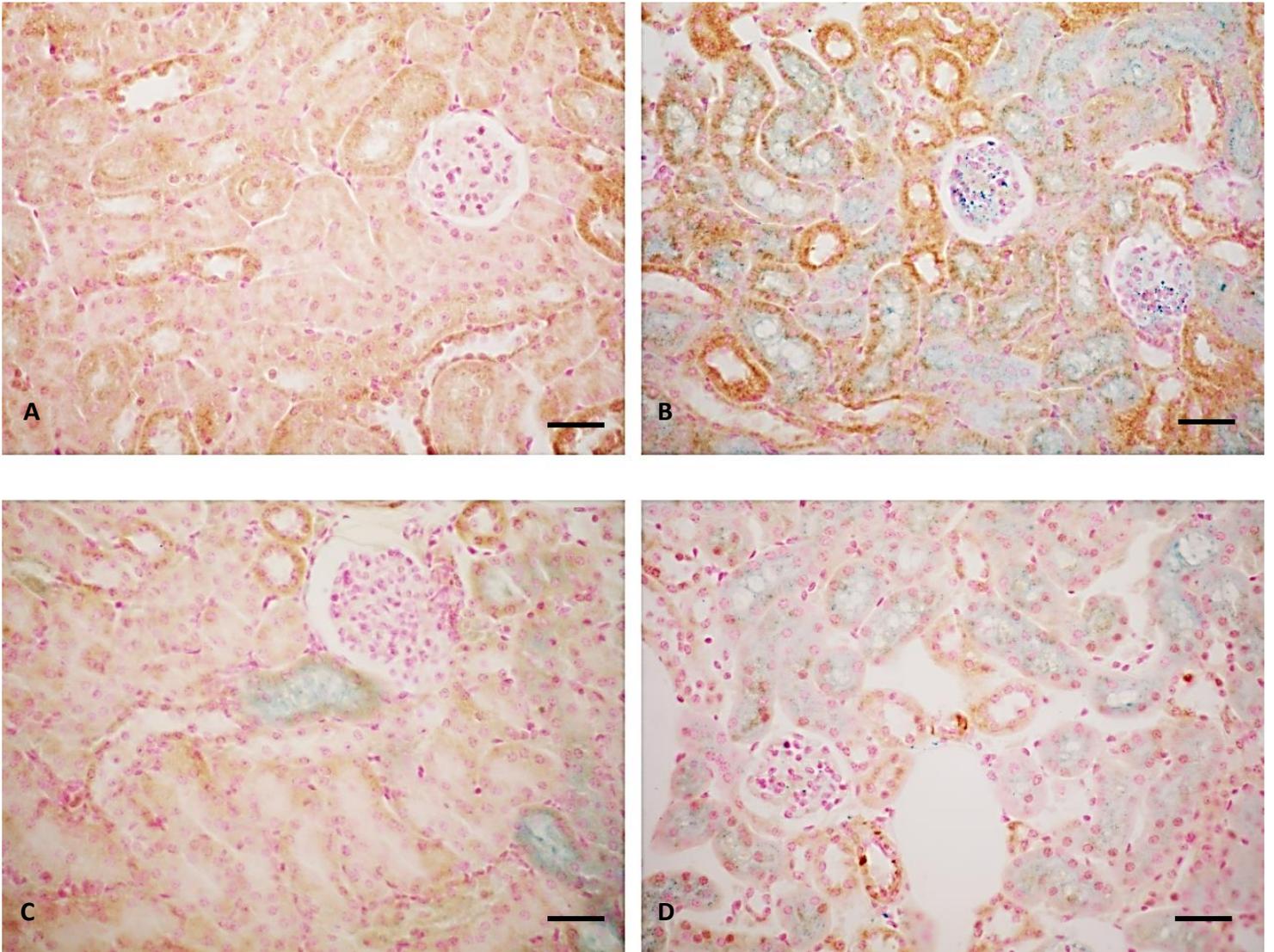


Figura 24. Inmunomarcación de ZIP14 en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

Resultados

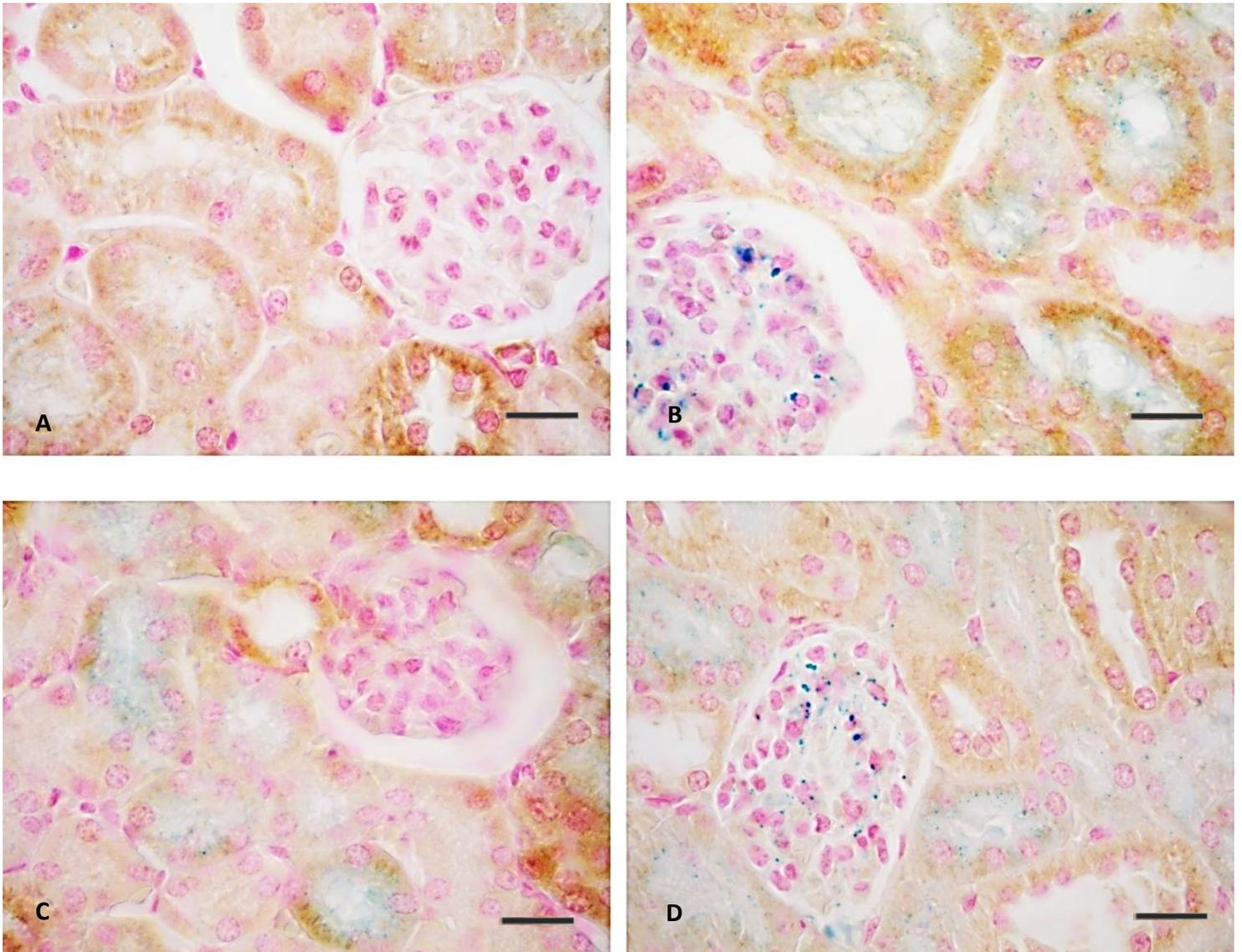


Figura 25. Inmunomarcación de ZIP14 en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D) Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

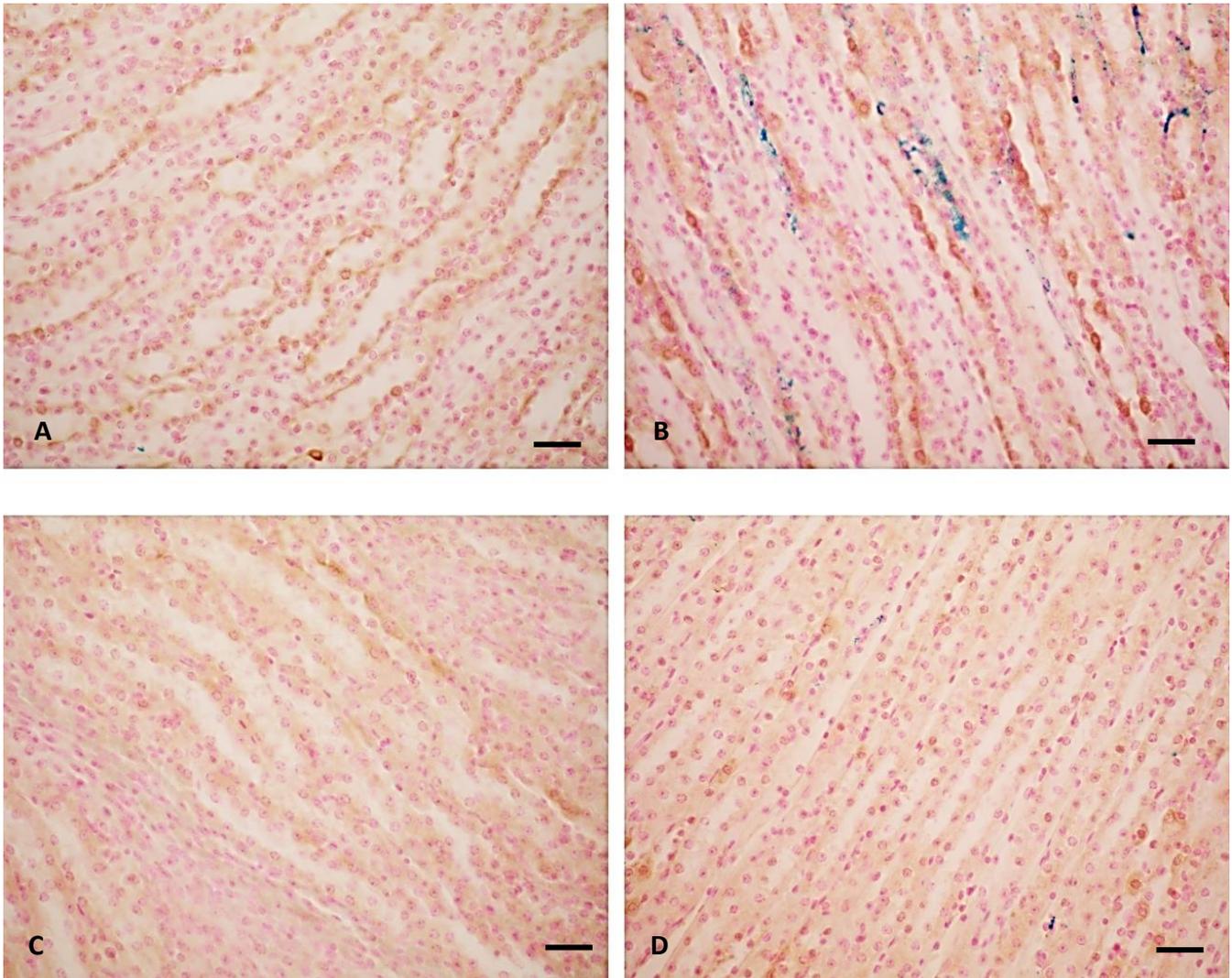


Figura 26. Inmunomarcación de ZIP14 en médula renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

4.3.3 Prohepcidina

En presencia de hierro observamos mayor expresión del propéptido de hepcidina sobre todo en los segmentos S2 del túbulo proximal, sugiriendo una mayor expresión de hepcidina y en consecuencia una menor expresión de FPN por el eje regulador hepcidina-ferroportina (Figura 27 B). Lo opuesto se observó en presencia de EPO en donde la expresión de prohepcidina disminuyó (Figura 27 C). La señal predominante en el grupo combinado fue la señal de hierro (Figura 27 D).

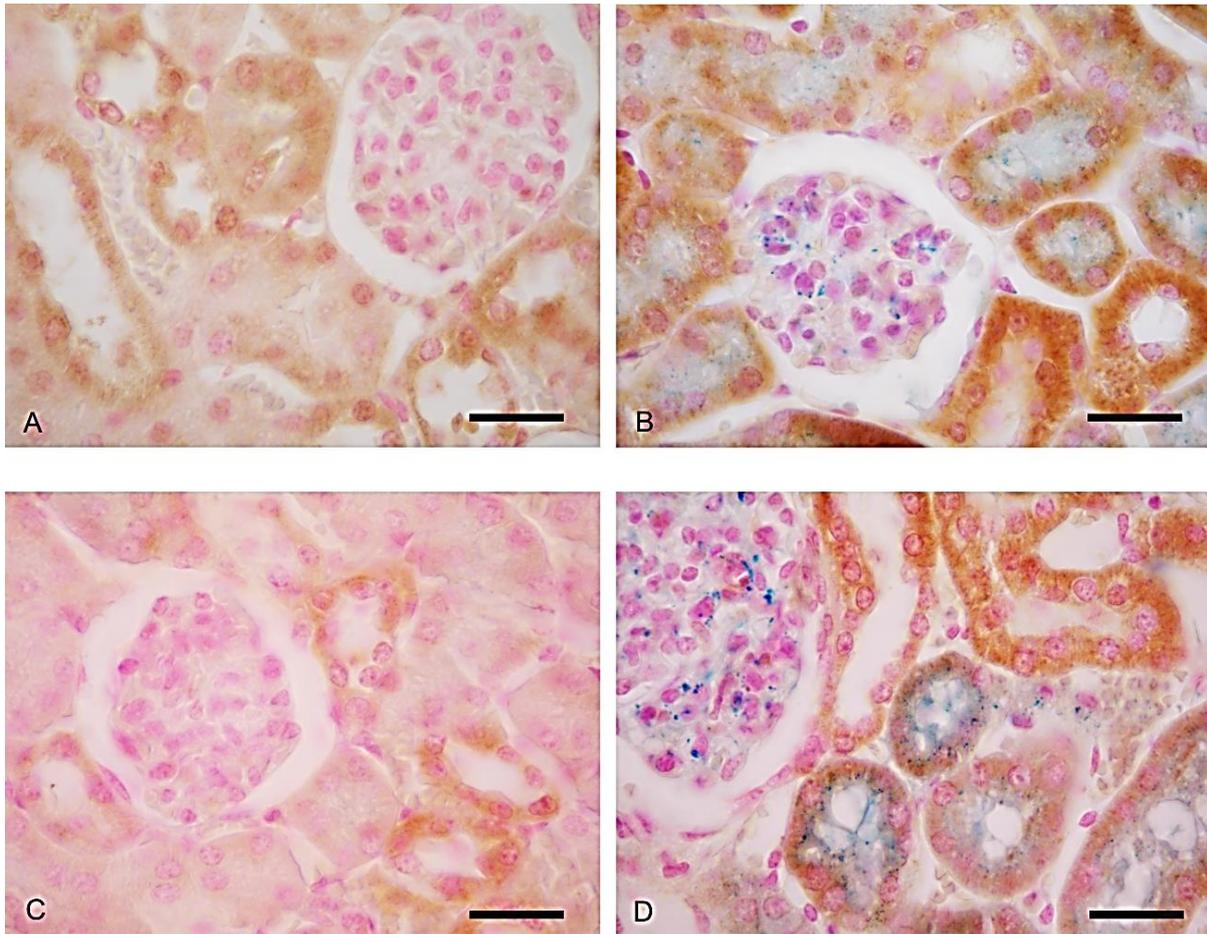


Figura 27. Inmunomarcación de prohepcidina en corteza renal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D) Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

4.3.4 CONTROL NEGATIVO DE INMUNOMARCACIÓN

El control negativo para las proteínas del ciclo del hierro estudiadas no reveló marcación (Figura 28)

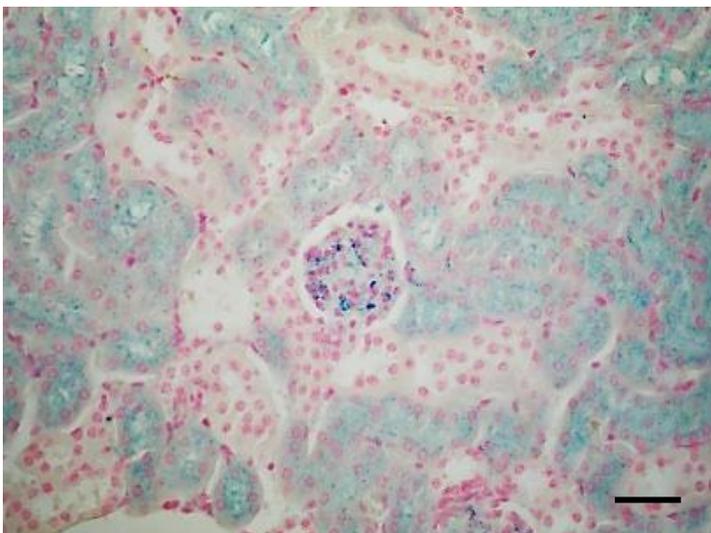


Figura 28. Control negativo renal. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

1. DUODENO

1.1 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

Se conoce que la homeostasis del hierro es mantenida gracias al balance entre la captación de hierro dietario por los enterocitos duodenales y el reciclaje de hierro proveniente de los eritrocitos senescentes mediante el sistema reticuloendotelial (Nicolas et al. 2001).

El duodeno es el sitio de mayor absorción de hierro por lo que se ha propuesto la existencia de transportadores a nivel de la membrana apical de los enterocitos y en la superficie basolateral para transferir el biometal a circulación (Morgan, 1996).

Estudios de Manis, Schachter y Werby mostraron que la absorción de hierro intestinal ocurre en el duodeno proximal y es regulada en dos etapas. En primer lugar, ocurre la captación de hierro por los enterocitos y el posterior depósito citoplasmático como ferritina o su liberación a circulación.

La captación en la membrana apical es mediada principalmente por el transportador de metales divalentes DMT1 y la reducción previa del hierro férrico de la dieta es llevada a cabo por la enzima reductasa Dcytb (Andrews, 1999). El flujo de hierro desde el enterocito hacia la circulación es medida por el exportador ferroportina (FPN) que también está involucrado en la liberación de hierro en otros tipos celulares como los macrófagos (Donovan et al. 2005).

La proteína ZIP14 es un transportador transmembrana de iones metálicos altamente expresado en hígado, corazón y páncreas (Zhao et al. 2010) que media la captación de hierro no unido a transferrina NTBI así como también participa en la asimilación de hierro desde la transferrina a nivel endosomal (Liuzzi et al. 2006)

La cantidad de hierro que se absorbe de la dieta por los enterocitos es influenciada por varios factores entre ellos el contenido de hierro en depósitos, la eritropoyesis, la hipoxia y la inflamación (Frazer y Anderson 2005).

Por este motivo nos propusimos evaluar la expresión de dos importadores de hierro DMT1 y ZIP14 en nuestro modelo combinado de Sobrecarga de Hierro + EPO evaluando cual es la señal predominante y si existe un mecanismo protector celular mediado por EPO en duodeno.

1.1.1 *Importador de hierro DMT1*

En enterocitos mostramos la presencia del importador DMT1 en condiciones basales con una distribución citoplasmática homogénea. Estos resultados están en concordancia con los estudios de

Trinder et al. (2000) quienes observaron la localización citoplasmática con una ligera distribución hacia la zona apical. Mientras que Andrews (1999) observó la localización apical neta.

En exceso de hierro observamos un cambio de localización hacia la zona perinuclear que podría implicar una menor participación de este transportador en la importación del biometal mientras que en presencia de EPO la localización en la membrana apical indicaría lo contrario. De esta forma frente a una disminución de hierro, en este caso debido a su utilización en la eritropoyesis activa, aumentaría la captación del mismo vía el transportador de metales divalentes DMT1, siendo ésta la señal preponderante cuando ambos estímulos coexisten.

En este contexto Canonne-Hergaux et al. (1999) reportaron que la expresión de DMT1 se reduce cuando se ingieren dietas ricas en hierro mientras que aumenta con dietas deficientes de hierro.

En contraposición con nuestros resultados Theurl et al. (2005) reportaron el aumento de la expresión del importador DMT1 duodenal frente al exceso de hierro en un modelo animal sugiriendo una mayor captación del biometal por los enterocitos y la acumulación del mismo en su interior.

La disminución de DMT1 duodenal observada en exceso de hierro, podría ser el resultado de un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por el sistema IRE-IRP. Las proteínas citoplasmáticas IRP poseen alta afinidad de unión a segmentos IRE presentes en el ARNm de ciertas proteínas, siendo esta interacción dependiente de la disponibilidad celular del hierro (Muckenthaler et al. 2008).

Han sido caracterizadas dos tipos de IRPs identificadas como IRP1 e IRP2 (Wallander et al. 2006). Cuando el hierro celular es elevado, la proteína IRP1 se encuentra acoplada al *cluster* Fe-S, por lo que pierde su capacidad de unión a los segmentos IRE del ARNm de proteínas del hierro (Haile et al.

1992). La regulación de IRP2 por el exceso de hierro involucra la degradación proteosomal de la proteína (Guo et al. 1995). Por lo tanto, en exceso de hierro disminuye la interacción de las proteínas IRPs con el segmento IRE localizado en el extremo 3' del ARNm de DMT1, lo que produce la desestabilización del transcrito disminuyendo su traducción (Andrews 1999).

En este sentido, el elevado nivel de hierro presente en el modelo de Sobrecarga de Hierro dificultaría la unión de IRPs al segmento IRE del ARNm de DMT1, lo que disminuiría su traducción en duodeno.

Estudios previos de Núñez y colaboradores (2010) reportaron la disminución de DMT1 duodenal en ratas sometidas a una dosis intragástrica de hierro. Además, de la movilización celular de DMT1 desde la membrana apical hacia la basolateral, confirmando que el exceso de hierro induce una redistribución de DMT1 en las células duodenales para disminuir su captación.

1.1.2 Importador ZIP14

En el Modelo Animal mostramos la presencia del transportador ZIP14 en membrana y citoplasma celular de los enterocitos en condiciones basales indicando que este transportador se encuentra involucrado en la captación de hierro duodenal.

Por otra parte, la reducción de la expresión de ZIP14 observada en exceso de hierro nos conduce a hipotetizar la existencia de un mecanismo protector a nivel duodenal para disminuir la captación del biometal frente a estados de exceso del mismo.

La señal de hierro fue la señal preponderante observada en el grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO. Se desconoce el mecanismo regulatorio de ZIP14 dado que no posee segmentos IRE-IRP.

La mayor captación celular de hierro mediada por EPO sería vía los transportadores DMT1 y ZIP14 además de la mayor liberación hacia circulación por el exportador celular FPN (Esquema 1).

En este sentido, estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio detectaron la presencia de FPN en enterocitos en condiciones basales con una localización basolateral mientras que frente a hierro esa localización se dispersaba (D'Anna y Roque, 2013).

En condiciones de hipoxia en donde los niveles de EPO aumentan se observó el aumento de la expresión de FPN en la superficie basolateral sugiriendo un mayor transporte de hierro a la circulación (D'Anna y Roque, 2013). Frente a ambos estímulos, hipoxia y sobrecarga de hierro, la señal de hipoxia fue la preponderante (D'Anna y Roque, 2013).

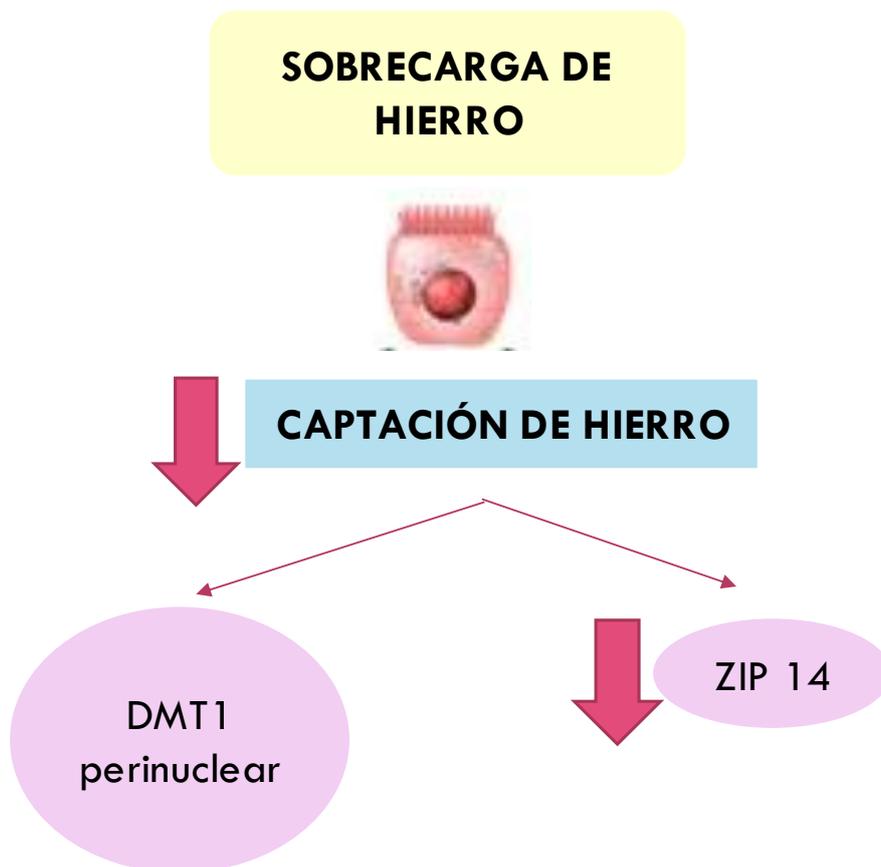
De esta forma FPN podría formar parte de una vía de señalización en los enterocitos mediante la cual el eritrón comunica las necesidades de hierro para expandir el compartimiento eritroide sin importar el hierro sistémico (Li y Ginzburg, 2010). Así se relaciona la captación duodenal de hierro de la dieta con la eritropoyesis a pesar de los depósitos de hierro (D'Anna y Roque, 2013).

1.2 CONCLUSIONES

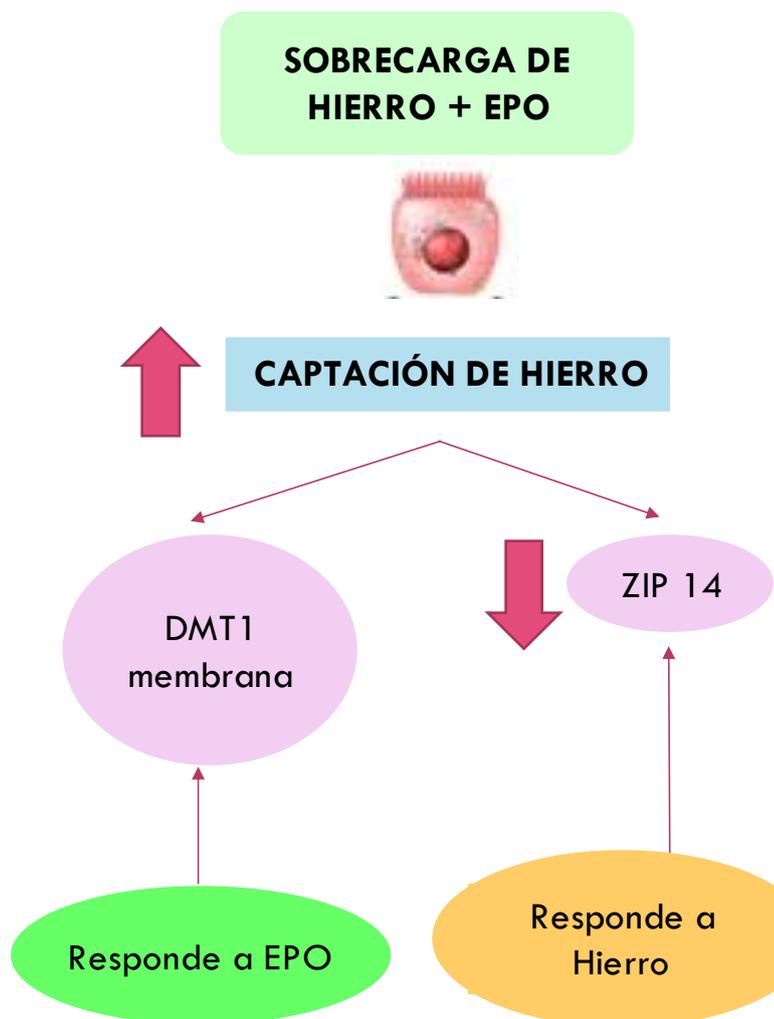
A partir de estos resultados postulamos la participación de los transportadores DMT1 y ZIP14 en la captación de hierro duodenal en condiciones basales. Asimismo, mostramos que la localización y la expresión de DMT1 y ZIP14 responden al hierro sugiriendo la presencia de un mecanismo protector para disminuir su captación en estados de exceso.

La señal EPO resultó predominante en la expresión de DMT1 originando un cambio en la localización desde el citoplasma a la membrana apical, produciendo mayor captación de hierro necesario para la eritropoyesis activa (Esquema 1 B).

De esta manera concluimos que EPO no posee un mecanismo protector a nivel duodenal como observamos en otros tejidos, sino que su acción es independiente de los depósitos de hierro. En el caso del transportador ZIP14 la señal preponderante fue la de hierro mostrando una menor captación en estados de sobrecarga (Esquema 1 A).



A



B

Esquema 1. Regulación del metabolismo del hierro en duodeno. Captación y depósitos en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. En Sobrecarga de Hierro (A) disminuye la captación celular de hierro por el cambio de localización de DMT1 y la disminución de la expresión de ZIP14. Existen mayores depósitos del biometal en forma de hemosiderina. En el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO (B) se observó que la señal predominante fue la señal de EPO para DMT1 mediando una mayor captación por este transportador ocasionando un aumento en los depósitos de hierro como hemosiderina y la señal de hierro para ZIP14 ocasionando una disminución de su expresión y así una menor captación del biometal.

2.HÍGADO

2.1 CONTENIDO DE HIERRO

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro observamos un marcado aumento de la expresión de L-ferritina y hemosiderina principalmente en los macrófagos hepáticos o células de Kupffer indicando que el hígado es capaz de almacenar hierro en concordancia con datos previos hallados en nuestro laboratorio (D'Anna y Roque 2013, Giorgi y Roque 2014). Este mecanismo

representaría una ventaja fisiológica para proteger al organismo de los efectos tóxicos del hierro al aumentar sus reservas tisulares.

Whittaker et al. (1996) demostraron hemosiderosis hepática en ratas sometidas a una dieta rica en hierro. Además, Theurl et al. (2005) demostraron el aumento de los depósitos de hierro en los macrófagos esplénicos y posteriormente en hepatocitos en ratones C57BL/6 inyectados con hierro dextrán.

Es conocido que elevadas dosis de hierro pueden causar hipertrofia hepatocelular, y el posible mecanismo del exceso de hierro podría ser el efecto de la formación de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica (Whittaker et al 1992, 1994).

En el Modelo Animal mostramos el efecto protector de la eritropoyetina disminuyendo los niveles de hierro hepático. En este contexto, recientemente se ha demostrado el efecto protector no eritropoyético de esta citoquina en la regeneración hepática (Kim et al. 2020).

2.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

2.2.1 Proteína de depósito de hierro L-ferritina

La elevada expresión de ferritina hepática observada en Sobrecarga de Hierro podría explicarse por la regulación post-transcripcional del ARNm mediada por la unión de IRPs al segmento IRE localizado en el extremo 5' (Harrison & Arosio, 1996). La inactivación de IRPs por el exceso de hierro aumenta la expresión de ferritina debido a que IRP inactiva no se une a IRE, por lo que no bloquea la traducción de esta proteína de depósito (Harrison & Arosio, 1996).

Observamos que en presencia de Eritropoyetina los depósitos de hierro hepático en forma de hemosiderina y L-ferritina disminuyen para suministrar a la circulación el hierro necesario para la eritropoyesis, o para ser utilizado en la eritropoyesis hepática. Este mecanismo se ha observado en diferentes situaciones patológicas como estados de anemia en donde la eritropoyesis medular es inefectiva y el hígado es capaz de retomar su función eritropoyética como en la vida fetal (Naughton et al. 1979).

2.2.2 Importador de hierro DMT1

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro en hígado observamos una marcada disminución de la expresión de DMT1 que indicaría que este transportador no es el responsable de los depósitos del biometal en estados de exceso, sino que limitaría su captación.

Estos resultados concuerdan con estudios de Nam et al. (2013) que reportaron la disminución de los niveles proteicos y de ARNm de DMT1 en sobrecarga de hierro.

La disminución de DMT1 hepático observada frente al exceso de hierro podría ser el resultado de la regulación de la isoforma IRE de DMT1 dado que la inactivación de IRPs impide la interacción IRE-IRP favoreciendo la degradación del transcrito (Andrews, 1999).

La localización intracelular de DMT1 en hepatocitos podría indicar que este importador participa en la liberación del biometal desde el endosoma al interior celular para su depósito, como fue sugerido previamente por Shindo et al. (2006) en células de carcinoma hepatocelular. Esta propuesta se basa en las conocidas vías de movilización del hierro en las que DMT1 ha sido involucrado en los hepatocitos (Graham et al. 2007).

En este sentido nuestros resultados se contraponen con los hallados por Trinder et al. (2000) quienes observaron una mayor expresión membranánea del importador DMT1 en estados de exceso de hierro y la ausencia del mismo en estados de depleción del biometal en un modelo animal desarrollado en ratas. En este caso se sugiere que la regulación de DMT1 sería la de la isoforma no IRE que abunda en tejido hepático (Trinder et al. 2000).

Sin embargo, en nuestro Modelo Animal en presencia de EPO los niveles de DMT1 aumentaron sugiriendo una mayor captación de hierro mediante este transportador para la eritropoyesis hepática mientras que en el Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO la señal predominante fue la respuesta al hierro.

De esta manera postulamos un mecanismo protector en el tejido hepático similar al observado en células neuronales, cerebro, páncreas y riñón frente al exceso de hierro para limitar su captación vía el transportador DMT1.

2.2.3 Importador de hierro ZIP14

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro mostramos el aumento de la expresión de ZIP14 lo que indicaría que es el transportador responsable de la captación y los depósitos del biometal. En este contexto Nam et al (2013) reportaron el aumento de ZIP14 hepático en ratas sobrecargadas de hierro.

La bibliografía soporta nuestra hipótesis dado que el transportador Rtf1 también disminuye su expresión en estados de sobrecarga indicando que este transportador al igual que DMT1 tampoco sería responsable de los depósitos hepáticos de hierro (Nam et al. 2013).

En un modelo murino de hemocromatosis utilizando ratones knockout para SLC39A14 (gen que codifica para ZIP14) se observó la disminución de los depósitos de hierro hepáticos y pancreáticos (Jenkitkasamwong et al. 2015).

Otros estudios en ratones han demostrado que el hierro NTBI plasmático es rápidamente y eficientemente captado por el hígado, páncreas, riñón y corazón (Bradbury et al. 1994; Wang y Knutson 2013).

De esta forma postulamos a ZIP14 como el transportador responsable de la captación de hierro NTBI hepático en estados de exceso de hierro. A diferencia de DMT1 y de ferritina, el ARNm de ZIP14 no posee elementos IRE por lo que no es regulado por el sistema IRE-IRP (Wallander et al. 2006; Nam et al. 2013).

En un modelo animal de ratas alimentadas con una dieta rica en hierro Nam et al. (2013) describieron que el hierro aumentó la expresión de la proteína ZIP14 y no su ARNm en hígado, demostrando que ZIP14 sería regulado post-transcripcionalmente.

Si bien no se conocen claramente los eventos celulares que controlan post-transcripcionalmente a ZIP14, Nam et al. (2013) sugirieron los siguientes mecanismos: la inhibición de la traducción, la represión de la traducción por micro ARN o el control de la localización del ARNm.

En presencia de EPO observamos la reducción de la expresión de ZIP14 mientras que en el Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO la señal preponderante al igual que para DMT1 fue la señal de hierro lo que indicaría que el efecto protector de EPO no es mediado por ninguna de estas proteínas del ciclo del hierro.

2.2.4 Proteína reguladora hepcidina

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro observamos que prohepcidina responde al hierro aumentando su expresión mientras que en presencia de Eritropoyetina se observó una marcada disminución. Este resultado indicaría que frente a estados de exceso de hierro el aumento de la expresión de hepcidina disminuiría los niveles de FPN por el eje regulador hepcidina-ferroportina favoreciendo la acumulación celular de hierro.

Por el contrario, la evidente disminución de prohepcidina en estados de eritropoyesis activa conduciría a una disminución de hepcidina aumentando la expresión de FPN conduciendo a una mayor liberación de hierro desde los depósitos hacia la circulación. Se ha observado que frente al

exceso de hierro los niveles del ARNm de hepcidina y de la proteína HFE aumentan (Theurl et al. 2005)

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO observamos que la señal predominante es la señal de eritropoyetina.

En este sentido, se ha reportado una potente regulación negativa de la expresión de hepcidina hepática luego de la administración de eritropoyetina (Nicolas et al. 2002). Otros estudios también reportaron la disminución de la síntesis hepática de hepcidina en condiciones de anemia inducida por hemólisis (Nicolas et al. 2002).

Teniendo en cuenta las dificultades en el desarrollo de técnicas para medir hepcidina murina, en nuestros estudios evaluamos la expresión tisular de prohepcidina, dado que Valore & Ganz (2008) describieron una relación directa entre la síntesis celular de hepcidina y de su pro-péptido denominado prohepcidina.

Por lo tanto, la alta expresión de prohepcidina que detectamos en hígado en sobrecarga, refleja un aumento en la síntesis y liberación de hepcidina en el plasma.

A partir de estos resultados se podría postular que el exceso de hierro sistémico y tisular aumentarían la transcripción del gen de hepcidina, debido a que el elevado porcentaje de saturación de transferrina y el aumento del hierro hepático activan vías regulatorias que controlan transcripcionalmente la síntesis de la hormona (Ganz & Nemeth, 2012).

Respecto a la regulación de hepcidina por los niveles de hierro intracelular, Ramos E. et al. (2011) han propuesto que en la sobrecarga de hierro crónica hepcidina aumenta por el alto contenido de hierro hepático a través una regulación dependiente de HJV y BMP6 e independiente de RTf2 y HFE.

Los estudios de Latour et al. (2016) propusieron que en ratones *knock-out* para HJV, HJV-HFE y HJV-RTf2, BMP6 regularía la síntesis de hepcidina por una vía dependiente del receptor de BMP tipo I y tipo II e independiente de HJV, HFE y RTf2, evidenciando un mecanismo de regulación de hepcidina diferente al descrito por Ramos E. et al. (2011).

2.3 CONCLUSIONES

Concluimos que en Sobrecarga de Hierro el aumento de la expresión de ZIP14 y de prohepcidina actuarían en conjunto formando parte de un mecanismo para disminuir la biodisponibilidad de hierro circulante y evitar su toxicidad almacenándolo a nivel hepático en forma de L-ferritina y

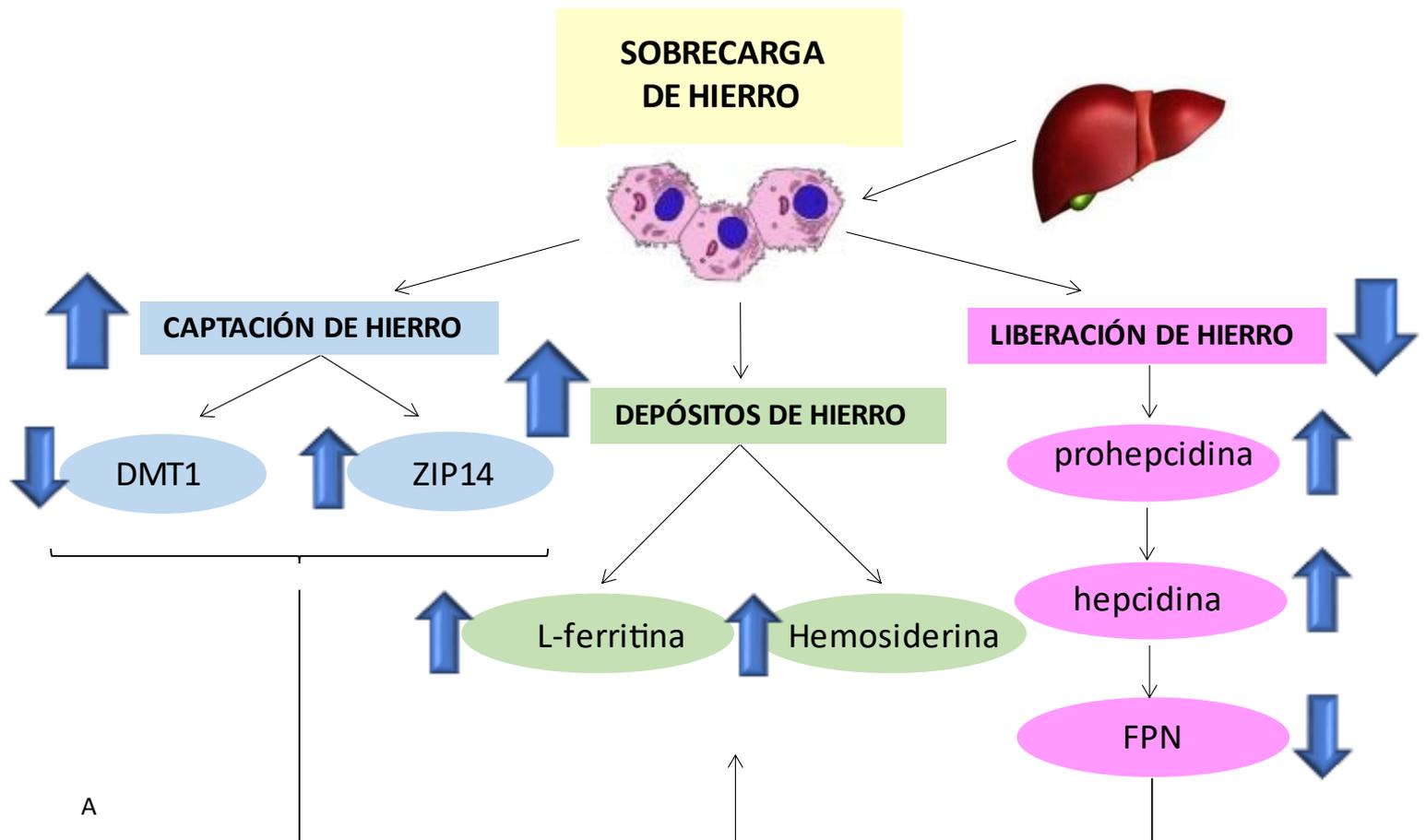
Discusión

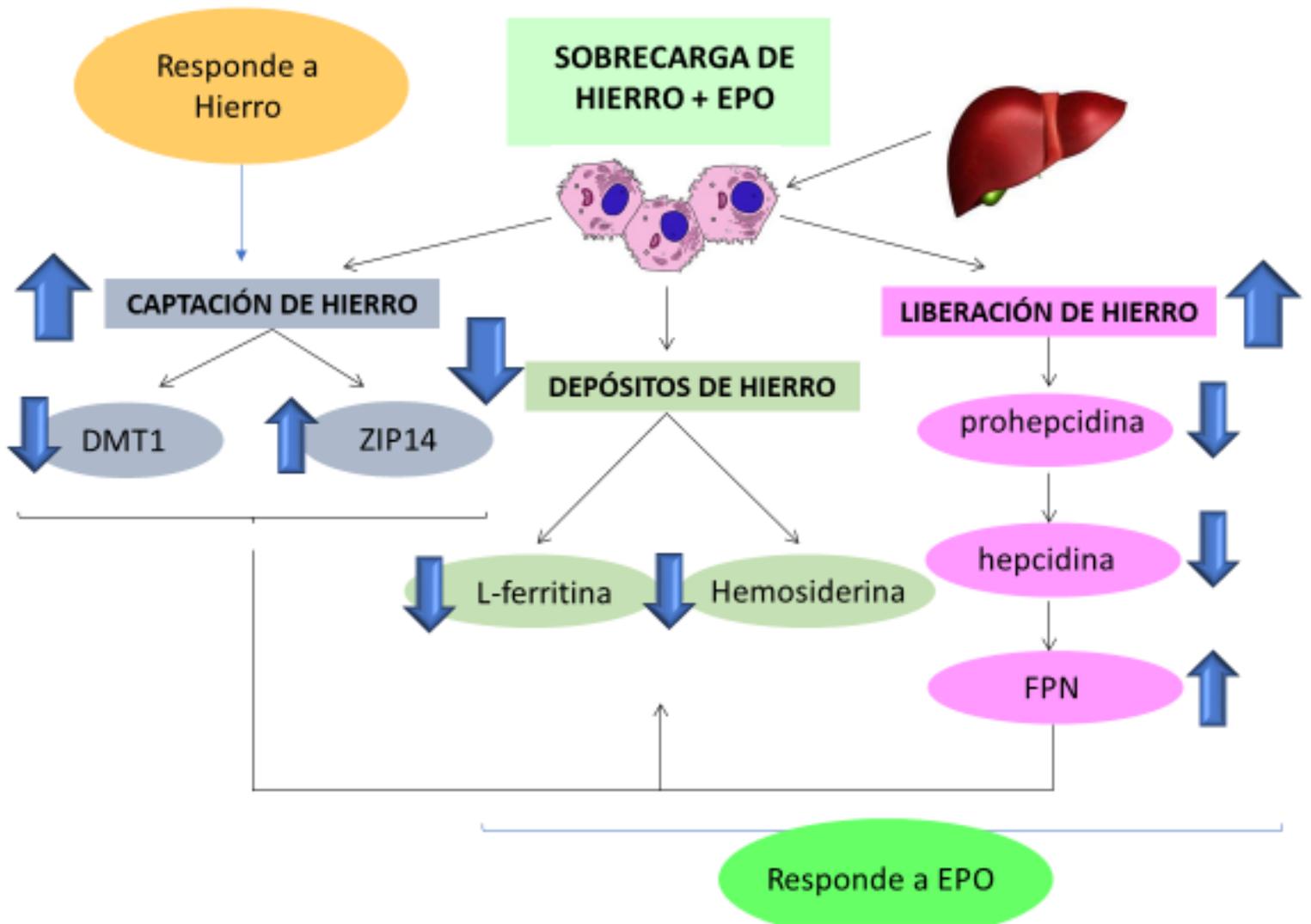
hemosiderina. La disminución de la expresión de DMT1 por hierro indicaría que dicho transportador no sería el responsable de la sobrecarga de hierro a nivel hepático (Esquema 2 A).

La regulación negativa de hepcidina sobre DMT1 fue descrita previamente en células intestinales, aunque el mecanismo regulatorio no ha sido totalmente aclarado (Mena et al. 2008; Brasselagnel et al., 2011). Mena et al. (2008) demostraron que hepcidina regularía negativamente la transcripción de DMT1, mientras que Brasselagnel et al. (2011) describieron que hepcidina induciría la internalización y degradación proteosomal de DMT1.

En presencia de eritropoyetina la disminución de la expresión del transportador ZIP14 reflejaría una menor captación celular de hierro. Además, la disminución de la expresión de prohepcidina conlleva a un aumento de la liberación de hierro mediado por FPN (Esquema 2 B). Ambos mecanismos deplecionan los depósitos de hierro hepático para aumentar la biodisponibilidad de hierro a ser utilizado en la eritropoyesis activa.

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO esta última señal es la predominante indicando que EPO podría evitar la acumulación de hierro a nivel hepático y su toxicidad frente en estados de exceso de hierro.





B

Esquema 2. Regulación del metabolismo del hierro en hígado. Captación, depósitos y liberación en el modelo combinado de sobrecarga de hierro y eritropoyesis. En Sobrecarga de Hierro (A) aumenta la captación celular de hierro que se refleja en mayores depósitos del biometal en forma de hemosiderina y L-ferritina mediado por ZIP14. La disminución de la expresión de DMT1 implicaría un mecanismo protector para limitar la captación celular de hierro en exceso. En cuanto al eje hepcidina-ferroportina se mostró un aumento de la expresión de prohepcidina que se reflejaría en un aumento de hepcidina conduciendo finalmente a una disminución de FPN y una menor liberación de hierro a circulación, contribuyendo al aumento de los depósitos de hierro. En el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (B) se observó que la señal predominante fue la señal de hierro para DMT1 y ZIP14 aumentando la captación del hierro en exceso vía ZIP14 cumpliendo con su rol de órgano de depósito para proteger a otros tejidos más susceptibles sin embargo la expresión de prohepcidina siguió la señal de EPO mediando su mecanismo protector mediante la liberación de hierro a circulación para disminuir los depósitos del mismo y que se utilice en la eritropoyesis.

3. RIÑÓN

3.1 CONTENIDO DE HIERRO

Es conocido que el tejido renal tiene un rol muy importante en la homeostasis del hierro en condiciones basales. Algunas enfermedades han sido asociadas con la acumulación de hierro en riñón causando daño renal (Kudo et al. 2008).

En este trabajo examinamos la función renal en el metabolismo del hierro en estados de sobrecarga de hierro y eritropoyesis inducida por inyecciones de eritropoyetina.

El riñón es un tejido capaz de sobrecargarse de hierro en estados de exceso en forma de hemosiderina. La observación de altos niveles de hemosiderina en los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal nos indican que estos túbulos son los principales sitios que almacenan hierro.

De esta forma postulamos que la acumulación de hierro en el túbulo proximal podría ser el agente etiológico responsable del daño celular renal. En este sentido, Kudo et al. (2008) demostraron que el exceso de hierro afectó la función renal e indujo daño de las células epiteliales del túbulo proximal con vacuolización, descamación, y necrosis en ratas sobrecargadas de hierro por la administración intravenosa de hierro sacarato.

Por otra parte, mostramos la disminución de los depósitos del biometal en forma de hemosiderina tanto en corteza como en médula indicando que la eritropoyetina presenta un rol protector sobre el tejido renal frente al exceso de hierro. Estudios recientes soportan nuestros resultados al reportar la acción regenerativa de la citoquina sobre riñones transplantados (Liyu Ye et al. 2020).

En este sentido Chen et al. (2015) reportaron que la administración exógena de eritropoyetina a ratas con injuria renal, atenúa el daño previniendo la apoptosis de las células tubulares renales,

restablece la función renal, previene la apoptosis de las células tubulares, y promueve la proliferación celular.

En este contexto Lin et al. (2013) demostraron el efecto protector de EPO en ratas sometidas a ejercicio continuo y daño renal crónico demostrando la inhibición de la apoptosis y la formación de fibrosis intersticial por la activación de la vía PI3K/Akt. Imamura et al. (2007) demostraron que la eritropoyetina protege al riñón de los daños ocasionados por la isquemia y reperfusión mediante la activación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α), acelerando la regeneración tubular.

3.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

3.2.1 *Importador de hierro DMT1*

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro mostramos una marcada disminución de la expresión del importador DMT1 indicando que este transportador no sería el responsable de la captación celular de hierro favoreciendo la excreción de hierro en la orina como parte de un mecanismo de protección renal.

La excreción renal de cationes divalentes es la principal forma de control de los niveles de los mismos, sin embargo, poco es conocido sobre el manejo de hierro por el riñón. Wareing et al. (2000) reportaron la presencia de hierro en el ultrafiltrado y que la mayoría del hierro filtrado es reabsorbido en los túbulos renales. Varios estudios demostraron la expresión del importador DMT1 en túbulos renales en ratas y ratones (Ferguson et al. 2001, Cannone-Hergaux y Gros 2002).

La disminución de DMT1 observada en los segmentos S2 del túbulo proximal y en la médula interna en exceso de hierro, podría explicarse por la degradación del ARNm de DMT1 por la inactivación de las proteínas citosólicas IRPs cuando el nivel celular de hierro es alto, postulando una regulación post-transcripcional similar a la identificada en duodeno (Canonne-Hergaux et al. 1999).

En este sentido Canonne- Hergaux y Gros (2002) reportaron que bajo una dieta deficiente de hierro la expresión de DMT1 en ratones aumenta. Soportando nuestros resultados Wareing et al. (2003) demostraron la disminución de la expresión del importador en ratas sometidas a dietas ricas en hierro.

Tchernitchko et al. (2002) demostraron la presencia de ambas isoformas, IRE y no IRE en riñón de ratón.

En condiciones basales observamos la localización intracelular del transportador en los túbulos proximales sobre todo en el segmento S2 y en médula sugiriendo su rol en el transporte de hierro.

Esta localización de DMT1 en las células tubulares proximales y de la médula interna, podría sugerir la participación de DMT1 en la captación del hierro unido a transferrina contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis del hierro en el riñón.

La localización del importador en la bibliografía varía entre subapical, apical e intracelular dependiendo del modelo animal empleado demostrando su rol en la captación de hierro desde el filtrado, pero también su importancia en endosomas y lisosomas (Abouhamed et al 2006; Canonne-Hergaux y Gros 2002).

En el grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO mostramos que la señal preponderante es la de hierro indicando que el mecanismo protector de eritropoyetina no sería mediado por este transportador.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron abundante expresión intracelular cerca de la membrana apical de DMT1 en condiciones basales mientras que en un modelo de anemia hemolítica se observó aumento de la expresión sobre todo en los segmentos S2 del túbulo proximal (Veuthey, D'Anna y Roque 2008).

La regulación de DMT1 en el riñón sería dependiente de las necesidades sistémicas de hierro, reflejando su función en la captación renal de hierro (Veuthey, D'Anna y Roque 2008).

De esta forma postulamos que frente al exceso de hierro el riñón posee un mecanismo protector para limitar la captación celular de hierro y aumentar su excreción en la orina mediante la disminución de la expresión del transportador DMT1.

Ludwiczek et al. (2005) detectaron la presencia de ARNm de la ferrireductasa Dcytb en riñón sugiriendo que al igual que ocurre en intestino sería la proteína de membrana encargada de la reducción del hierro férrico a estado ferroso para poder ser internalizado por el importador DMT1.

3.2.2 Importador de hierro ZIP14

En condiciones basales Identificamos la presencia de ZIP14 en las células de los túbulos proximales y de la médula interna sugiriendo que ZIP14 participaría en la captación del hierro libre del ultrafiltrado glomerular.

Se ha descrito que ZIP14 participa en la movilización endosomal de hierro, compitiendo con DMT1 en el transporte del hierro desde el interior del endosoma hacia el citoplasma en células pancreáticas y hepáticas (Zhao et al. 2010; Nam et al. 2013). La localización apical de este transportador ha sido previamente caracterizada en una línea celular del epitelio renal (células MDCK) en condiciones basales (Girijashanker et al. 2009). Recientemente van Raaij et al. (2019) demostraron la presencia de ZIP8 y ZIP14 en la membrana plasmática de células epiteliales de túbulo proximal humanas (ciPTECs) al incubarlas con ^{55}Fe .

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro mostramos el marcado aumento de la expresión citoplasmática de ZIP14 en los segmentos S2 del túbulo proximal. En este contexto se propone que ZIP14 podría estar involucrado en el transporte endosomal de hierro NTBI y también mediar la captación celular de hierro TBI.

De manera novedosa mostramos en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO que este transportador sigue como señal predominante a la señal EPO disminuyendo su expresión, de esta manera postulamos que el mecanismo protector mediado por la eritropoyesis activa es a través de la disminución de la captación de hierro desde el filtrado vía ZIP14.

Otro aporte de nuestros estudios es el marcado aumento cortical de ZIP14 en Sobrecarga de Hierro que evidencia su función en la captación del hierro en exceso, en coincidencia con la actividad de ZIP14 descrita en hígado, páncreas, cerebro y células de neuroblastoma. El aumento de ZIP14 en las células epiteliales del túbulo proximal explicaría la sobrecarga observada en estos túbulos.

Si bien hasta el presente no se conocen claramente los mecanismos que regulan la expresión de ZIP14 por hierro, Nam et al. (2013) describieron que el aumento de ZIP14 en exceso de hierro sería mediado por un control post-transcripcional.

3.2.3 Proteína reguladora hepcidina

La proteína hepcidina es un componente clave en la homeostasis del ciclo del hierro actuando como un regulador negativo de la absorción de hierro a nivel intestinal y de la liberación desde los macrófagos (Nicolas et al. 2001).

Si bien se conoce que ésta hormona es mayormente sintetizada a nivel hepático (Park et al. 2001), existe evidencia de que el péptido bioactivo podría tener un rol a nivel renal y del tracto urinario (Ferguson et al. 2003; Wareing et al. 2003).

Discusión

Ha sido demostrado que hepcidina no solo es eliminada por el riñón, sino que también se sintetiza en el sistema tubular renal (Kulaksiz et al. 2005). Por tanto, la hepcidina renal puede ser derivada de la circulación, proveniente del plasma filtrado o producida a nivel local por las células tubulares.

La localización de hepcidina en el polo apical de las células de los túbulos renales sugiere que puede ser eliminada hacia la orina (Kulaksiz et al. 2005).

En nuestro laboratorio se observó la presencia de prohepcidina en condiciones basales asociada a la membrana basal sugiriendo posiblemente su interacción con el exportador Ferroportina, molécula propuesta como receptor de hepcidina (Veuthey, D'Anna y Roque 2008).

Esta localización observada de prohepcidina a nivel basal sugeriría la posible liberación del péptido hepcidina hacia la circulación (Veuthey, D'Anna y Roque 2008)

Además, la presencia de hepcidina a nivel renal implica su participación en la regulación del ciclo del hierro a nivel de este tejido posiblemente en conexión con el importador de hierro DMT1.

En este sentido, Moulouel et al. (2013) reportaron que al incubar células OK con hepcidina exógena DMT1 fue internalizado demostrando que dicho transportador es un blanco de hepcidina.

En el Modelo Animal de EPO mostramos la disminución de la expresión de prohepcidina en el túbulo proximal indicando la regulación negativa entre EPO y hepcidina.

En este sentido, estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio demostraron que los elevados niveles de EPO presentes en el estado de anemia hemolítica fueron responsables de la regulación negativa de los niveles de hepcidina hepática y la baja expresión del péptido a nivel renal (Veuthey, D'Anna y Roque, 2008).

Todavía no es del todo claro como la hipoxia y la señal de EPO se relacionan con la síntesis y expresión de prohepcidina.

La disminución de la expresión de prohepcidina podría indicar un aumento de la expresión del exportador de hierro FPN vía el eje regulador hepcidina-FPN sugiriendo que en estados de eritropoyesis activa el hierro se reabsorbe y vuelve a circulación para ser utilizado en la síntesis de hemoglobina.

Al igual que en el tejido hepático en exceso de hierro en riñón identificamos una elevada expresión de prohepcidina por lo que postulamos la existencia de un mecanismo regulatorio común en ambos tejidos.

Una hipótesis que explicaría el aumento de prohepcidina en exceso de hierro, se basa en el control transcripcional del gen de hepcidina por el alto porcentaje de saturación de transferrina y por el aumento del hierro celular a través de una vía mediada por las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y SMADs.

Se conoce que la unión de la transferrina diférrica (Tf-Fe) al RTf1 produce el desplazamiento de la proteína HFE desde el RTf1 hasta el RTf2 (Pantapoulos, 2008). Como fue mencionado anteriormente, el complejo RTf2-HFE se estabiliza por la interacción de Tf-Fe aumentando la síntesis de BMP6 (Rishi et al. 2015).

Luego, BMP6 interaccionaría con su co-receptor HJV y con su receptor RBMP desencadenando la fosforilación de SMAD1/5/8 (Rishi et al. 2015).

Finalmente, las proteínas SMADs fosforiladas (pSMAD1/5/8) formarían un complejo con SMAD4 que translocaría al núcleo y activaría la transcripción del gen de hepcidina (De Domenico et al. 2007).

Postulamos que el aumento de la expresión de hepcidina y la disminución de la expresión de DMT1 que observamos en riñón en presencia de hierro podrían reflejar una función moduladora negativa de hepcidina sobre la captación renal de hierro para limitar su importación.

En coincidencia con nuestra hipótesis, estudios realizados en células renales de ratón *knock-out* para hepcidina tratadas con hepcidina exógena observaron, que hepcidina regularía negativamente a DMT1 (Moulouel et al., 2013).

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO mostramos que la señal de hierro es la señal predominante frente a la señal de la eritropoyesis para la expresión de prohepcidina.

3.3 CONCLUSIONES

Nuestros resultados nos permiten concluir que las células del túbulo proximal y de la médula interna son los segmentos de la nefrona que participan en la regulación del ciclo del hierro en este órgano. El riñón posee un mecanismo regulatorio coordinado de las proteínas clave del ciclo del hierro en estados de exceso del mismo.

Discusión

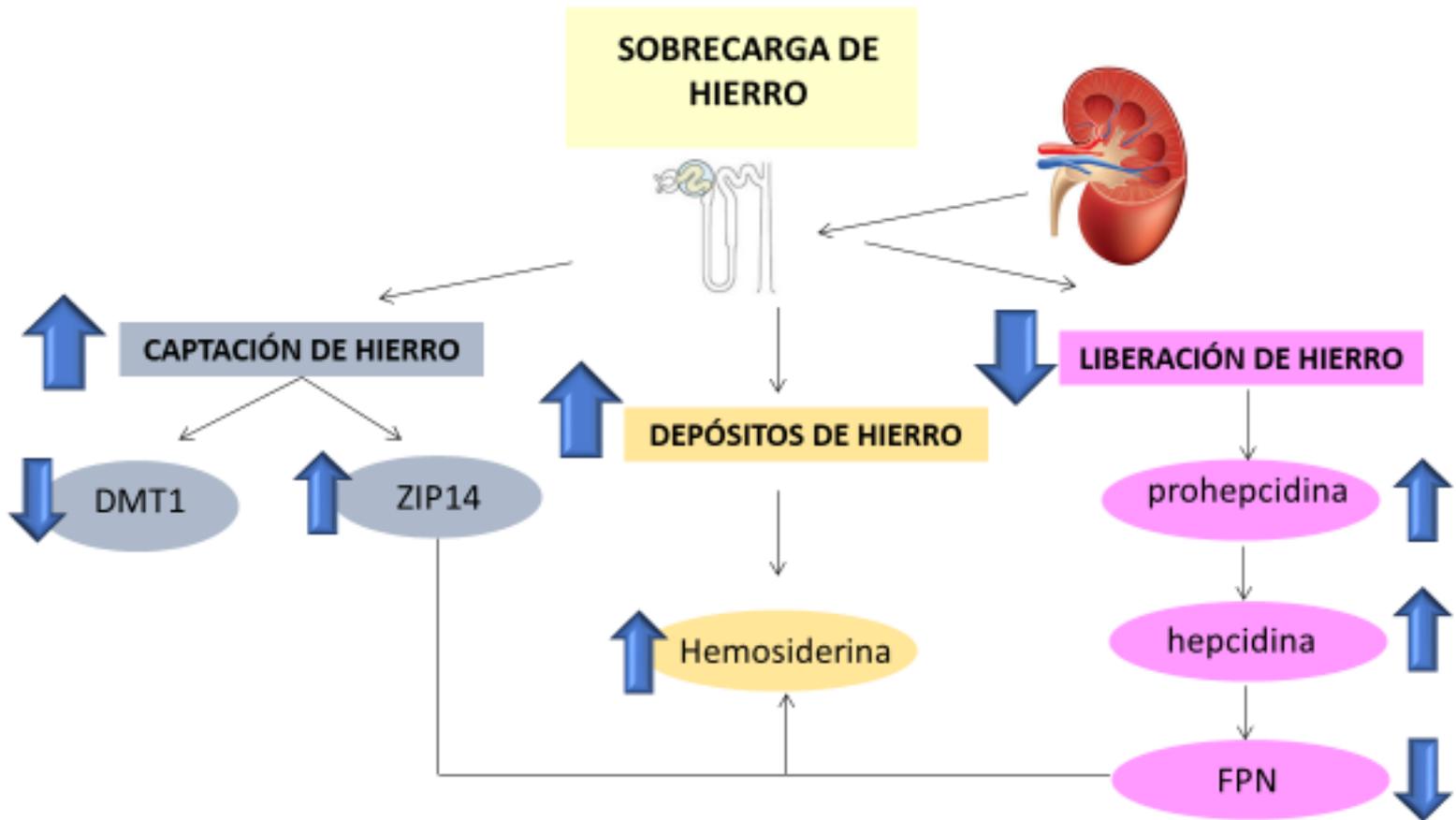
La disminución en la expresión de DMT1 en los túbulos proximales y en la médula interna en sobrecarga de hierro podría ser un mecanismo que intenta limitar la captación de hierro en exceso. Sin embargo, el aumento de hemosiderina muestra que las células epiteliales del túbulo proximal se encuentran sobrecargadas de hierro (Esquema 3 A).

En este sentido, el aumento de la expresión de ZIP14 en las células del túbulo proximal sería el mecanismo responsable del transporte del exceso de hierro al interior celular que originaría la sobrecarga observada.

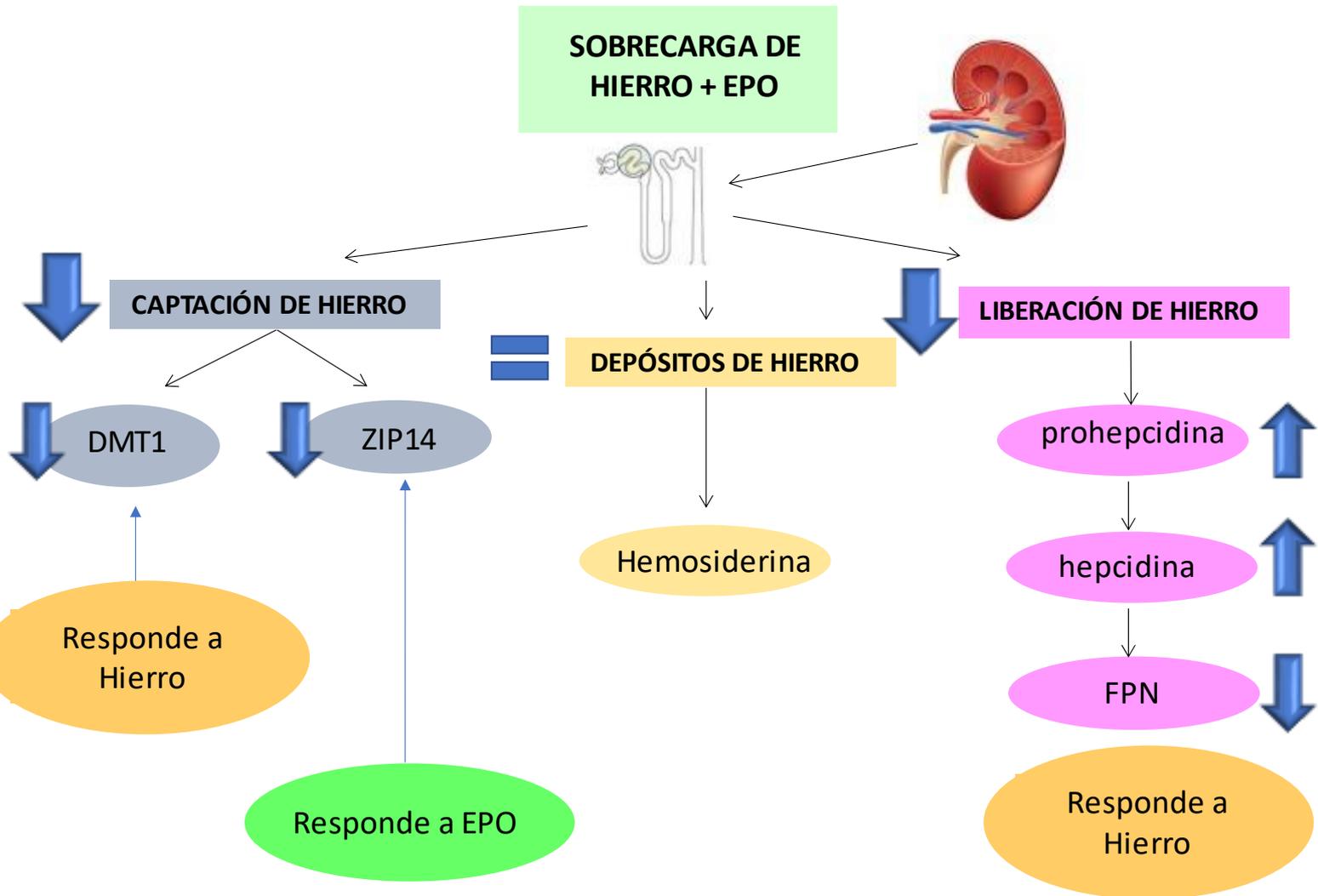
El eje hepcidina-FPN contribuiría a la acumulación de hierro intracelular en forma de hemosiderina en estados de exceso disminuyendo su reabsorción a la circulación intentando disminuir la sobrecarga sistémica.

El mecanismo protector de EPO por el cual disminuyen los depósitos intracelulares de hierro en forma de hemosiderina en estados de exceso de hierro sería mediado por la disminución de la expresión del transportador ZIP14 (Esquema 3 B).

La eritropoyesis activa mediaría un mecanismo regulatorio mediado por DMT1 y el eje regulatorio hepcidina-FPN para reabsorber mayor cantidad de hierro hacia la circulación y utilizarlo en la síntesis del grupo HEMO. Sin embargo, cuando ambos estímulos coexisten es la señal de hierro la predominante en la expresión de estas dos proteínas del ciclo del hierro (Esquema 3 C).



A



B

Esquema 3. Regulación del metabolismo del hierro en riñón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. En sobrecarga de Hierro (A) aumenta la captación celular de hierro que se refleja en mayores depósitos del biometal en forma de hemosiderina mediado por ZIP14. La disminución de la expresión de DMT1 implicaría un mecanismo protector para limitar la captación celular de hierro en exceso. En cuanto al eje hepcidina-ferroportina se mostró un aumento de la expresión de prohepcidina que se reflejaría en un aumento de hepcidina conduciendo finalmente a una disminución de FPN y una menor liberación de hierro a circulación y mayor liberación del biometal hacia la orina. En el grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO (B) se observó que la señal predominante fue la señal de EPO para ZIP14 mediando su mecanismo protector a través de la disminución de la expresión de este transportador disminuyendo la captación de hierro celular y para prohepcidina y DMT1 la señal predominante fue la señal de hierro.

4. CONCLUSION GENERAL

El duodeno, hígado y riñón son tres tejidos íntimamente relacionados dado que se encargan de manera coordinada de mantener la homeostasis del hierro mediante su absorción desde la dieta, los depósitos del biometal y la reabsorción desde el filtrado o su eliminación en orina.

En respuesta al exceso de hierro estos tejidos desarrollan un mecanismo protector para evitar o disminuir la toxicidad ocasionada por hierro y el daño celular mediante la disminución de la captación del mismo vía el transportador de metales divalentes DMT1 disminuyendo su expresión o cambiando su localización celular.

Sin embargo, la sobrecarga de hierro observada en forma de L-ferritina y hemosiderina en hígado y riñón podría ser atribuida al importador ZIP14 que se encuentra altamente expresado en esta condición y al aumento de prohepcidina que implicaría una menor liberación del biometal.

La eritropoyetina ejerce su rol protector en hígado y en riñón disminuyendo los depósitos del biometal mediante la reducción de la expresión del importador ZIP14 renal y la disminución de la expresión de prohepcidina hepática que implicaría una disminución de la expresión de hepcidina y por el eje hepcidina-FPN indicaría una mayor liberación de hierro a circulación desde los depósitos hepáticos para que el mismo se encuentre disponible para ser utilizado en la eritropoyesis activa.

Capítulo 3

Modelo Animal

Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.

Movilización de hierro

Corazón

Pulmón

Páncreas

1.INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar la expresión de las proteínas clave del ciclo del hierro en nuestro Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO en corazón, pulmón y páncreas.

Además, nos propusimos evaluar el efecto de EPO en estos tres tejidos frente al exceso de hierro dado que la identificación del receptor de eritropoyetina en tejidos no eritropoyéticos como corazón, pulmón y páncreas y la ampliamente reportada acción citoprotectora de la eritropoyetina en tejidos no eritropoyéticos conduce a la hipótesis de que la misma podría llevar a cabo un mecanismo protector frente al exceso de hierro en dichos tejidos.

Se ha descrito que los desórdenes del metabolismo del hierro, exceso o deficiencia de hierro, conducen a trastornos cardíacos (Zhang et al. 2019).

El estrés oxidativo genera la formación de especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas para las células por sobrecarga de hierro y se asocia a la formación de placas ateromatosas y de trombosis (Cornelissen et al. 2019). El rol del exceso de hierro en la patogénesis de la aterosclerosis sería mediado por hepcidina (Cornelissen et al. 2019).

La homeostasis del hierro requiere de un estricto control mediado fundamentalmente por las proteínas reguladoras del ciclo del hierro (Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

Nuevas evidencias revelan que hepcidina cardíaca es crítica para el control intracelular de hierro y la adecuada función cardíaca (Lakhal-Littleton 2019).

La dishomeostasis del hierro se asocia con enfermedades pulmonares crónicas. La homeostasis del hierro puede ser irrupida en numerosas enfermedades pulmonares como fibrosis quística, trasplantes, y en fumadores (Ghio 2009).

Estudios de nuestro laboratorio en un modelo animal de sobrecarga de hierro mostraron que el pulmón posee mecanismos para la detoxificación y protección tisular mediado principalmente por los importadores de hierro DMT1, ZIP14, FPN y ferritina (Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

Estudios de Ghio et al. (2006) demostraron que el pulmón tiene mecanismos de detoxificación para prevenir la generación de estrés oxidativo en el cual participan proteínas que también captan hierro a nivel intestinal para secuestrar al hierro en su forma inactiva ferritina.

Por otro lado, Bany-Mohammed et al. (1996) mostraron en un modelo animal de hiperoxia el rol protector de EPO en pulmón. Asimismo, Macredmond et al. (2009) reportaron en un modelo celular

Resultados

de enfermedad pulmonar aguda la reducción de la apoptosis al utilizar EPO como pretratamiento. You Shang et al. (2009) demostraron que la eritropoyetina atenúa el daño causado por lipopolisacárido en ratas.

Las manifestaciones de acumulación de hierro a nivel extrahepático en estados de sobrecarga de hierro son amplias, a nivel pancreático el hierro produce la destrucción de las células β conduciendo a diabetes mellitus, además el tejido pancreático normal es reemplazado por tejido fibroso (Whittaker et al. 1996).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el páncreas es capaz de sobrecargarse de hierro y que DMT1 posee una regulación negativa dada por hepcidina que podría conducir a la reducción de los depósitos de hierro en los islotes de Langerhans (Giorgi y Roque 2014).

Fenjves et al. (2003) demostraron la presencia del receptor de EPO en los islotes pancreáticos de varias especies y que EPO puede prevenir la apoptosis inducida por citoquinas en células de los islotes pancreáticos en cultivo.

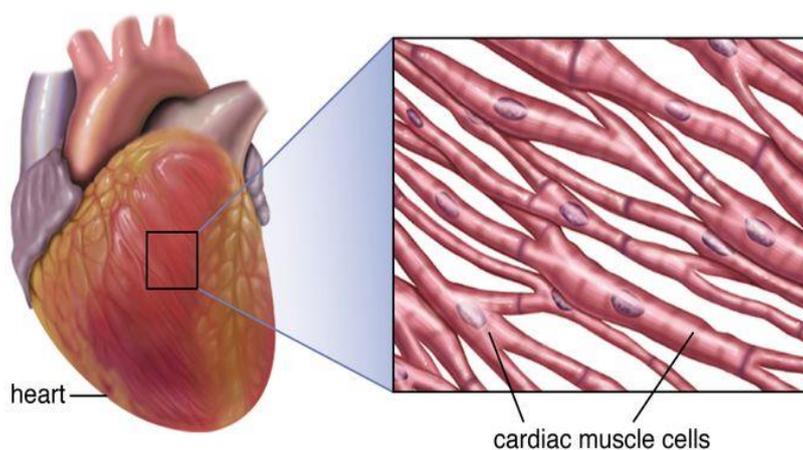
En este sentido Chen et al. (2015) proponen a EPO como un posible tratamiento para la diabetes mellitus dado que disminuye los niveles de glucosa sanguínea de manera muy rápida en ratones.

2. CORAZÓN

2.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA CARDÍACA

No se observaron cambios significativos en la histología en ninguna de las cuatro condiciones (Figura 1). En sobrecarga de hierro se puede observar además de color marrón al exceso de hierro tisular (Figuras 1 B y D).

La especie de ratón *Mus musculus* presenta una cardiogénesis similar a la humana y constituye un buen biomodelo para investigación, con hallazgos extrapolables (Falla- Zuñiga y Salazar Mansalve 2017). El miocardio es un tejido altamente organizado, compuesto por diferentes tipos celulares que incluyen células de músculo liso, fibroblastos y miocitos cardíacos (Esquema 1).



Esquema 1. Células musculares cardíacas.
Enciclopedia Británica, Inc.

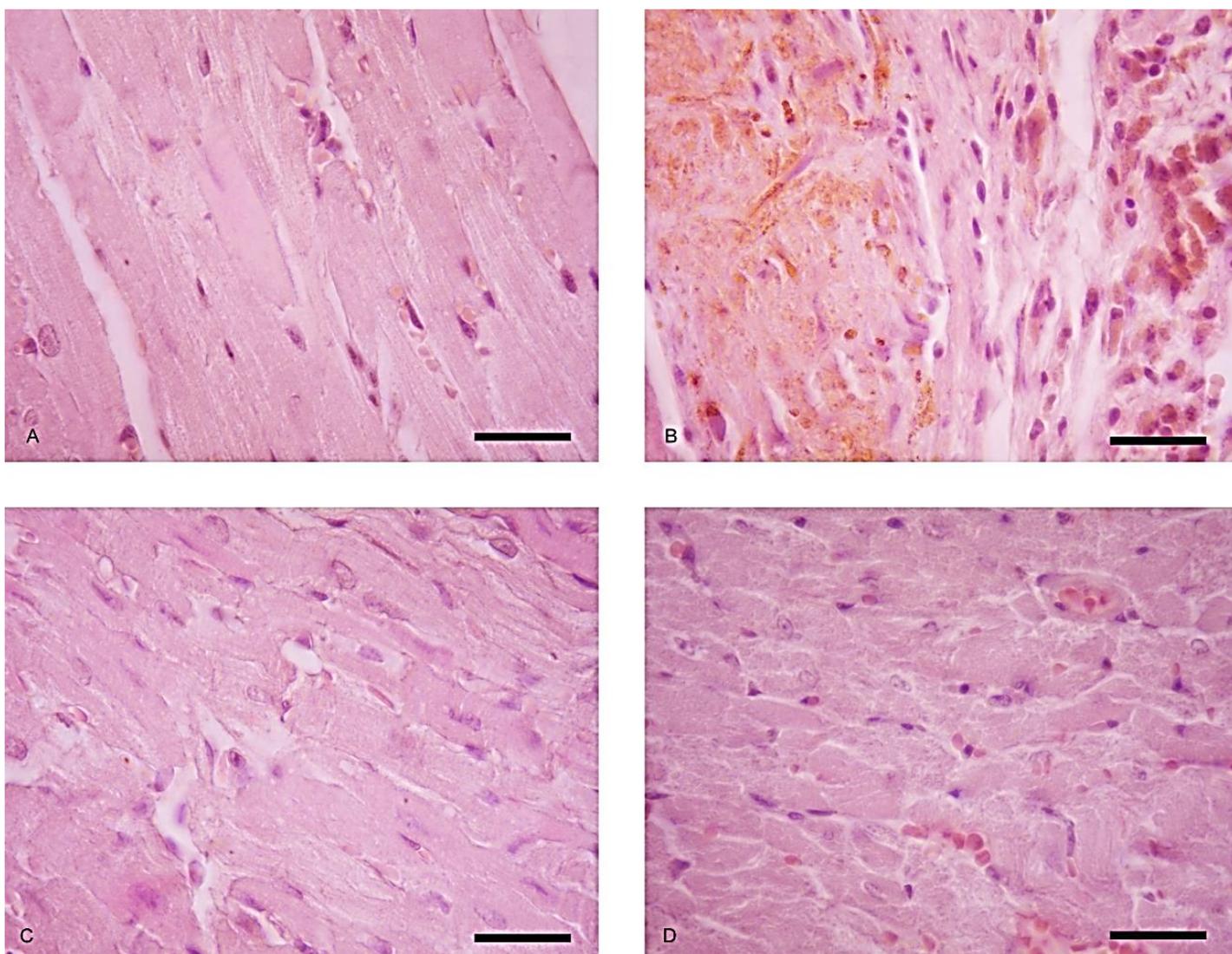


Figura 1. Histología cardíaca en el Modelo Animal de Sobrecarga de hierro + EPO. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

2.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO CARDÍACO

2.2 Cuantificación de hierro tisular

El nivel de hierro tisular en el corazón aumentó de manera significativa en el Grupo de Sobrecarga de Hierro ($139,11 \pm 40,34\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) respecto al Grupo Control ($74 \pm 6,64\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) y al Grupo EPO ($63 \pm 10,8\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) (Figura 2) demostrando la acumulación de hierro cardíaca en estados de sobrecarga.

En el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO ($61 \pm 7\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) el nivel de hierro fue similar al del Grupo Control (Figura 2), es decir disminuyó significativamente respecto al Grupo Sobrecarga de Hierro sugiriendo un rol cardioprotector por parte de la eritropoyetina.

Resultados

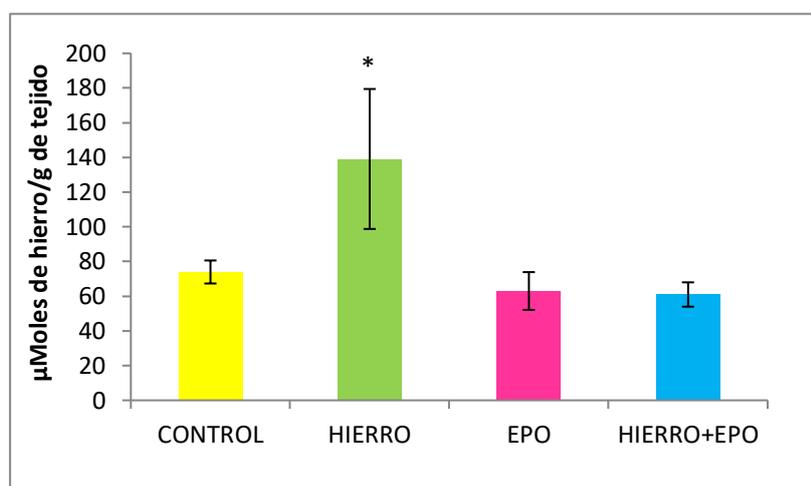


Figura 2. Cuantificación de hierro cardíaco en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en μ Moles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$

2.2.2 Semicuantificación de hemosiderina

Los depósitos de hierro en forma de hemosiderina se semicuantificaron utilizando una escala arbitraria del 0 al 3 en donde 0 indica ausencia de hemosiderina y 3 abundante hemosiderina (Figura 3).

Mediante la tinción de Perl's descrita en Materiales y Métodos se pudo observar abundante hemosiderina en el Grupo Sobrecarga de Hierro respecto a los Grupos Control y EPO en donde prácticamente se encontraba ausente y escasa hemosiderina en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO respecto al Grupo Sobrecarga de Hierro (Figuras 4 B y D).

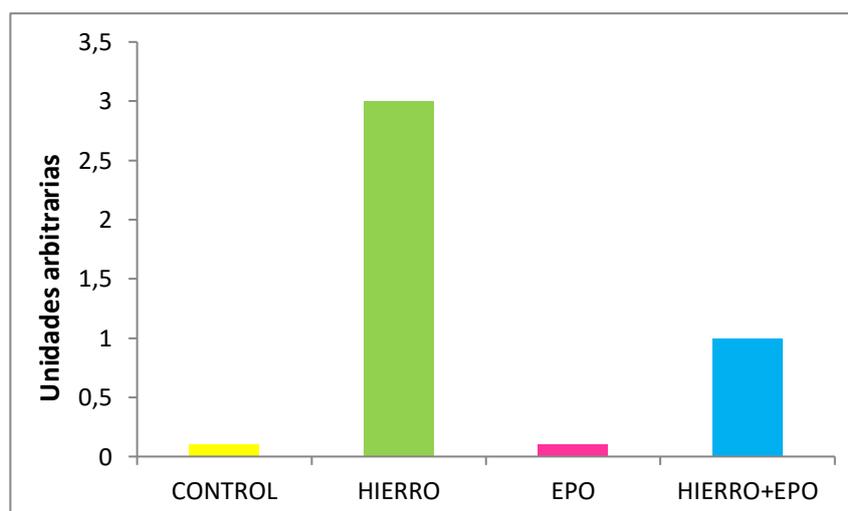


Figura 3. Semicuantificación de depósitos de hierro cardíaco como hemosiderina en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en unidades arbitrarias.

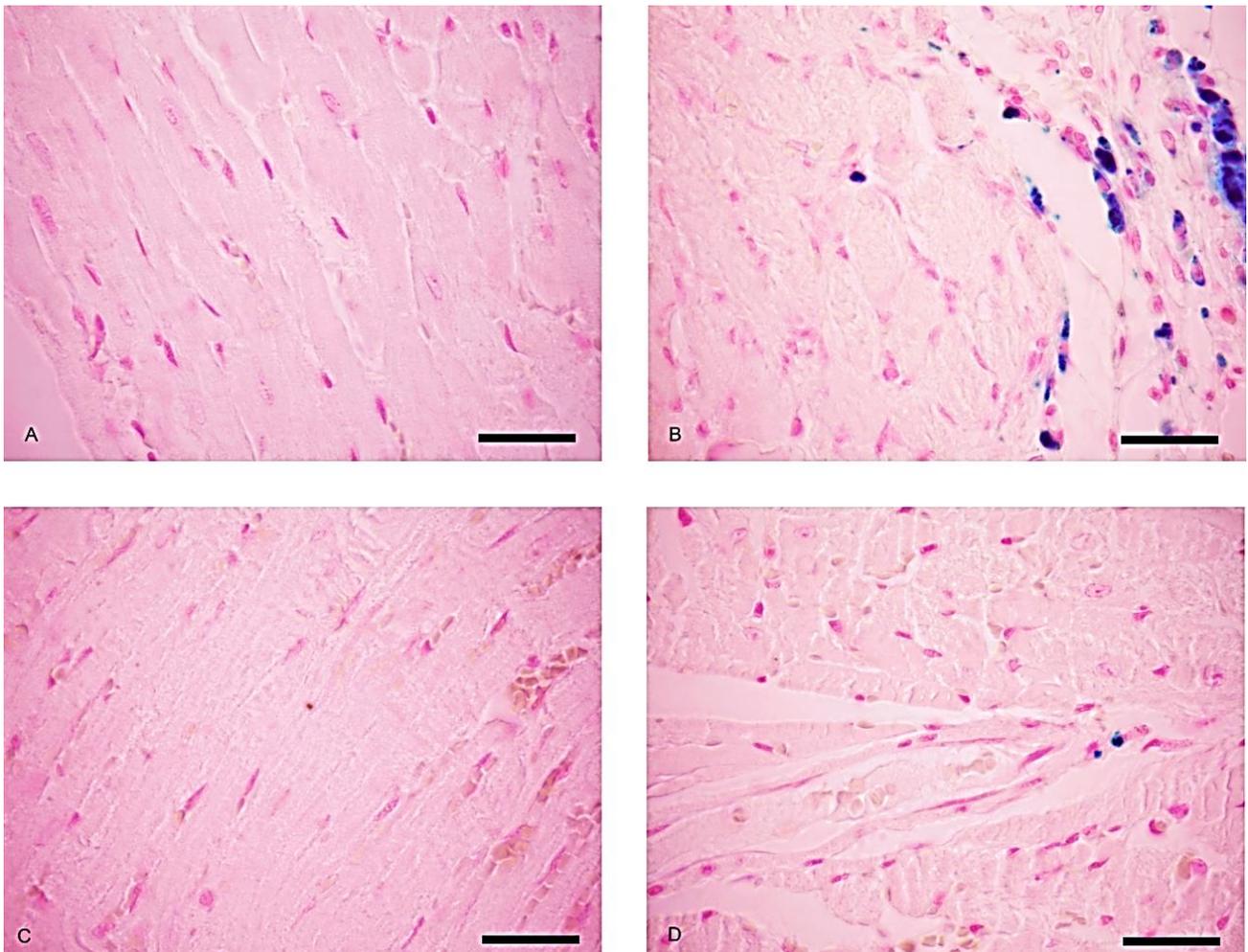


Figura 4. Observación de hemosiderina cardíaca. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en *Materiales y Métodos* (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

2.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

2.3.1 Expresión del Transportador de Metales Divalentes 1

Para el transportador de metales divalentes DMT1 se observó una intensa marcación en la condición Control y en el Grupo EPO (Figura 5 A y C) indicando su rol en la captación de hierro en miocitos en condiciones basales, mientras que en Sobrecarga de Hierro la marcación de DMT1 fue muy leve (Figura 5 B) lo que podría sugerir un mecanismo protector del miocardiocito frente a excesos de hierro para disminuir su captación. La señal predominante en el Grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO fue la de hierro (Figura 5 D).

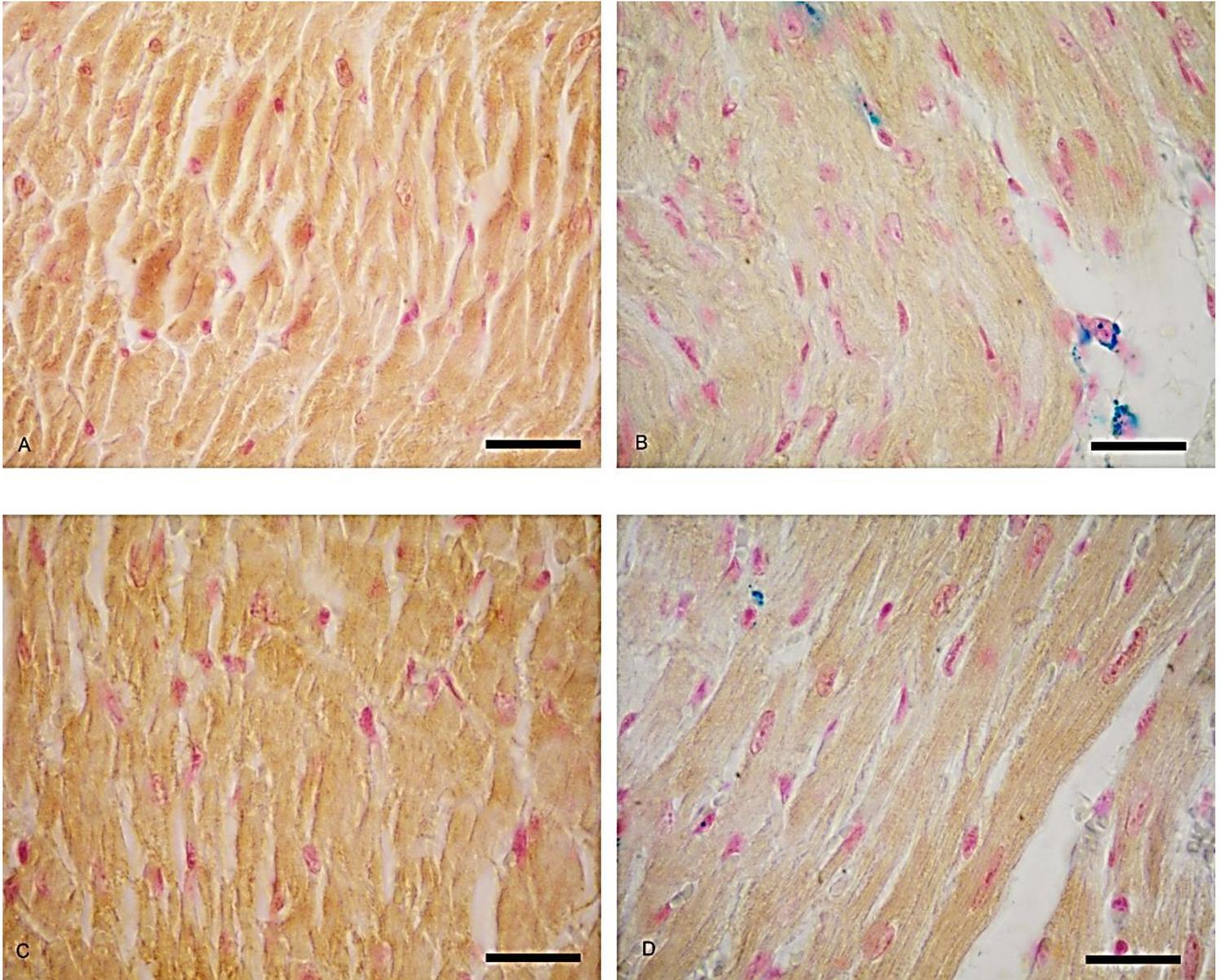


Figura 5. Inmunomarcación de DMT1 en corazón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

2.3.2 Expresión del transportador ZIP14

La inmunomarcación para el transportador ZIP14 fue similar en todas las condiciones (Figura 6) sugiriendo que la expresión de este transportador no sería regulada por hierro ni por EPO.

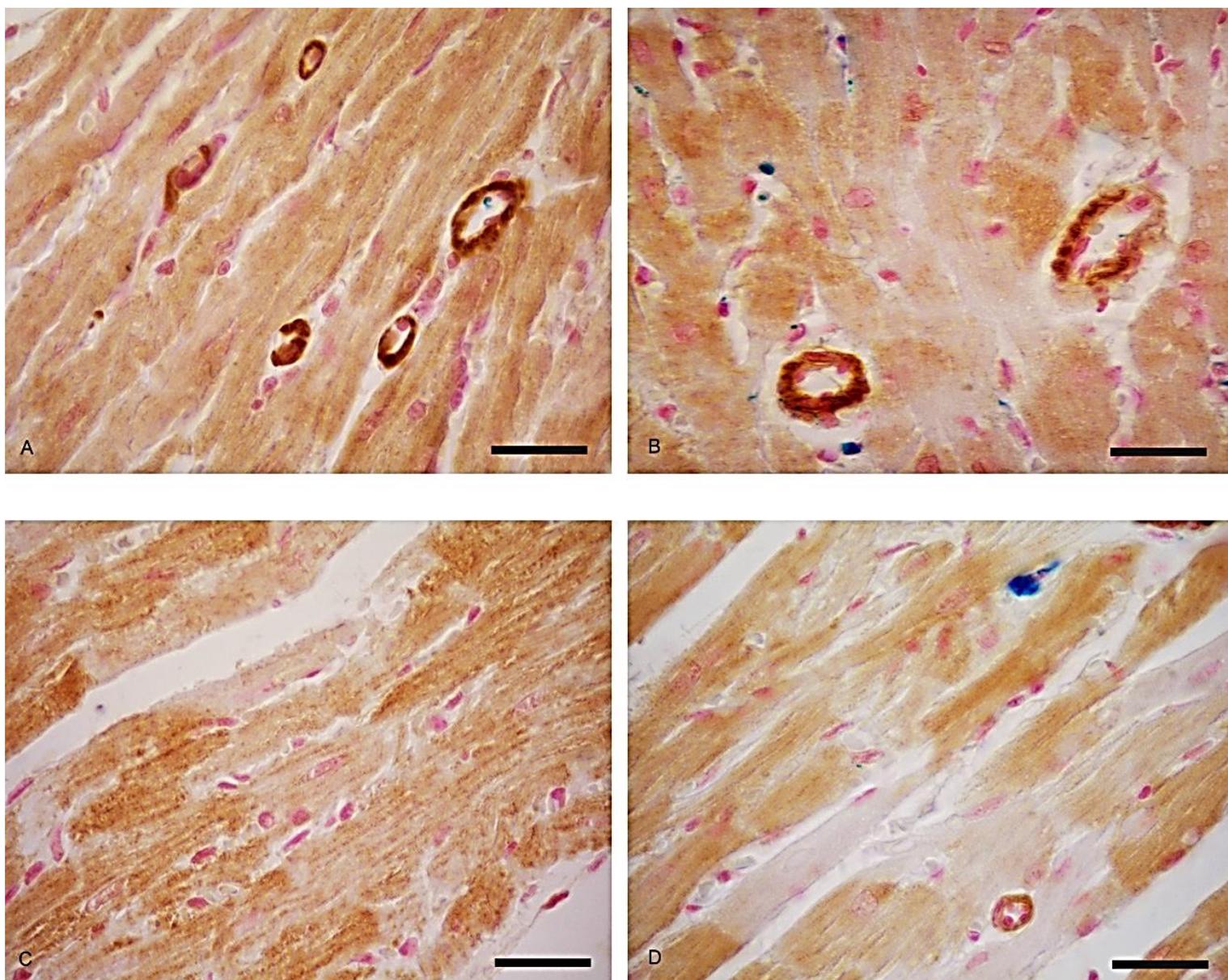


Figura 6. Inmunomarcación de ZIP14 en corazón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

2.2.3 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina

La expresión de L-ferritina muy intensa en el Grupo Sobrecarga de Hierro (Figura 7 B) mientras que en los demás grupos su inmunomarcación fue moderada siguiendo como señal predominante a la señal de EPO (Figura 7 D), sugiriendo que en el grupo combinado los depósitos de hierro en forma de L-ferritina disminuyen respecto al grupo de exceso, este resultado coincide con lo observado por tinción de Perls y la cuantificación de hierro tisular.

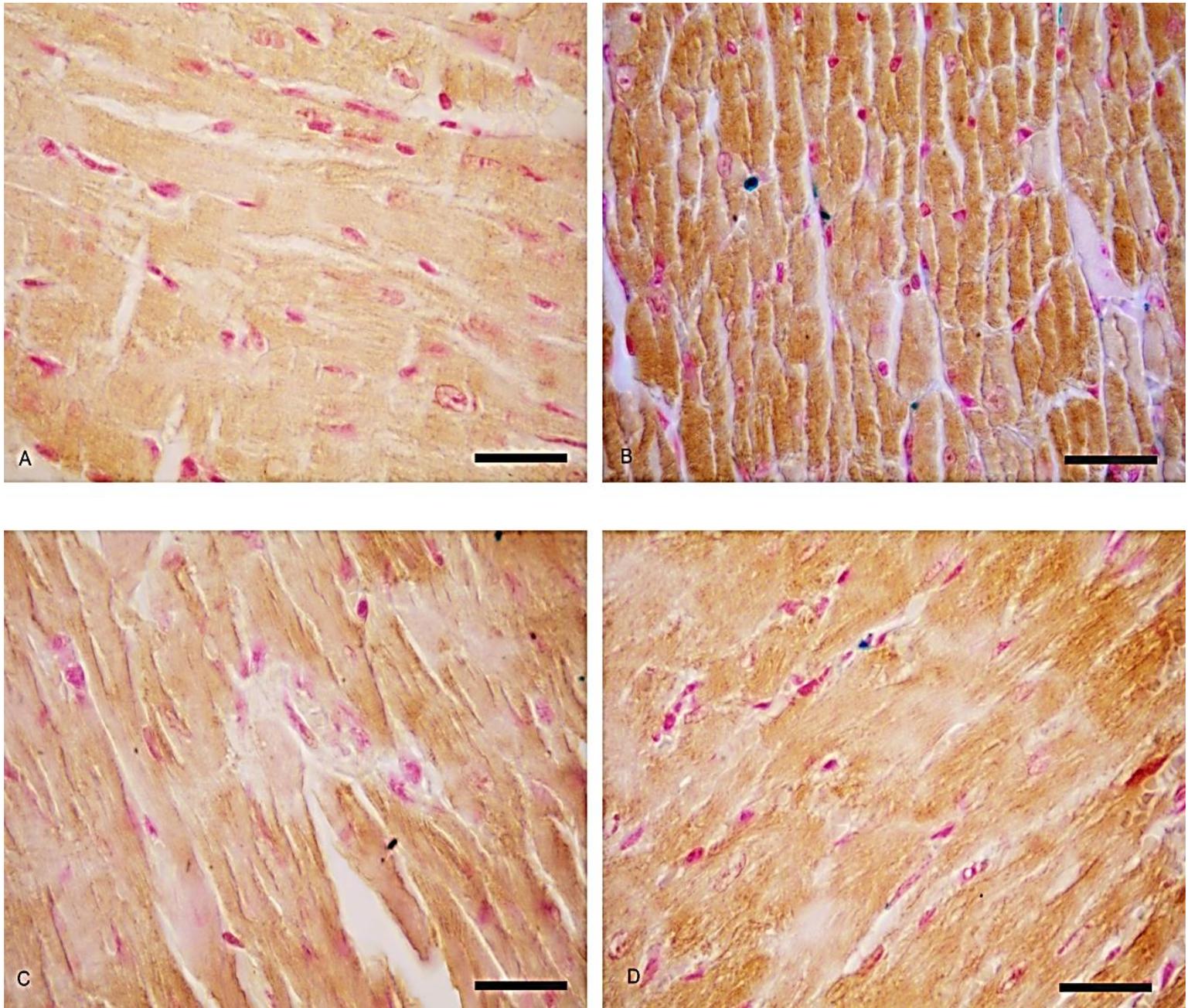


Figura 7. Inmunomarcación de L-ferritina en corazón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

2.2.4 Expresión de prohepcidina

La expresión del propéptido de la proteína regulatoria hepcidina fue intensa en el Grupo Sobrecarga de Hierro respecto al Grupo Control (Figura 8 B). Además, el Grupo EPO mostró una marcación leve respecto al Grupo Control (Figura 8 C).

El Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO mostró una marcación similar a la de EPO indicando que esta es la señal preponderante (Figura 8 D).

Resultados

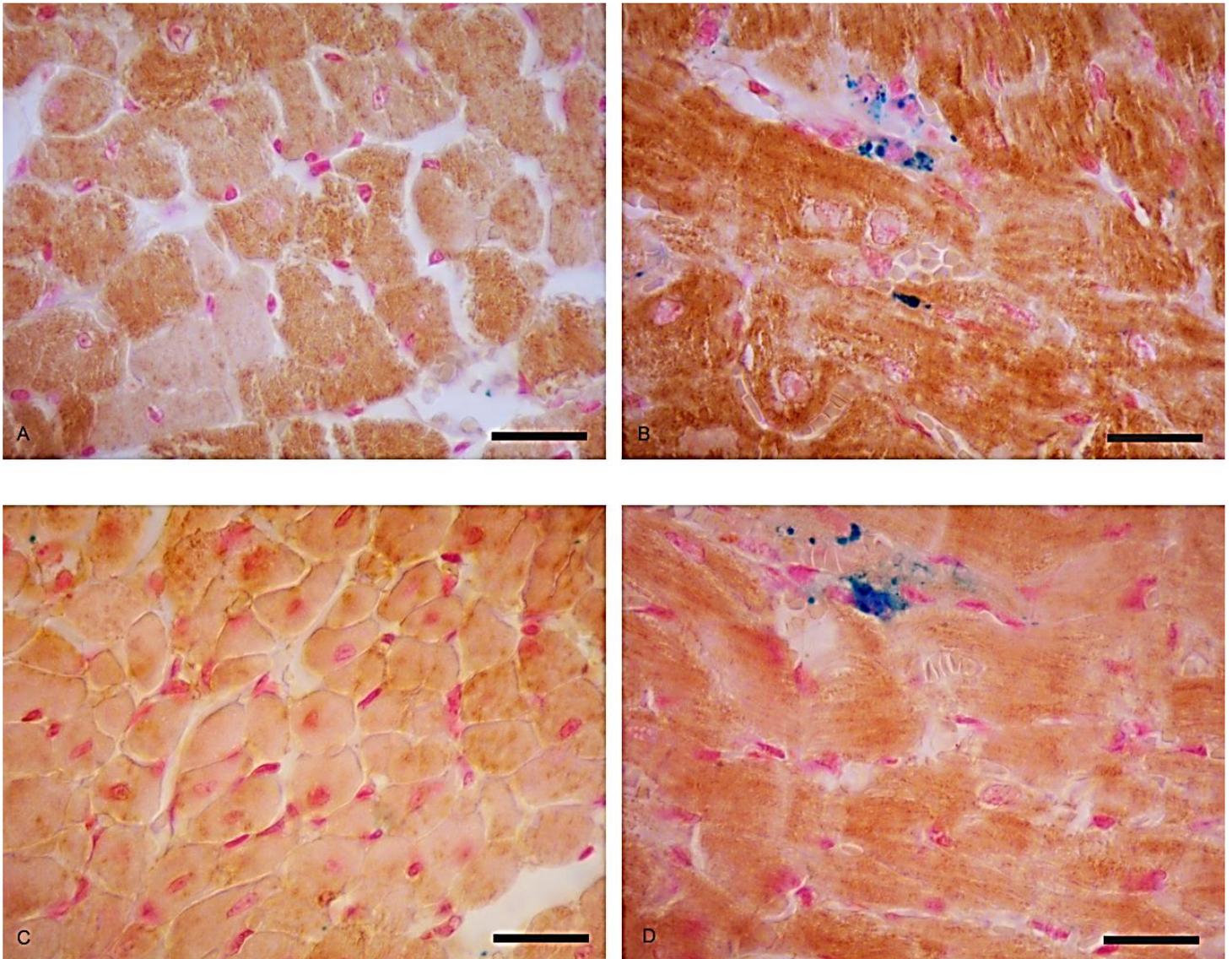


Figura 8. Inmunomarcación de prohepcidina en corazón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

2.2.5 Control negativo de inmunomarcación

El control negativo para las secciones de tejido cardíaco incubadas con PBS en lugar del anticuerpo primario no reveló marcación (Figura 9).

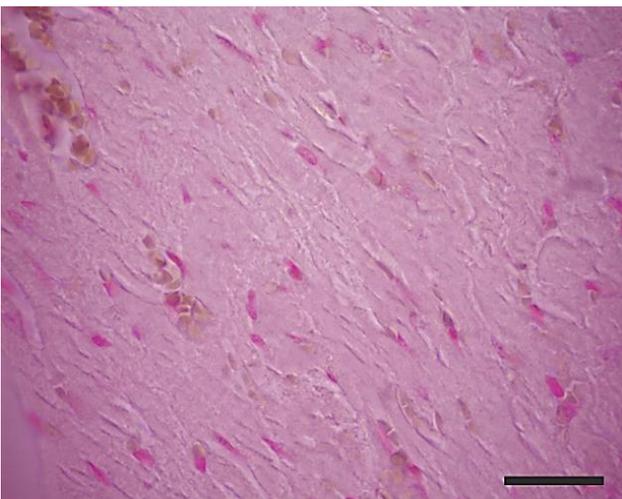


Figura 9. Control negativo cardíaco. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 µm.

3. PULMÓN

3.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA PULMONAR

En los cortes de tejido pulmonar teñidos con hematoxilina y eosina pudimos apreciar que la estructura predominante está constituida por alveolos que se observan como espacios vacíos, poligonales limitados por los neumocitos tipo 1 que poseen un epitelio plano simple.

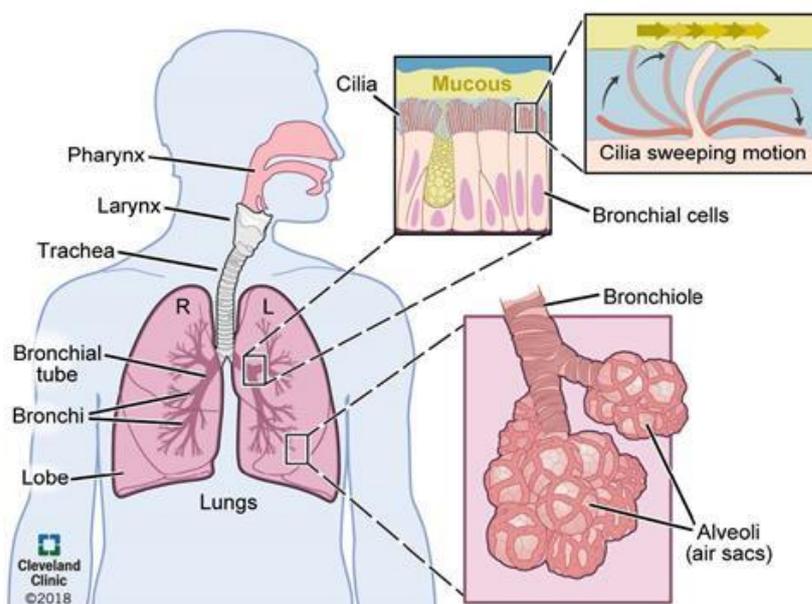
Los alveolos pueden abrirse de manera concéntrica hacia una luz común para dar origen al atrio y formar los sacos alveolares o de manera axial y formar los conductos alveolares.

Los alveolos adyacentes están separados por los septos alveolares formados por tejido conectivo con fibras elásticas que alojan capilares y macrófagos del sistema reticuloendotelial capaces de almacenar hierro.

La homogeneidad del parénquima pulmonar es interrumpida por las vías aéreas intrapulmonares, bronquiolos y bronquios. Los bronquios de mayor tamaño presentan un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, ciliado con células calciformes.

Los bronquios se ramifican y disminuyen su diámetro para dar origen a los bronquiolos que carecen de cartílago. Los bronquiolos pueden dividirse en tres tipos, los bronquiolos propiamente dichos, los terminales y los respiratorios (Esquema 2).

Los propiamente dichos tienen un epitelio que al comienzo es similar a los bronquios y luego se va volviendo cilíndrico simple y las células calciformes comienzan a escasear. Los bronquiolos terminales poseen un epitelio cúbico simple y pocas fibras musculares y los respiratorios un epitelio cúbico bajo simple y escasas fibras musculares.



Esquema 2. Estructura pulmonar. Cleveland Clinic 2018.

Resultados

No se observaron cambios significativos en la histología pulmonar entre las cuatro condiciones estudiadas con la tinción de hematoxilina y eosina. El hierro se observó de color marrón entre los alveolos pulmonares (Figura 10 B y D).

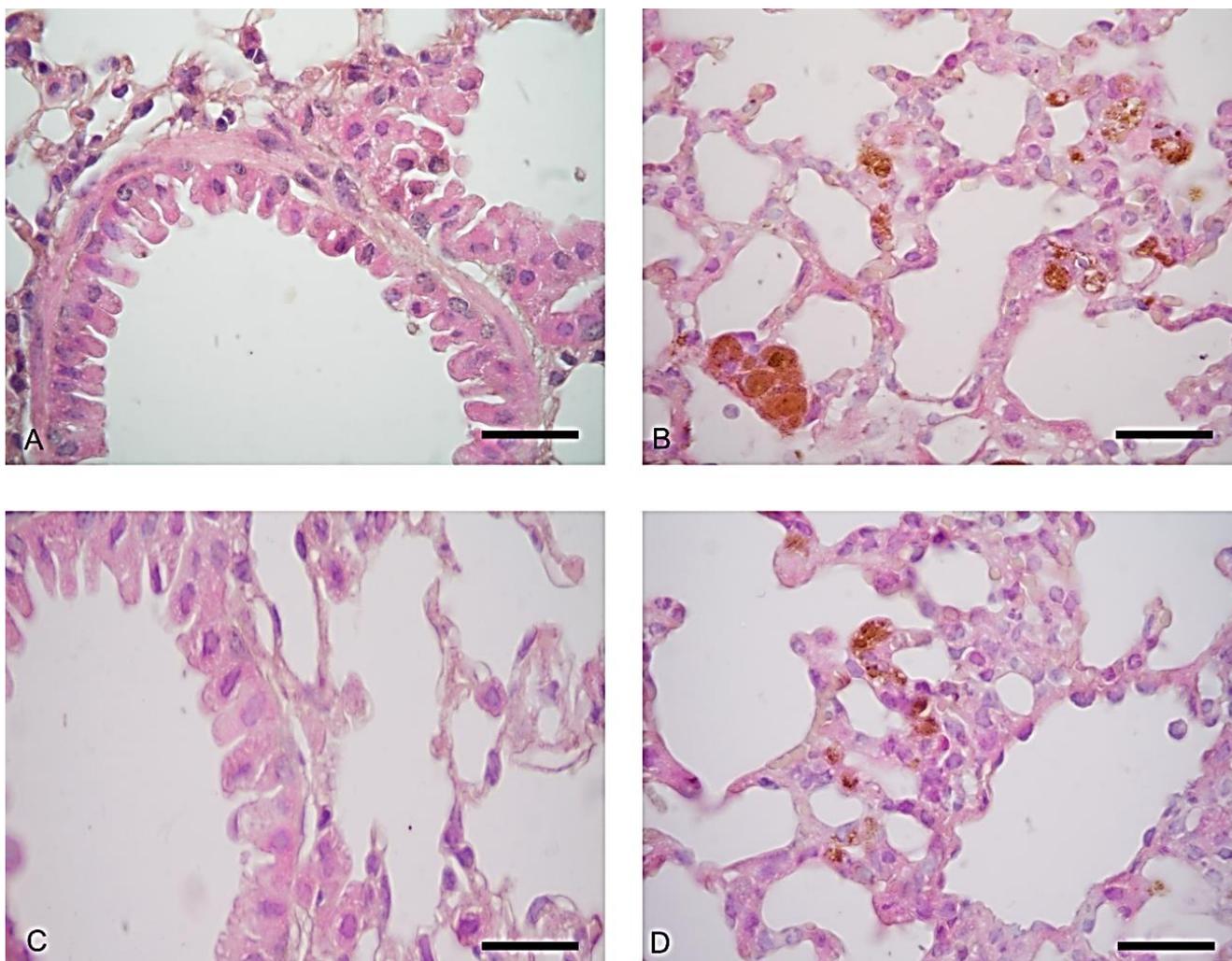


Figura 10. Histología pulmonar en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

3.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO PULMONAR

3.2.1 Cuantificación de hierro tisular

Al realizar la cuantificación de hierro tisular observamos que el nivel de hierro aumentó significativamente en el Grupo Sobrecarga de Hierro ($351,11 \pm 127,7\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) respecto al Grupo Control ($145,26 \pm 39,5\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) además, detectamos una disminución aunque no significativa en el Grupo EPO ($68,6 \pm 39,6\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) respecto al Grupo Control. El Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO ($47,6 \pm 3,4\ \mu\text{Moles de hierro/g de tejido}$) no mostró diferencias con el Grupo Control (Figura 11) indicando una disminución significativa

Resultados

respecto al Grupo Sobrecarga de Hierro demostrando el rol protector de EPO deplecionando al órgano de hierro para evitar su toxicidad.

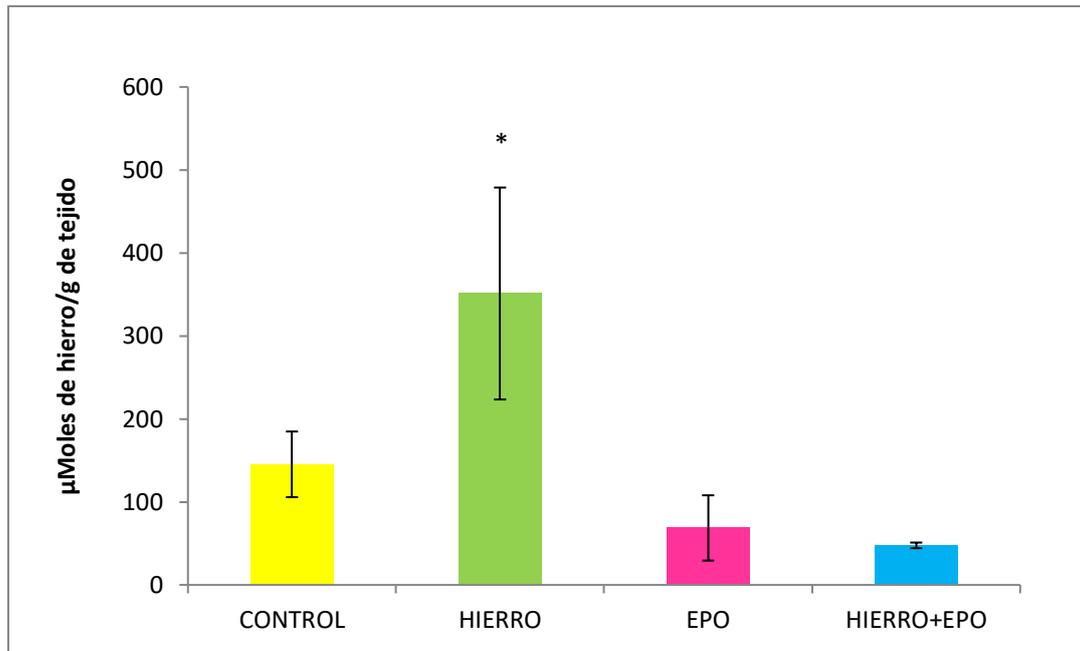


Figura 11. Cuantificación de hierro pulmonar en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.

Valores expresados en μMoles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$

3.2.2 Semicuantificación de hemosiderina

La presencia de hemosiderina en la región alveolar fue moderada en ambos grupos que contenían hierro (Figura 12 B y D) mientras que en los Grupos Control y EPO (Figura 12 A y C) se encontraba ausente.

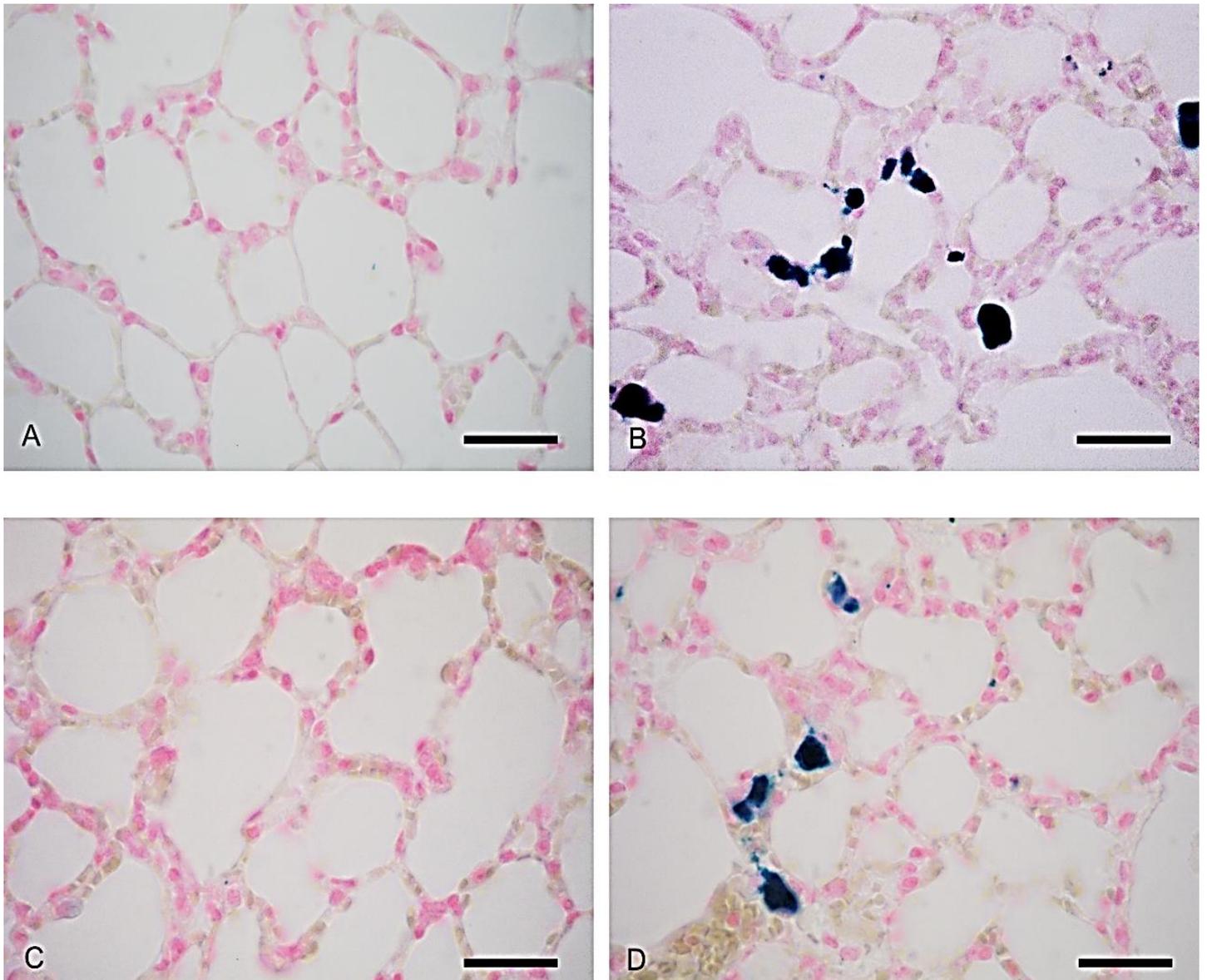


Figura 12. Observación de hemosiderina pulmonar. Grupo control (A). Grupo sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

3.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

3.3.1 Expresión del transportador de metales divalentes 1

La expresión del importador de hierro DMT1 fue citoplasmática en las células bronquiales de los Grupos Control, EPO y Sobrecarga de Hierro + EPO mientras que en el Grupo Sobrecarga de Hierro su localización cambió y se encontró en la región apical y en la membrana celular (Figura 13 D) sugiriendo su mayor rol en la captación celular de hierro en este estado mientras que en presencia de EPO disminuiría su captación.

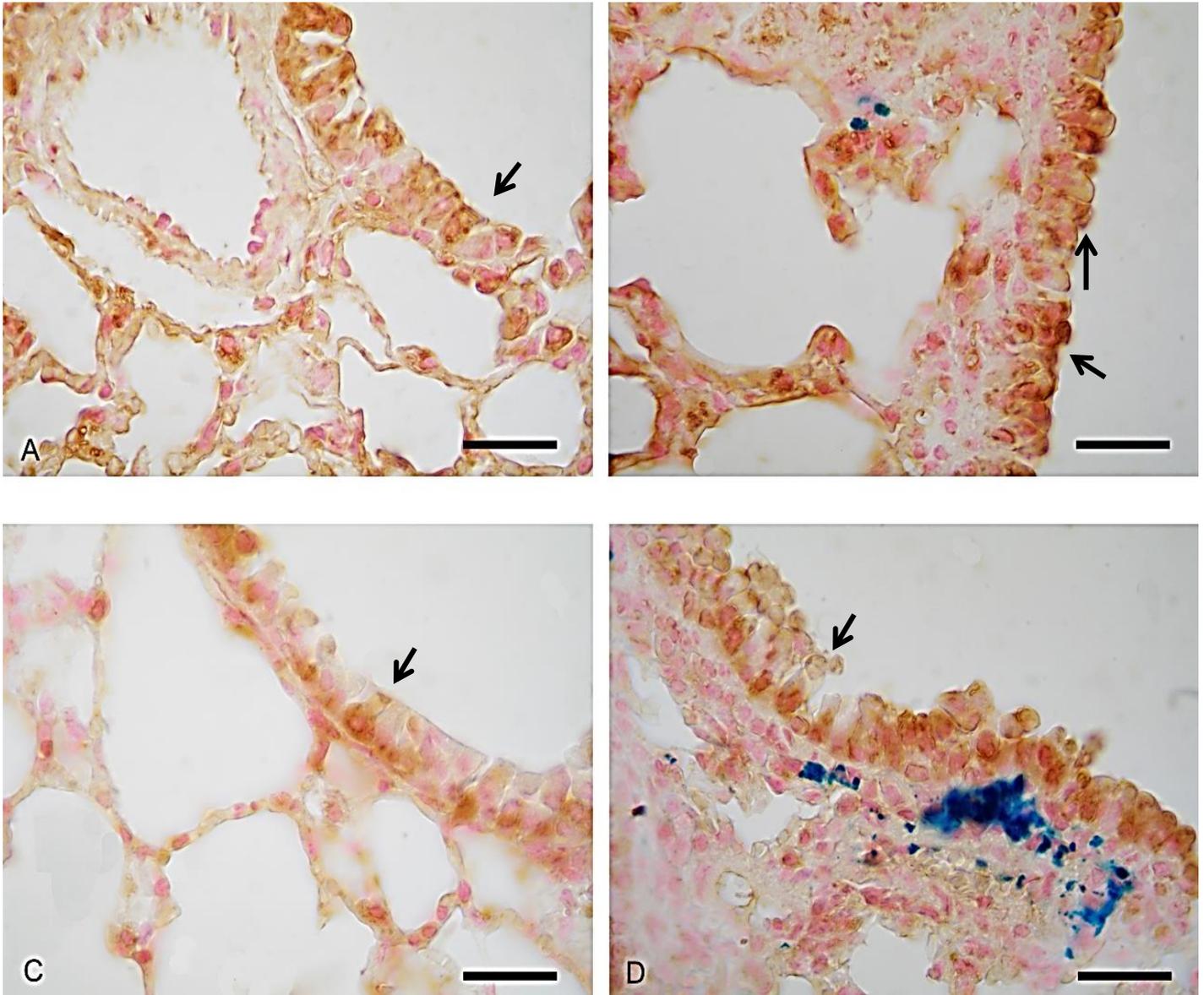


Figura 13. Inmunomarcación de DMT1 en pulmón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en *Materiales y Métodos* (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m. Las flechas marcan la localización del transportador.

3.3.2 Expresión del transportador ZIP14

El transportador ZIP14 se encontró altamente expresado en el Grupo Sobrecarga de Hierro (Figura 14 B) mientras que en los demás grupos su expresión fue moderada predominando la señal de EPO en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (Figura 14 D). Sugiriendo el mayor rol de ZIP14 en la captación de hierro pulmonar en estados de exceso.

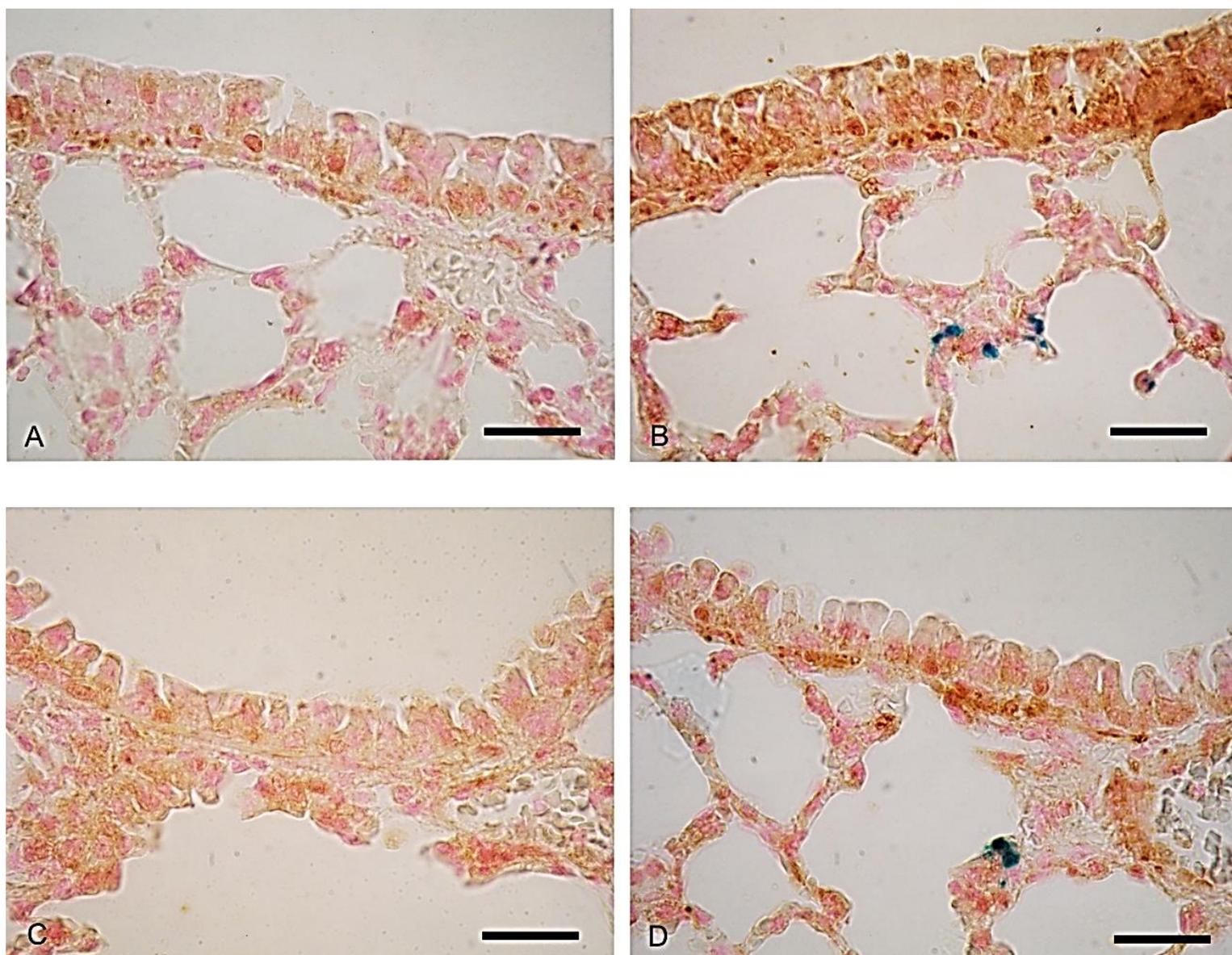


Figura 14. Inmunomarcación de ZIP14 en pulmón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perls según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa 20 μm .

3.3.3 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina

Al igual que para el transportador DMT1 la expresión de L-ferritina fue citosólica en el Grupo Control, EPO y en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (Figura 15 A, C y D) mientras que en exceso de hierro se encontró en el polo apical de las células bronquiales (Figura 15 B). Además, en ambas condiciones con hierro se observó abundante expresión de L-ferritina en alvéolos (Figura 15 B y D).

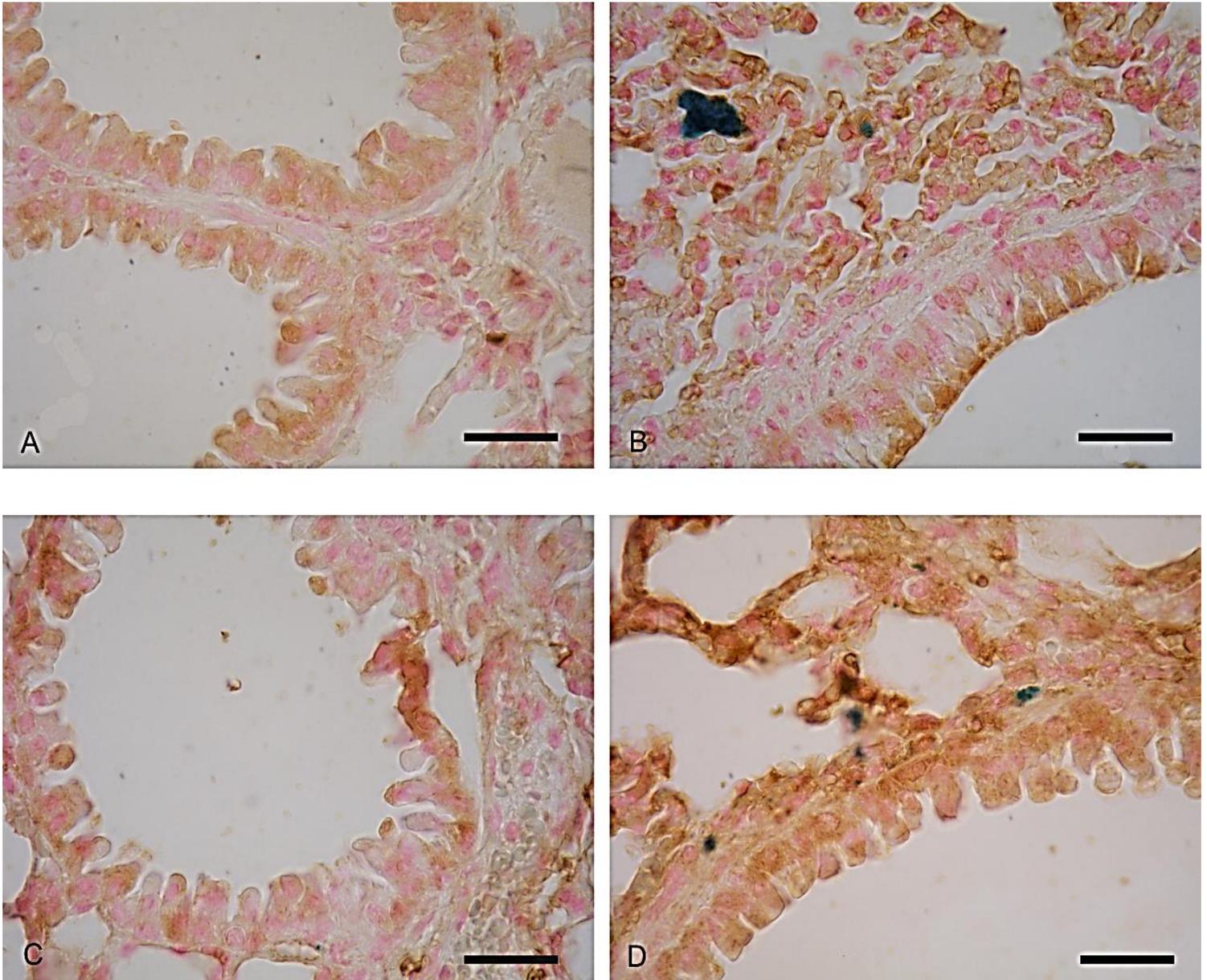


Figura 15. Inmunomarcación de L-ferritina en pulmón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

3.3.4 Expresión del propéptido de hepcidina

La expresión de prohepcidina fue similar en las células bronquiales de todas las condiciones indicando que no sería regulada por hierro ni por EPO en este tejido (Figura 16).

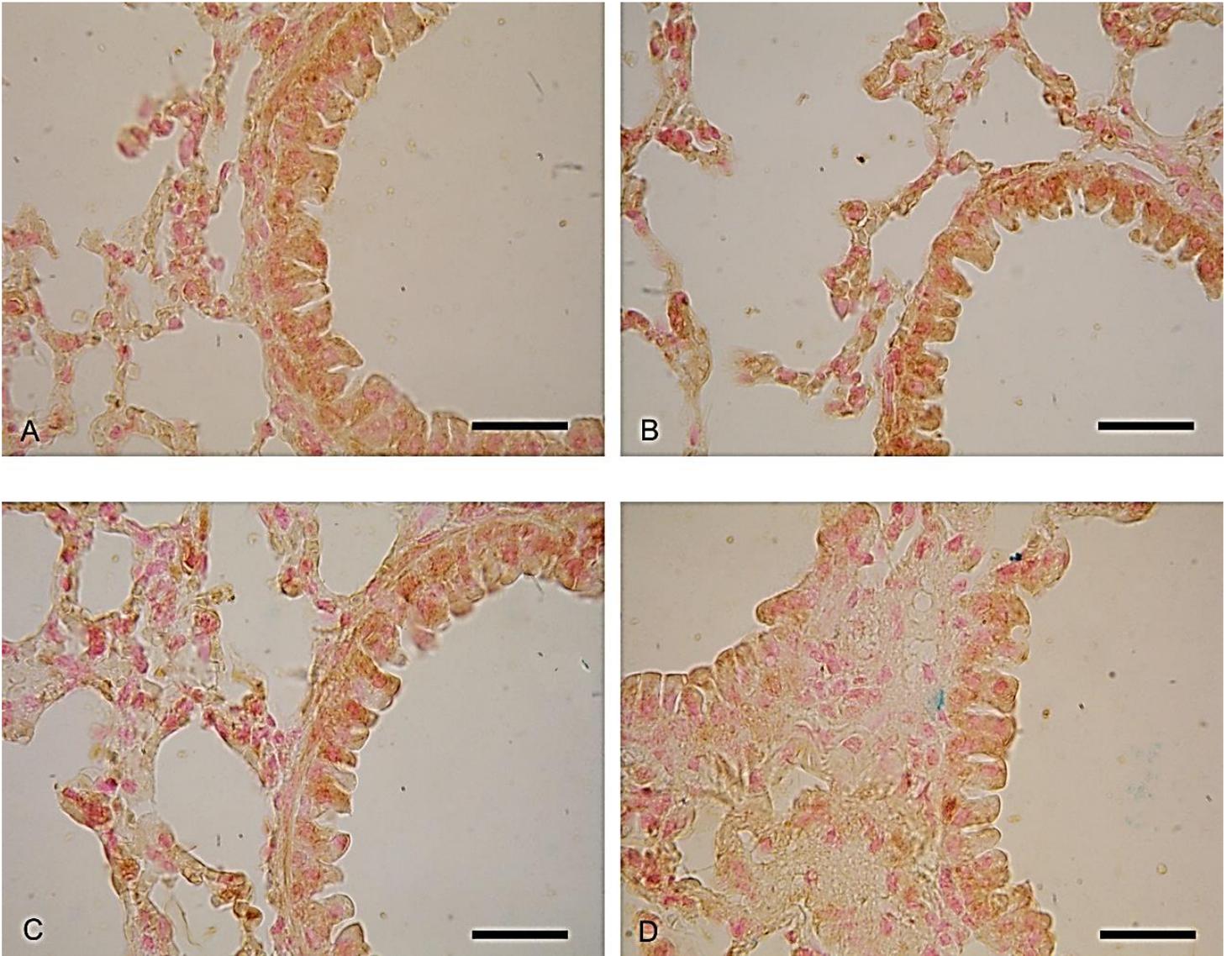


Figura 16. Inmunomarcación de prohepcidina en pulmón. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

3.3.5 Control negativo de inmunomarcación

Se incubaron secciones de tejido pulmonar con PBS en lugar del anticuerpo primario correspondiente y no se observó marcación (Figura 17).

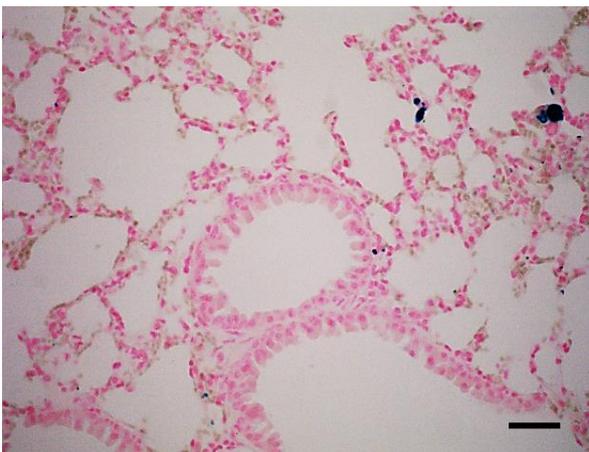


Figura 17. Control negativo pulmonar. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

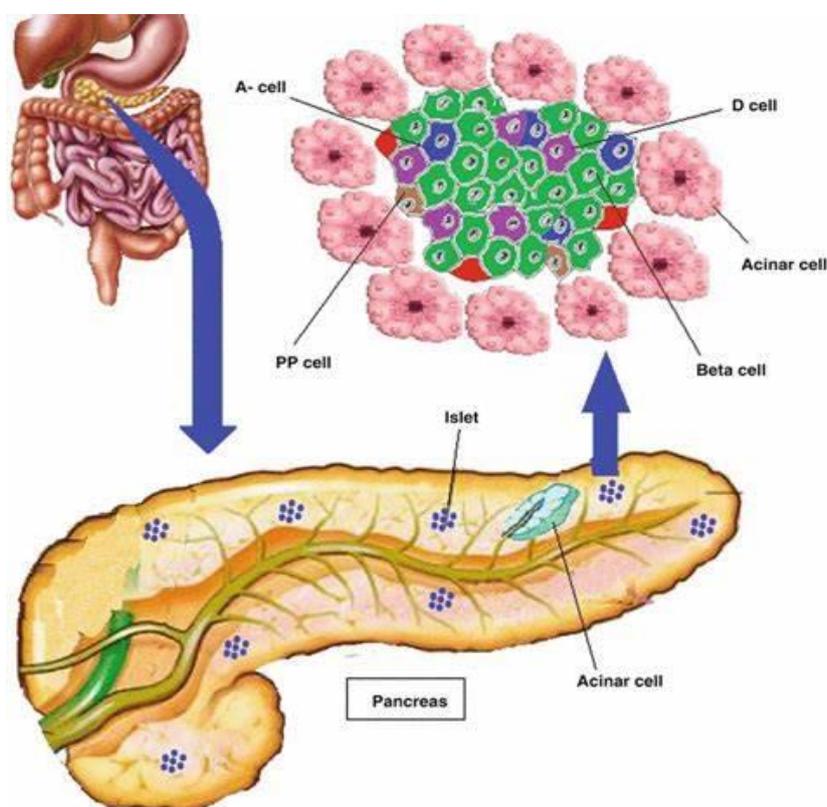
4. PÁNCREAS

4.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA HISTOLOGÍA PANCREÁTICA

En el tejido pancreático se diferencian claramente dos grandes zonas, el páncreas endócrino conformado por los islotes de Langerhans que se disponen en círculos y contienen a las células α encargadas de la síntesis de glucagón, las células β encargadas de la producción de insulina, células δ que secretan somatostatina y células F que liberan polipéptido pancreático.

Los islotes se encuentran inmersos entre los acinos que forman el páncreas exócrino y conforman la mayor proporción del páncreas. Las células acinares poseen un núcleo redondo y descargan su contenido enzimático por la zona apical hacia la luz del acino.

Entre los acinos se encuentra tejido conectivo en donde se pueden hallar macrófagos del sistema reticuloendotelial capaces de captar hierro (Esquema 3).



Esquema 3. Estructura pancreática.

En este modelo se observó la histología pancreática de los cuatro grupos de animales sobre cortes de tejidos teñidos con hematoxilina y eosina y no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 18).

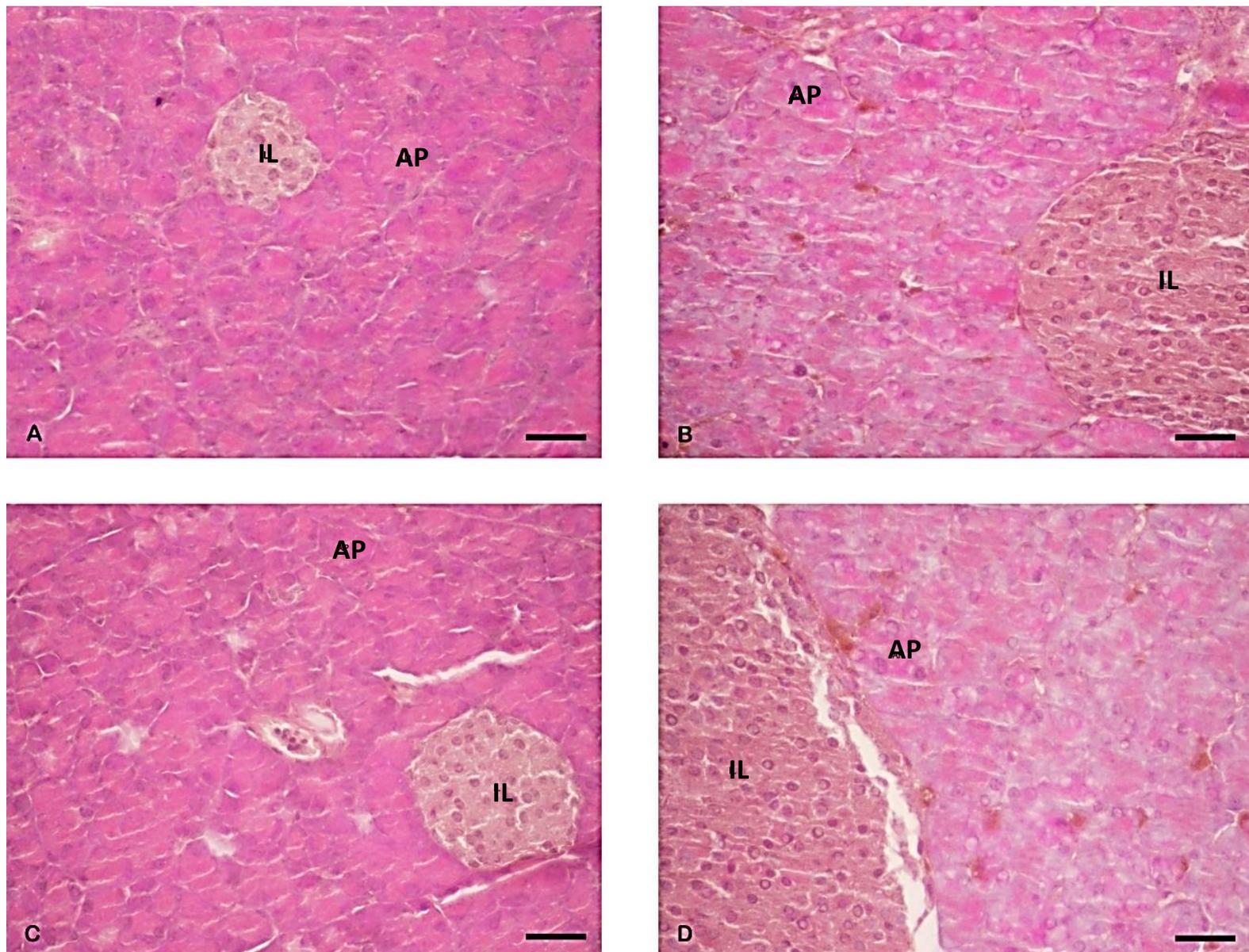


Figura 18. Histología pancreática en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción con hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$. IL: Islote de Langerhans AP: Acino pancreático.

4.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE HIERRO PANCREÁTICO

4.2.1 Cuantificación de hierro tisular

En el Grupo Sobrecarga de Hierro ($4055,3 \pm 2748,5\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) se observó un aumento significativo del nivel de hierro tisular respecto al Grupo Control ($62,2 \pm 28,4\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) y al Grupo de EPO ($33,62 \pm 14,5\ \mu\text{moles de hierro/g de tejido}$) (Figura 19).

Resultados

No se observaron diferencias significativas en el contenido de hierro tisular entre el Grupo Sobrecarga de Hierro y Sobrecarga de Hierro + EPO ($3767 \pm 1061,75$ μ moles de hierro/g de tejido) (Figura 19).

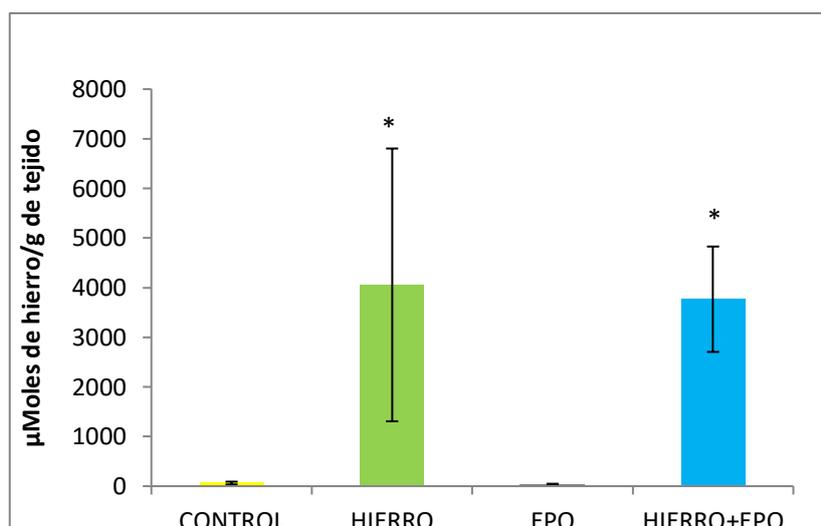


Figura 19. Cuantificación de hierro pancreático en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en μ Moles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$

4.2.2 Semicuantificación de hemosiderina

Con la tinción de Perl's pancreática se observó abundante hemosiderina en ambos grupos con hierro localizada en la zona interacinar respecto a los Grupos Control y EPO en donde no se encontró presente (Figura 20 B y D).

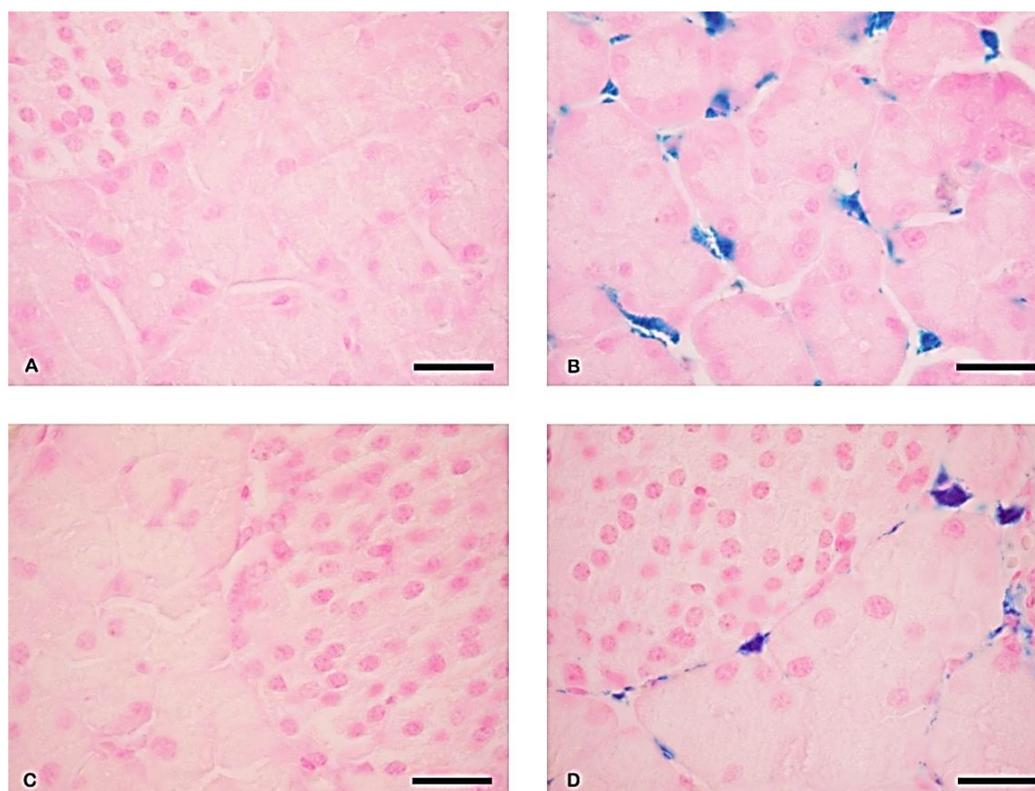


Figura 20. Observación de hemosiderina pancreática. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron para tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3$ /grupo). La barra representa $20 \mu\text{m}$. 165

4.3 INMUNOEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

4.3.1 Expresión del transportador de metales divalentes 1

Para el transportador de metales divalentes se observó una intensa marcación en los Grupos Control y EPO en los islotes de Langerhans (Figura 21 A y C) sugiriendo el rol de DMT1 en la captación de hierro en condiciones basales.

En ambos grupos con exceso de hierro la expresión de DMT1 fue más tenue (Figura 21 B y D), y esto podría asociarse a un mecanismo protector para evitar la toxicidad del hierro en el páncreas endócrino vía DMT1.

En ninguna condición se observó expresión del transportador de hierro en los acinos pancreáticos (Figura 21) demostrando que no sería el importador responsable de los depósitos de hierro en estados de sobrecarga. En el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO la señal predominante fue la de hierro (Figura 21 D).

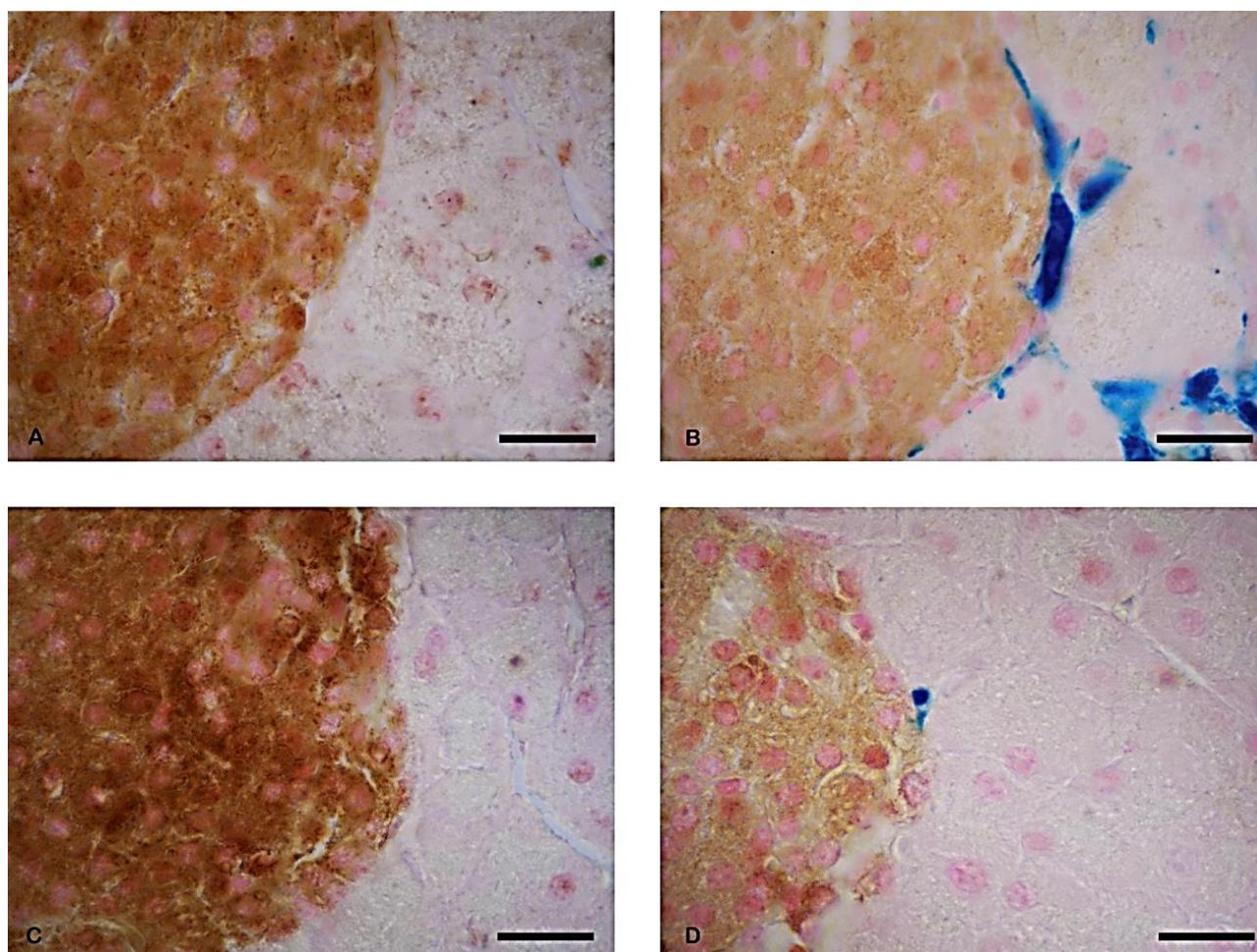


Figura 21. Inmunomarcación de DMT1 en páncreas. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-DMT1 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.2 Expresión del transportador ZIP14

La expresión del transportador ZIP14 se restringió a los acinos pancreáticos observándose una marcación tenue en el Grupo Control e intensa en el Grupo Sobrecarga de Hierro (Figura 22 B) sugiriendo que podría tratarse del transportador responsable de la instauración de los depósitos del biometal en estados de exceso.

En el Grupo EPO la expresión fue muy leve (Figura 22 C) y en el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO al contrario que con DMT1 la señal predominante fue la de eritropoyetina presentando una marcación similar a la del Grupo Control (Figura 22 D), sugiriendo un rol protector de la eritropoyetina.

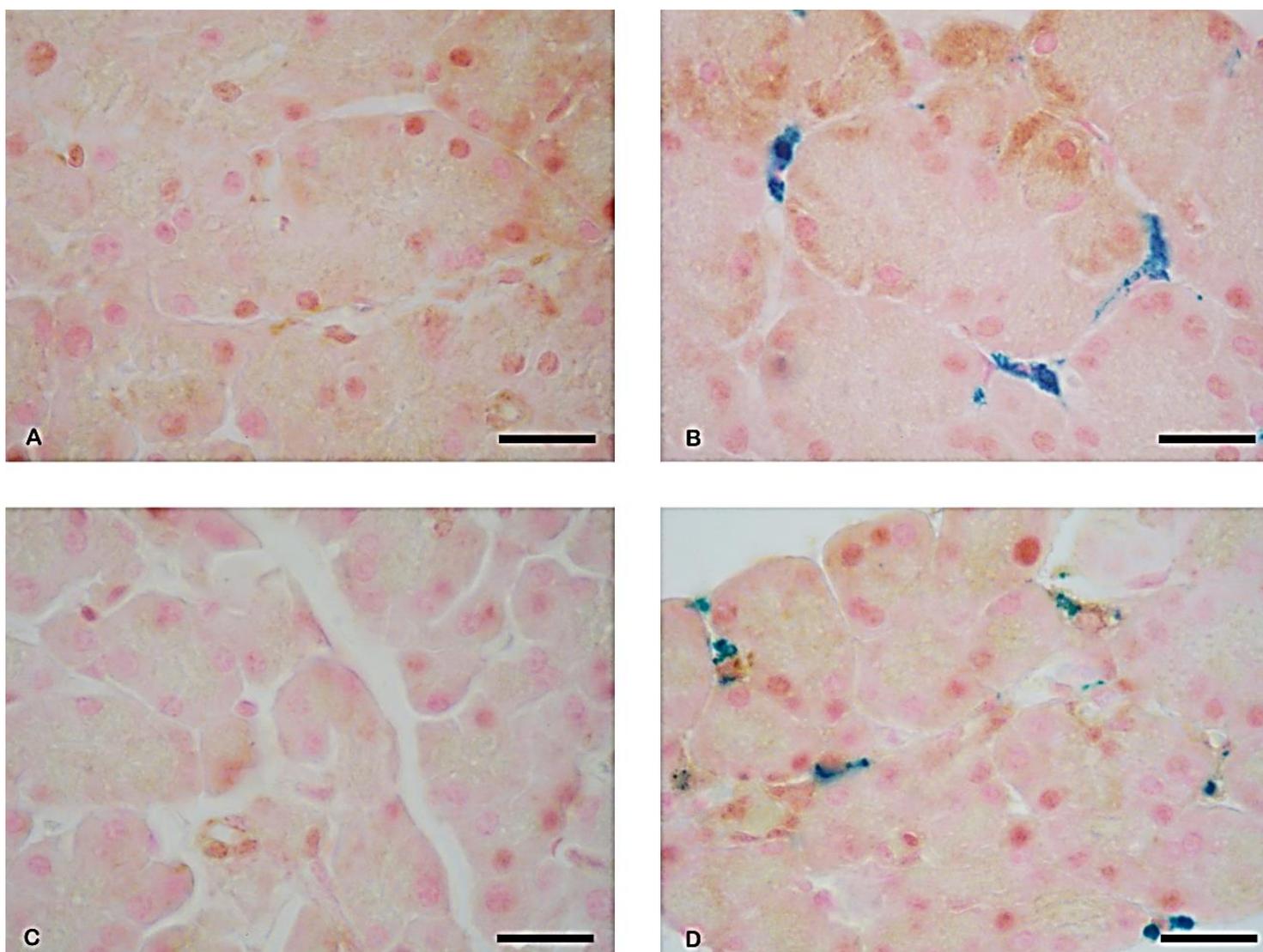


Figura 22. Inmunomarcación de ZIP14 en páncreas. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-ZIP14 seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

4.3.3 Expresión del Receptor de Transferrina 1

Evaluamos la expresión del Receptor de Transferrina en el Grupo Sobrecarga de Hierro y observamos que en presencia de hierro disminuye su expresión respecto al Grupo Control en los islotes de Langerhans (Figura 23 B) demostrando que en condiciones basales RTf1 estaría involucrado en la captación de hierro mientras que en exceso junto con DMT1 tendría un rol protector disminuyendo la captación celular de hierro.

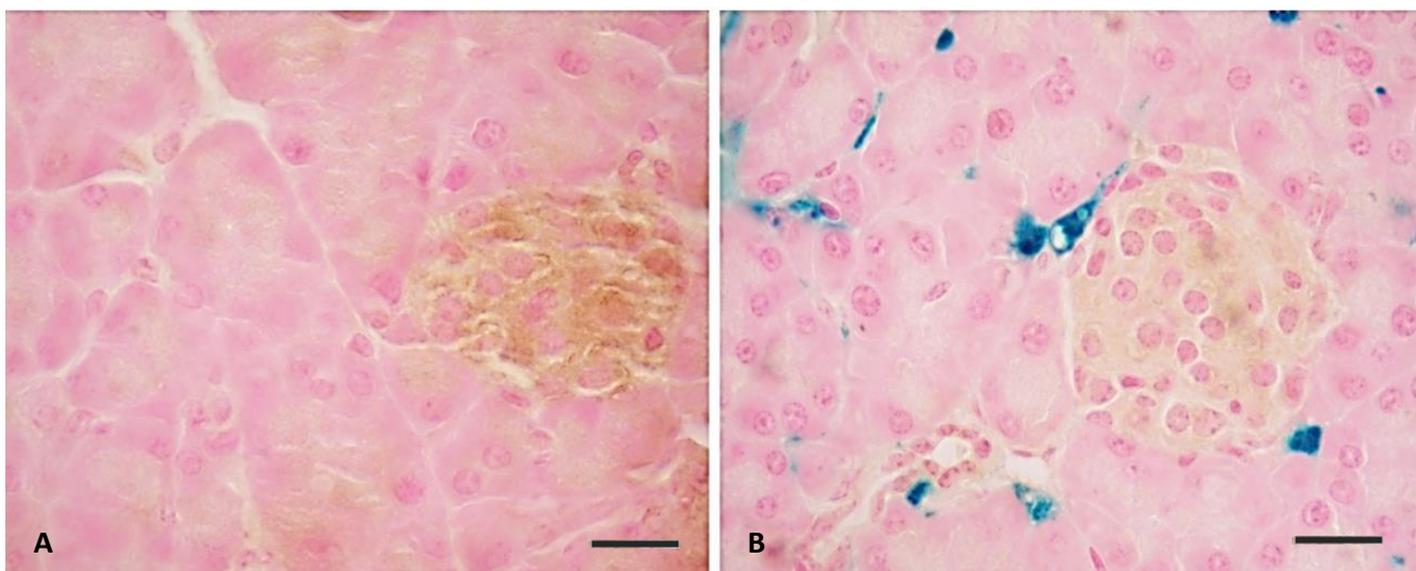


Figura 23. Inmunomarcación del Receptor de Transferrina 1 en páncreas. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-RTf1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

4.3.4 Expresión de la proteína de depósito L-ferritina

En el Grupo Control se observó abundante expresión de L-ferritina restringida a los islotes de Langerhans mientras que en presencia de exceso de hierro la expresión de la proteína de depósito fue leve en los islotes, pero abundante en la región intercarinar (Figura 24 B).

En el Grupo EPO no se observó marcación en los acinos y en los islotes fue muy tenue (Figura 24 C). El Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO siguió la señal de hierro (Figura 24 D).

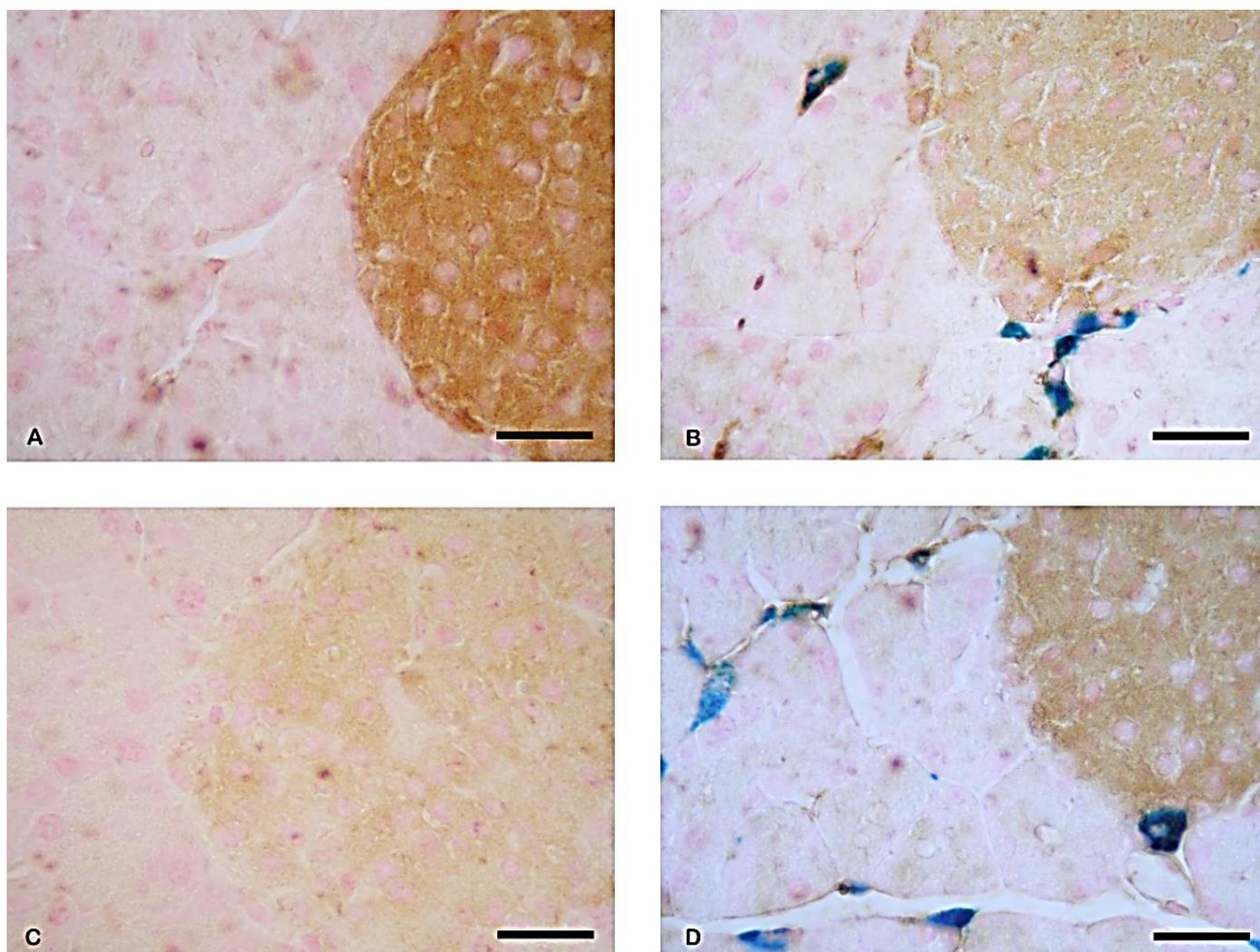


Figura 24. Inmunomarcación de L-ferritina en páncreas. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-L-ferritina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.3.5 Expresión del propéptido de hepcidina

Se observó una intensa inmunomarcación del propéptido de hepcidina en presencia de hierro respecto al Grupo Control en donde fue leve (Figura 25 B).

En presencia de eritropoyetina la marcación fue tenue (Figura 25 C). En el Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO la expresión de prohepcidina fue similar al Grupo Sobrecarga de Hierro siendo ésta la señal predominante (Figura 25 D).

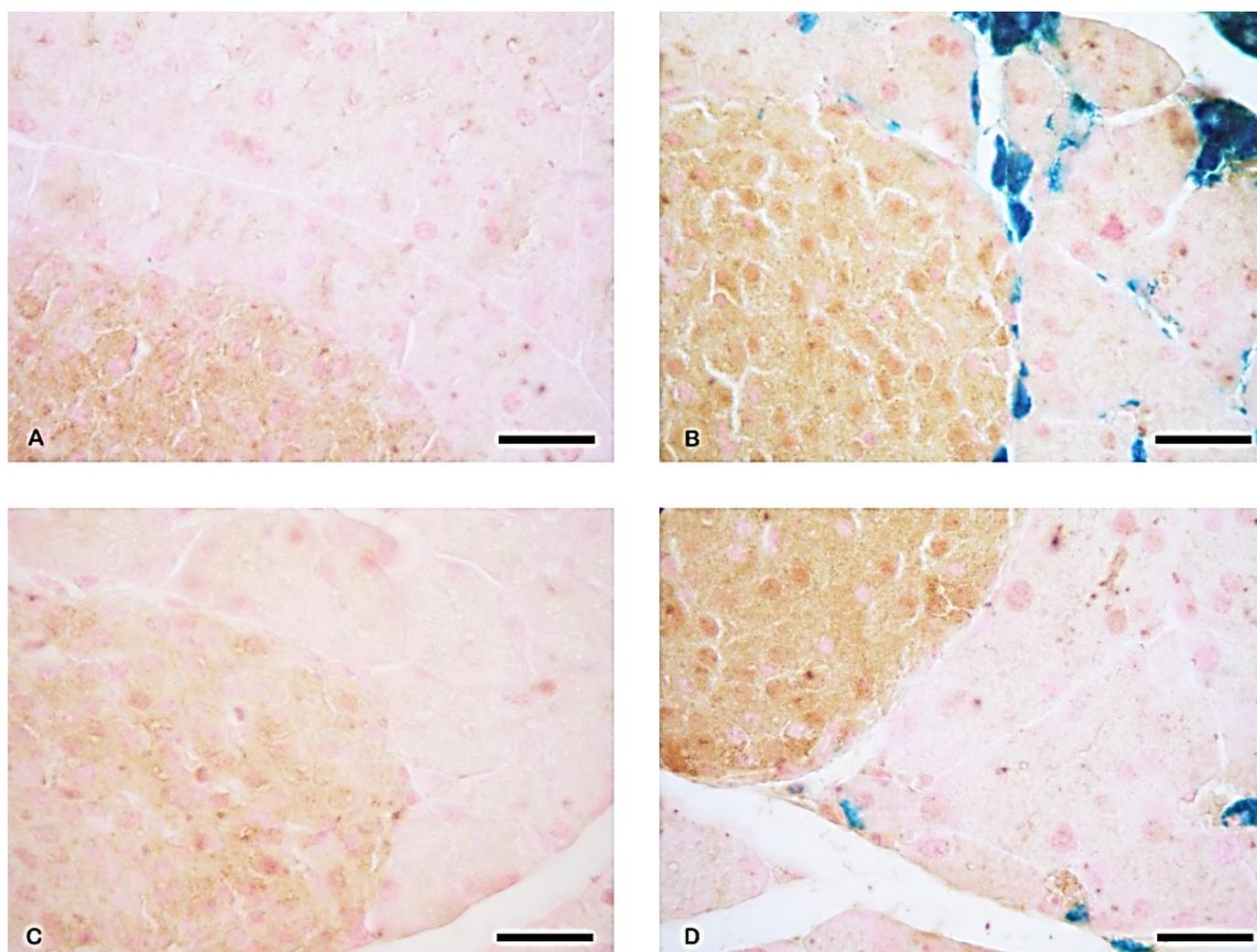


Figura 25. Inmunomarcación de prohepcidina en páncreas. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Grupo EPO (C). Grupo Sobrecarga de Hierro + EPO (D). Los tejidos se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-prohepcidina seguida de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=3/\text{grupo}$). La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

4.3.6 Control negativo de inmunomarcación

Se incubaron secciones de tejido pancreático con PBS en lugar del anticuerpo primario correspondiente y no se observó marcación (Figura 26).

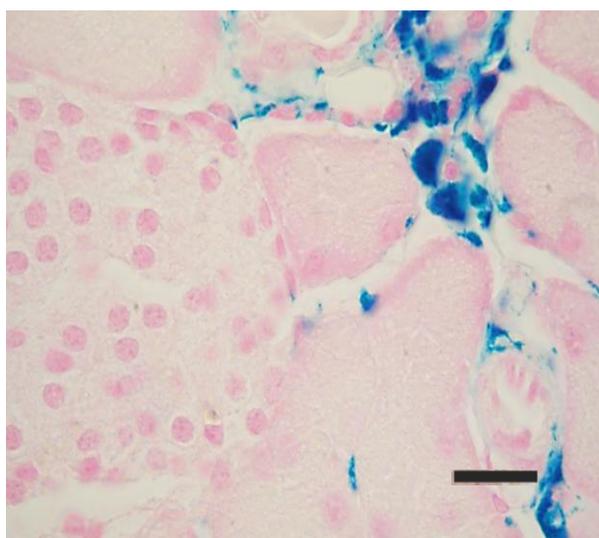


Figura 26. Control negativo pancreático. El tejido se procesó para inmunohistoquímica utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa $20\ \mu\text{m}$.

1. CORAZÓN

1.1 CONTENIDO DE HIERRO

Los estudios realizados en el músculo cardíaco destacan la coordinación regulatoria de las proteínas del ciclo de hierro en sobrecarga, mediante la activación de vías que inducen a su retención, en forma de L-ferritina y hemosiderina.

La importancia de estudiar la retención de hierro, radica en que ciertas cardiopatías se asocian al exceso de hierro (Whittaker et al. 1996)

Un aporte a destacar de nuestros estudios es el efecto de la eritropoyetina humana recombinante como un agente protector cardíaco, dado que los depósitos de hierro cardíacos se redujeron en presencia de la hormona.

En este sentido, se ha reportado la presencia del receptor de EPO en corazón asociada a la regeneración miocárdica, por estimulación con EPO (Auzmendi et al. 2020).

Los estudios que se presentan, abren un futuro prometedor para adjudicarle a esta hormona un rol en la reducción de la sobrecarga de hierro cardíaca en desordenes de hierro.

1.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

Evaluamos la captación, movilización y regulación celular del hierro en estados de exceso y en presencia de EPO para comprender si su efecto protector es mediado por las proteínas del ciclo del hierro.

Para ello estudiamos la expresión de dos importadores de hierro, DMT1 y ZIP14 y de la proteína reguladora hepcidina mediante el estudio de su propéptido prohepcidina.

1.2.1 *Importador de hierro* DMT1

De manera novedosa reportamos que el importador de metales divalentes DMT1 es regulado negativamente por hierro, dado que disminuye su expresión en estados de sobrecarga de hierro.

Este resultado implica que DMT1 no sería el importador responsable de la acumulación intracelular de hierro en estados de exceso. Postulamos que el rol de DMT1 estaría restringido principalmente a condiciones basales en donde es necesaria la captación celular de hierro para las funciones celulares vitales mientras que en estados de exceso del biometal el corazón poseería un mecanismo de defensa disminuyendo los niveles de DMT1 para disminuir la captación de hierro en

Discusión

exceso. Este mecanismo sería similar al observado en duodeno en estados de sobrecarga de hierro en donde la expresión de DMT1 disminuye y se restringe a la zona perinuclear de los enterocitos (Giorgi y Roque 2014).

Esto puede deberse a la regulación de la isoforma de DMT1-IRE que en exceso de hierro disminuye su traducción al no poder unirse al segmento IRP1, la inactivación de IRPs impide la interacción IRE-IRP favoreciendo la degradación del transcrito (Andrews 1999).

En este sentido Ke et al. (2003) observaron la presencia de 2 isoformas de DMT1 en corazones de ratas, la IRE y la no IRE con predominancia de la isoforma IRE. A diferencia de lo que observamos en macrófagos de bazo en donde la expresión de DMT1 aumenta en exceso de hierro para su mayor acumulación. El aumento de DMT1 esplénico inducido por hierro podría ser el resultado de la regulación de la isoforma no IRE de DMT1.

En este trabajo reportamos que la señal prevalente sobre la expresión de DMT1 es la de hierro sobre la de eritropoyetina indicando que ésta no llevaría a cabo su rol mediante este importador.

En este sentido, Nam et al. (2013) observaron que el nivel de DMT1 y de RTf1 aumenta en estados de deficiencia mientras que en estados de sobrecarga disminuye sin cambiar la expresión del ARNm de DMT1.

1.2.2 Importador de hierro ZIP14

No se determinaron cambios de expresión de ZIP14 en ninguna condición experimental lo que nos conduce a concluir que este transportador no es regulado por hierro ni por EPO en corazón. En concordancia con nuestros resultados estudios previos demostraron que la expresión de ZIP14 no se ve modificada en deficiencia ni en sobrecarga de hierro dietario en un modelo de rata (Nam et al. 2013).

Si bien identificamos la presencia de ZIP14 en corazón, se postula que otro importador es responsable de ocasionar la acumulación de hierro observada en Sobrecarga de Hierro en forma de L-ferritina y hemosiderina. En este sentido, Taylor et al. (2005) demostraron la presencia de ZIP14 en corazón, en ambos ventrículos y en la aurícula derecha así también como en el corazón fetal. Si bien se cree que ZIP14 podría mediar la captación de hierro NTBI en corazón (Paterek et al. 2019), estudios previos mostraron que el hierro ingresa al cardiomiocito por las vías clásicas como el RTf1, DMT1 o

ZIP14 y por otros transportadores de la familia de ZIP, como ZIP8, o por los canales de calcio tipo L y T (Paterek et al. 2018; Knutson 2018; Kumfu et al. 2011).

1.2.3 Proteína reguladora hepcidina

En el Modelo Animal observamos una significativa disminución de la expresión de prohepcidina en respuesta a EPO y el aumento en respuesta al hierro. Además, mostramos que la expresión de prohepcidina responde a EPO como señal predominante. En este sentido, Merle et al. (2007) demostraron la presencia de hepcidina en cardiomiocitos en la región de los discos intercalares.

La expresión de hepcidina cardíaca es regulada positivamente por la hipoxia y la inflamación, de manera opuesta a la regulación de hepcidina hepática, lo que sugiere que hepcidina tendría un efecto local en corazón (Paterek et al. 2019).

Sin embargo, los estudios de Littleton et al. (2016) observaron en corazón de ratones con sobrecarga de hierro, que el ARNm del gen Hamp que codifica hepcidina aumenta en exceso de hierro. El mismo resultado se observó en cardiomiocitos en cultivo incubados con FAC (Littleton et al. 2016).

La enzima Furina convertasa es una enzima requerida para clivar el propéptido de hepcidina y liberar el péptido maduro (Valore y Ganz 2008). Littleton et al. (2016) reportaron que en deficiencia de hierro aumenta su actividad elevando los niveles de hepcidina cardíaca.

Finalmente teniendo en cuenta nuestros resultados y la bibliografía, postulamos que el corazón podría poseer un mecanismo protector local, dado que cuando el nivel de hepcidina disminuye, aumenta la expresión de FPN para poder exportar el exceso de hierro cardíaco en estados de sobrecarga. Por otro lado, el aumento de la expresión de hepcidina disminuye la expresión de FPN, su receptor específico, y de esta manera la liberación de hierro sería menor conservándolo para funciones vitales en estados de deficiencia de hierro.

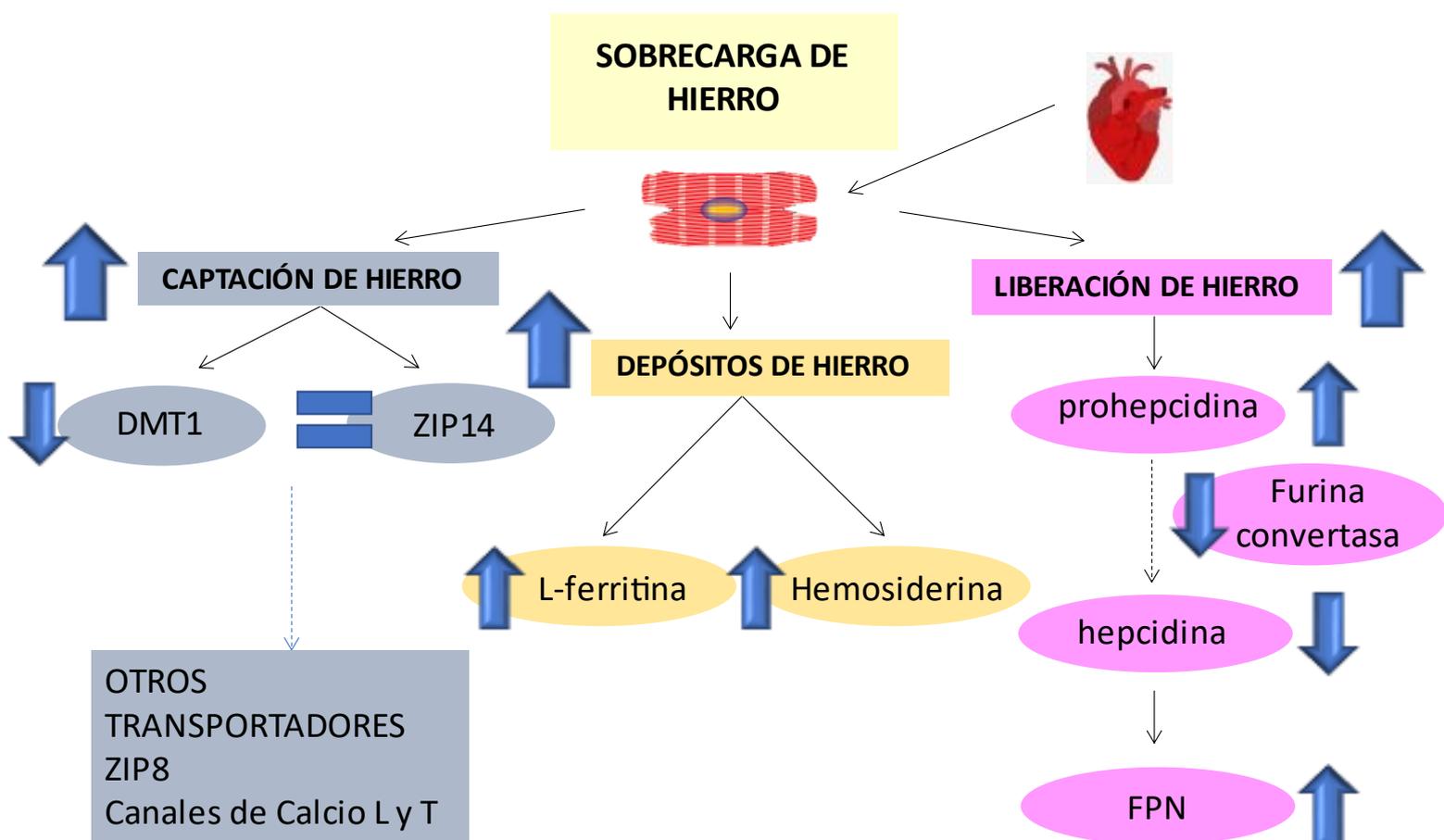
1.2.4 CONCLUSIONES

Este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre la regulación del ciclo del hierro en corazón demostrando que es un tejido capaz de sobrecargarse de hierro. Curiosamente la acumulación intracelular de hierro no sería mediada por los transportadores clásicos de hierro DMT1 ni ZIP14 (Esquema 1 A).

Discusión

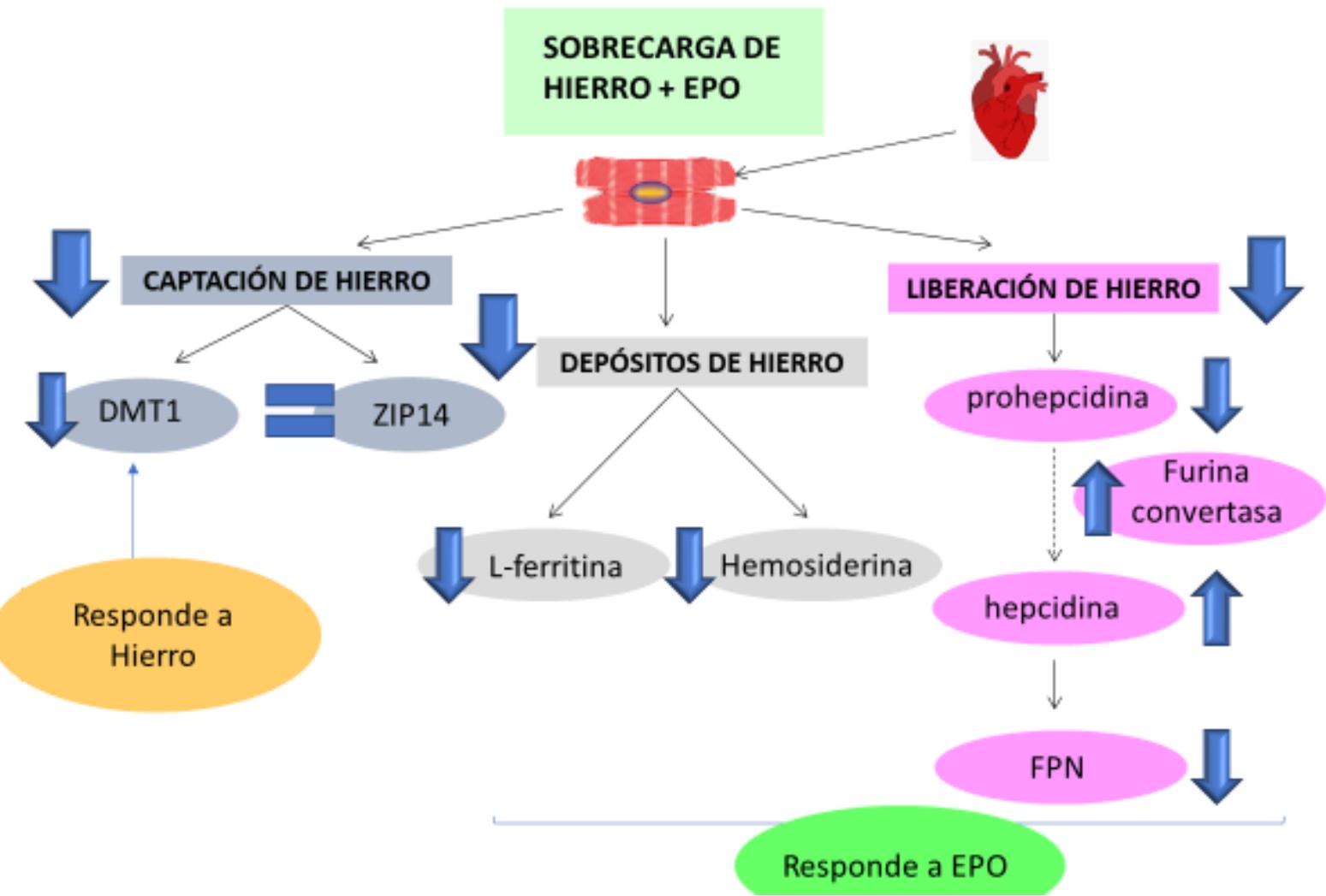
A diferencia de otros tejidos no podemos relacionar la expresión de prohepcidina con la de hepcidina cardíaca de manera directa dado que estudios de otros autores han mostrado cambios en la actividad de la enzima furina convertasa. Sugerimos que el corazón tendría un control órgano específico y no sería regulado por hepcidina sistémica.

Por otro lado, el modelo utilizado permitió demostrar que la eritropoyetina humana presenta un rol protector disminuyendo los niveles de hierro tisular (Esquema 1 B). El mecanismo regulatorio por el cual ejerce dicho efecto no sería mediado por las proteínas clave del ciclo del hierro.



A

Discusión



B

Esquema 1. Regulación del metabolismo del hierro en corazón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO. En Sobrecarga de Hierro (A) aumenta la captación celular de hierro que se refleja en mayores depósitos del biometal en forma de L-ferritina y hemosiderina, sin embargo, esa captación no sería mediada por DMT1 que disminuye su expresión, ni por ZIP14 que no se modifica respecto al Control. En líneas punteadas se muestran los transportadores propuestos ZIP8, y canales de calcio tipo L y T. En cuanto al eje hepcidina-ferroportina se mostró un aumento de la expresión de prohepcidina pero no se reflejaría en un aumento de hepcidina sino en una disminución dado que se ha reportado una regulación negativa de la enzima furina convertasa conduciendo finalmente a un aumento de FPN como mecanismo órgano específico para eliminar el exceso de hierro en el miocito. En el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO (B) se observó que la señal predominante para las proteínas importadoras de hierro y las de depósito fue la señal de hierro pudiendo explicar la menor captación de hierro por la disminución de DMT1 en su isoforma IRE como un mecanismo protector celular frente al exceso de hierro que conduce a menores depósitos del biometal en forma de L-ferritina y hemosiderina, en cuanto a la expresión de prohepcidina la señal de EPO fue preponderante, el aumento de la expresión de hepcidina podría reflejar una regulación negativa sobre DMT1.

2. PULMÓN

2.1 CONTENIDO DE HIERRO

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en un modelo animal de sobrecarga de hierro revelaron que el pulmón es capaz de sobrecargarse de hierro aumentando los depósitos de hierro en forma de L-ferritina y hemosiderina en los macrófagos alveolares (Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

En nuestro Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO demostramos que el pulmón es un tejido altamente susceptible al exceso de hierro, pero en presencia de EPO se observa un mecanismo protector que disminuye el nivel de hierro tisular. Ghio et al. (2006) demostraron que la captación de hierro en células epiteliales pulmonares expuestas a FAC es tiempo y concentración dependiente. En este sentido Ali et al. (2020) reportaron un aumento en los depósitos de hierro en ratones mutantes para RTf2 y HFE observándolo principalmente en la membrana basal del epitelio respiratorio, los vasos sanguíneos y los macrófagos tisulares relacionándolo con el aumento de fibrosis.

2.2 PROTEÍNAS CLAVE DEL CICLO DEL HIERRO

2.2.1 *Importador de hierro DMT1*

Es conocido que el aumento de hierro en estados de exceso puede atribuirse al cambio de localización de citoplasmático a apical del transportador DMT1 en células bronquiales (Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

En este sentido, Ghio et al. (2009) demostraron que en presencia de hierro aumenta la expresión de DMT1 no IRE y no la isoforma IRE en pulmón de rata.

Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio mostraron que no existían diferencias entre los niveles de DMT1 en sobrecarga de hierro y condiciones basales (Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

En este trabajo reportamos de manera novedosa un efecto protector de EPO mediado por el cambio de localización del importador DMT1. Este mecanismo implicaría una menor captación del biometal mediada por dicho transportador.

En este contexto se ha demostrado que EPO presenta un rol protector sobre las células pulmonares de conejo en estados de hiperoxia disminuyendo la peroxidación lipídica por el consumo de hierro (Bany-Mohammed et al. 1996). Cao et al. (2020) demostraron un rol protector de la eritropoyetina sobre la inflamación pulmonar aguda inducida por LPS en ratones C57BL7 vía la cascada de señalización de JAK2/STAT3.

2.2.2 *Proteína de depósito L-ferritina*

En nuestro Modelo Animal demostramos que la sobrecarga de hierro induce la movilización de ferritina hacia el citoplasma cercano a la membrana apical, que podría ser explicado por el mecanismo de liberación apical de ferritina descrito previamente en células bronquiales (Yang et al. 2005).

Este mecanismo permite que las células bronquiales expuestas a hierro exporten el hierro en forma de ferritina a través de la membrana apical para la detoxificación celular de este biometal (Yang et al. 2005).

Dado que el pulmón se encuentra en continua exposición al hierro contenido en el aire y en continuo intercambio con la atmósfera las células del sistema respiratorio se focalizan en secuestrar el metal en una forma catalítica menos reactiva. De esta manera lo detoxifican acumulándolo como ferritina (Ghio, 2009). En este sentido frente al exceso las células bronquiales captan hierro y lo

almacenan como L-ferritina en la región apical, además los macrófagos alveolares aumentan su expresión (Giorgi, D'Anna y Roque, 2015).

Además, el aumento de ferritina que observamos en macrófagos alveolares en exceso de hierro, refleja la conocida función de este tipo celular en la reserva de hierro (Graham et al. 2007).

Como parte del mecanismo protector mediado por eritropoyetina demostramos la localización homogénea de L-ferritina en el citoplasma del epitelio respiratorio demostrando una menor captación de hierro celular en estados de eritropoyesis activa.

2.2.3 Importador de hierro ZIP14

En el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro observamos un marcado aumento de la expresión de ZIP14 en el epitelio respiratorio que favorecería la movilización intracelular de hierro en concordancia con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Giorgi, D'Anna y Roque, 2015). Este importador podría ser otro importador de hierro en estados de exceso junto con DMT1. En este sentido, se demostró que ZIP14 podría importar el hierro proporcionado a las células como citrato férrico, una forma de hierro no unido a transferrina (NTBI) que aumenta en situaciones fisiopatológicas de sobrecarga de hierro (Liuzzi et al. 2006).

La función intracelular de ZIP14 en exceso de hierro fue previamente sugerida en células acinares pancreáticas en ratas con sobrecarga de hierro (Nam et al. 2013).

Finalmente concluimos que el importador ZIP14 responde a la señal de eritropoyetina disminuyendo su expresión como un rol protector para limitar la captación celular de hierro de manera similar a lo que ocurre en estados de deficiencia de hierro.

Si bien se desconoce el mecanismo regulatorio de ZIP14 se ha descrito que el hierro aumentaría los niveles de ZIP14 mediante una regulación post-transcripcional en hígado y páncreas de ratas con sobrecarga de hierro (Nam et al. 2013). Sin embargo, al no poseer segmentos IRE en su ARNm es poco probable que sea regulado por la regulación IRE-IRP.

2.2.4 Proteína regulatoria hepcidina

Al estudiar la expresión del propéptido de la proteína regulatoria hepcidina observamos que la misma no responde a hierro ni a EPO. Resultados similares en estados de exceso de hierro soportan nuestra observación (Giorgi, D'Anna y Roque, 2015).

Discusión

Postulamos que hepcidina pulmonar podría no participar en la regulación de la movilización del exceso de hierro en pulmón.

En coincidencia con esta hipótesis, estudios realizados en células bronquiales describieron que hepcidina pulmonar no tendría un efecto directo sobre la regulación de la homeostasis del hierro en este tejido, sino que su función pulmonar podría estar asociada a su actividad antimicrobiana actuando como mecanismo de defensa frente a infecciones (Frazier et al. 2011).

Sin embargo, Yang et al. (2002) demostraron en ratones tratados con FAC un aumento de la expresión de FPN en células epiteliales respiratorias y en macrófagos alveolares resaltando su rol en la detoxificación de hierro tisular.

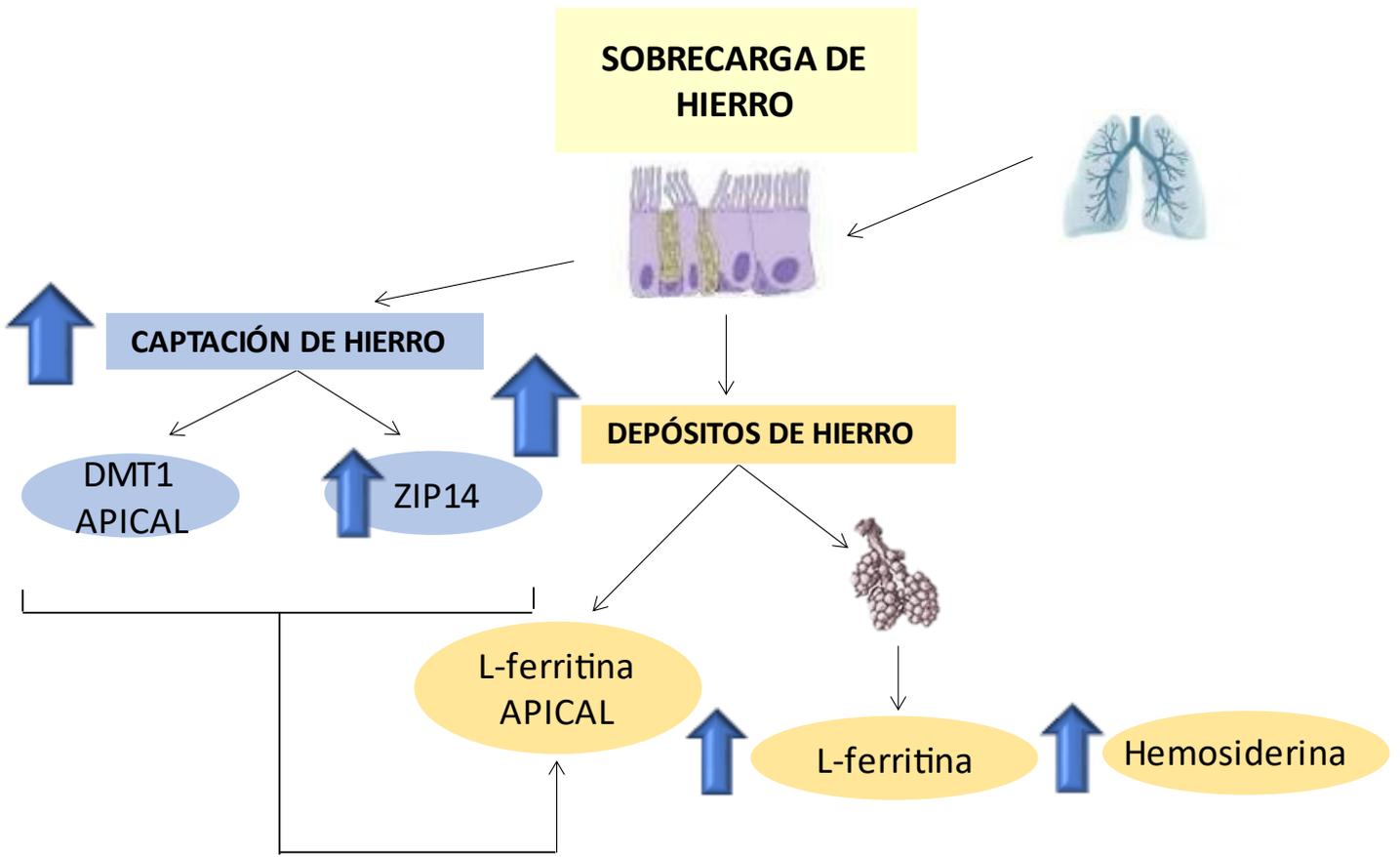
Este aumento de FPN en células bronquiales en sobrecarga de hierro, podría ser el resultado de la regulación post-transcripcional mediada por IRPs y no regulada por hepcidina. En este sentido, Neves et al. (2017) reportaron en un modelo animal de hemocromatosis en ratones con una mutación en el gen de FPN, un aumento de hierro en los macrófagos alveolares y en las células epiteliales que se asoció con estrés oxidativo, disminución de la capacidad pulmonar y la saturación de oxígeno. Así mismo observaron también aumento en los niveles del exportador ferroportina y una disminución de la expresión de los importadores DMT1 y TRf1.

Finalmente concluimos que el eje hepcidina-ferroportina no sería regulado ni por hierro ni por EPO en pulmón. De esta forma el mecanismo protector de EPO no sería mediado por dicho eje.

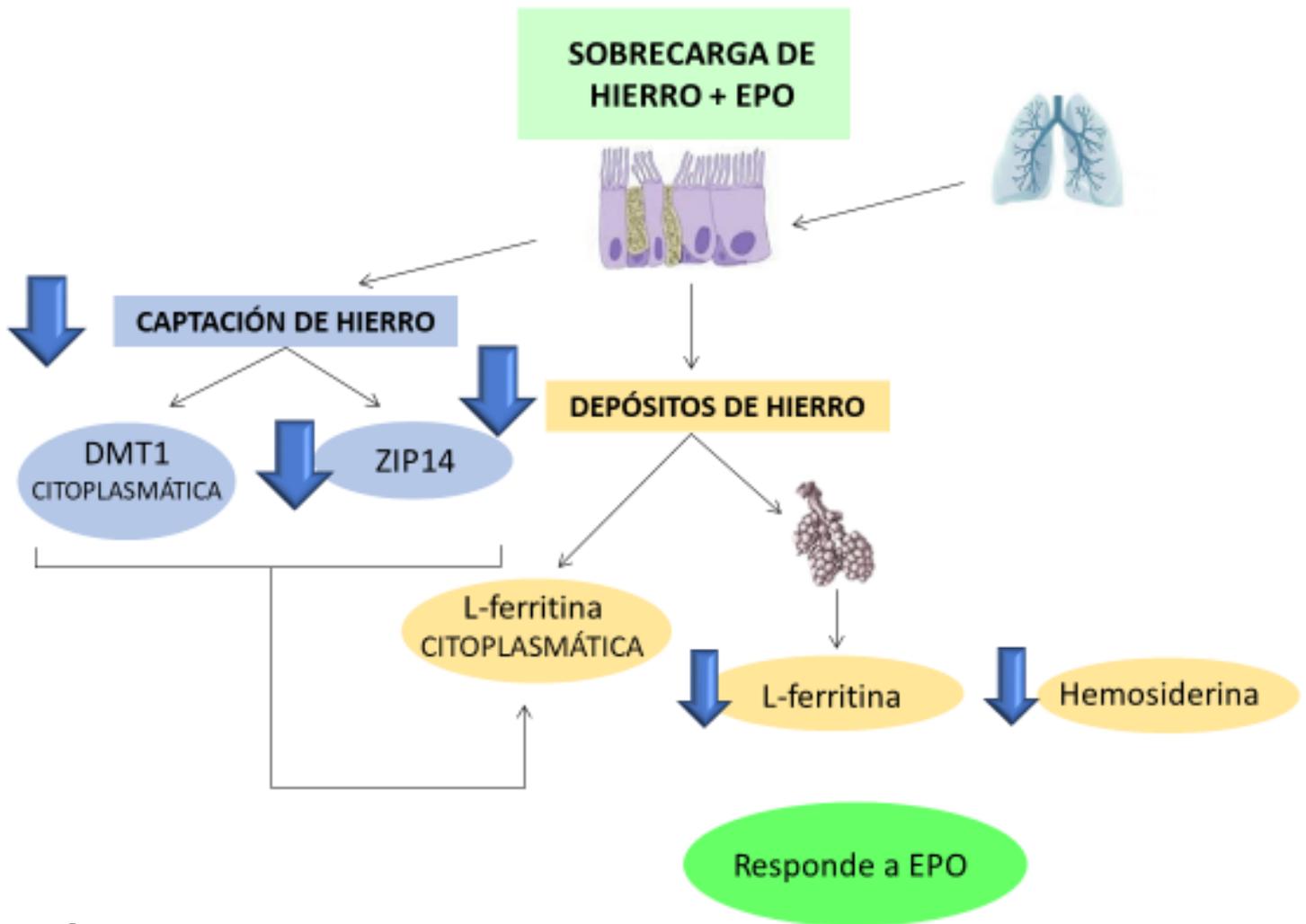
2.2.5 CONCLUSIONES

El presente estudio se focalizó en evaluar el efecto de eritropoyetina sobre la expresión de las proteínas clave del ciclo del hierro para ejercer su rol protector en pulmón.

Demostramos por primera vez que EPO disminuye la captación de hierro pulmonar mediado tanto por el importador DMT1 como por ZIP14 (Esquema 2 B). Además, mostramos que la menor captación celular de hierro se refleja en la distribución de L-ferritina.



A



B

Esquema 2. Regulación del metabolismo del hierro en pulmón. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro y EPO. En Sobrecarga de Hierro (A) aumenta la captación celular de hierro que se refleja en el cambio de localización de L-ferritina en células epiteliales y en mayores depósitos del biometal en forma de L-ferritina y hemosiderina en células alveolares, esa captación sería mediada por el cambio de localización de DMT1 y por ZIP14 que aumenta su expresión. En cuanto al eje hepcidina-ferroportina no se observaron cambios en la expresión de prohepcidina.. En el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO (B) se observó que la señal predominante para las proteínas importadoras de hierro y las de depósito fue la señal de eritropoyetina.

3. PÁNCREAS

El objetivo de este estudio fue avanzar en el conocimiento de los mecanismos regulatorios del ciclo del hierro en páncreas que podrían prevenir o no enfermedades relacionadas con el exceso de este biometal. Además, evaluar el efecto de la eritropoyetina en tejido pancreático en estados de sobrecarga de hierro.

3.1 CONTENIDO DE HIERRO

En este trabajo mostramos que el páncreas es altamente susceptible a los desórdenes ocasionados por hierro y es capaz de almacenar hierro en estados de exceso en la región interacinar. En este sentido, anormalidades morfológicas y funcionales se han reportado en condiciones asociadas al exceso de hierro (Iancu et al. 1990).

En este contexto trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que el hierro se acumula en la zona interacinar pancreática en forma de hemosiderina y L-ferritina en un modelo animal de sobrecarga de hierro (Giorgi y Roque 2014). La prevalente acumulación de hierro en los macrófagos del tejido intersticial puede atribuirse a la gran cantidad de capilares fenestrados que rodean a los acinos pancreáticos (Iancu et al. 1990). En este contexto en la bibliografía se reporta que en estados de sobrecarga de hierro el mismo se acumula en las células acinares y en los islotes de Langerhans conduciendo a la destrucción de las células β y a diabetes mellitus (Whittaker et al. 1996).

En contraposición con nuestros resultados Lu et al. (1991) describieron un leve aumento de ferritina y de hemosiderina en el islote pancreático en ratas con sobrecarga de hierro inducida por Fe^{3+} NTA. La discrepancia con nuestro estudio puede ser debida a las distintas formas de hierro utilizadas para inducir la sobrecarga. Esta hipótesis sobre la diferente distribución pancreática del hierro según el tipo de hierro empleado, es avalada por Awai et al. (1979) quienes identificaron la presencia de hemosiderina en las células del islote de Langerhans en ratas sobrecargadas con Fe^{3+} NTA, pero no cuando se utilizó una forma de hierro coloidal, como la que nosotros empleamos.

En presencia de eritropoyetina los depósitos acinares del biometal disminuyeron para ser utilizados en la eritropoyesis mientras que aumentaron los depósitos en forma de L-ferritina en los islotes de Langerhans, en el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO observamos como señal preponderante a la señal de EPO en islotes pancreáticos y a la señal de hierro en acinos aumentando los depósitos del biometal en ambas regiones.

3.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

3.2.1 *Importador de hierro DMT1*

Dado que DMT1 no se detectó en los acinos pancreáticos no sería el transportador involucrado en la captación de hierro acinar por lo tanto estudiamos la expresión del importador de hierro ZIP14. En contraposición con nuestros resultados se ha reportado el aumento del ARNm de DMT1 en ratones knockout para hepcidina (Lunova et al. 2017).

De acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio, en estados de sobrecarga, en los islotes disminuye la expresión del transportador DMT1 (Giorgi y Roque, 2014).

Un mecanismo independiente de IRPs regularía la disminución de DMT1 en el páncreas dado que sino su expresión debería aumentar por la disminución de hierro intracelular, un posible mecanismo sería mediante la regulación negativa mediada por el aumento de hepcidina.

3.2.2 *Importador de hierro ZIP14*

En este trabajo mostramos que los acinos aumentarían la captación celular de hierro mediante el importador ZIP14.

Postulamos que el páncreas exócrino es capaz de acumular hierro como un mecanismo protector para proteger al páncreas endócrino en estados de sobrecarga del biometal.

En este sentido, Jenkitkasemwong et al. (2015) han sugerido que el transportador ZIP14 mediaría la captación del hierro en exceso en las células acinares demostrando que la inhibición de ZIP14 podría mitigar la sobrecarga de hierro pancreática.

En este sentido, otros autores también detectaron la presencia de ZIP14 y su aumento frente al hierro en células acinares de páncreas de rata con exceso en hierro (Nam et al. 2013, Lunova et al. 2017)

De manera novedosa mostramos el mecanismo protector de eritropoyetina en páncreas exócrino disminuyendo la captación de hierro al ser la señal preponderante para la expresión de ZIP14 en nuestro Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. En este sentido varios autores han propuesto a la eritropoyetina como una posible citoquina citoprotectora frente a diabetes o pancreatitis (Ucan et al. 2009; Choi et al. 2010; Chen et al. 2015).

Fenjves et al. (2003) demostraron la expresión del receptor de EPO en islotes pancreáticos. Esto sugiere que EPO protegería a los islotes pancreáticos de daños citotóxicos.

Discusión

En este trabajo mostramos que el mecanismo protector de EPO sobre los islotes pancreáticos no sería mediado por las proteínas del ciclo del hierro dado que la señal predominante en islotes es la de hierro tanto para la expresión de DMT1 como para la de prohepcidina.

3.2.3 Importador de hierro RTf1

En el presente trabajo reportamos por primera vez la disminución de la expresión del transportador RTf1 en islotes pancreáticos en estado de sobrecarga de hierro.

En concordancia, con estudios previos de Lu et al. (1989-1991) que, reportaron que la expresión de RTf disminuyó en sobrecarga de hierro en ratas inyectadas con Fe³⁺-NTA.

La disminución de la expresión de los transportadores Rtf1 y DMT1 reflejaría la menor expresión de L-ferritina en islotes pancreáticos frente al hierro.

Un mecanismo que regularía la disminución de ferritina en las células endocrinas, podría estar mediado por la activación de las proteínas IRPs inducida por bajos niveles de hierro en el islote. En la bibliografía se ha descrito que IRPs activas se unen al segmento IRE en el ARNm de ferritina y bloquean su traducción (Wallander et al., 2006).

Nam et al. (2013) demostraron que en sobrecarga de hierro en ratas los transportadores DMT1 no IRE y RTf1 disminuyen su expresión mientras que ZIP14 aumenta.

3.2.4 Proteína reguladora hepcidina

Nuestros estudios identificaron que prohepcidina se localiza en las células del islote de Langerhans y evidenciaron su participación en la regulación de la movilización del hierro pancreático. Estudios previos de Kulaksiz et al. (2008) describieron la localización de hepcidina en las células β del Islote de Langerhans en ratas en condiciones basales.

También mostramos que el hierro es la señal predominante para la síntesis de hepcidina en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO.

En este sentido, Giorgi y Roque (2014) reportaron una disminución del hierro en células de los islotes en estados de exceso, sugiriendo que el aumento de hepcidina en el páncreas endocrino no sería regulado por el hierro intracelular.

Podríamos concluir que hepcidina pancreática podría actuar localmente en la regulación del hierro en exceso, así como en forma sistémica o endocrina.

Discusión

En este sentido, en estudios previos se ha sugerido que la síntesis basal de hepcidina en el páncreas podría contribuir con los niveles circulantes de la hormona (Kulaksiz et al. 2008).

La relación inversa observada entre prohepcidina y DMT1 en exceso de hierro sugiere que hepcidina actuaría en coordinación con DMT1 en el islote de Langerhans. Esta coordinación regulatoria podría proteger a las células endocrinas del daño oxidativo al limitar la captación de hierro por DMT1.

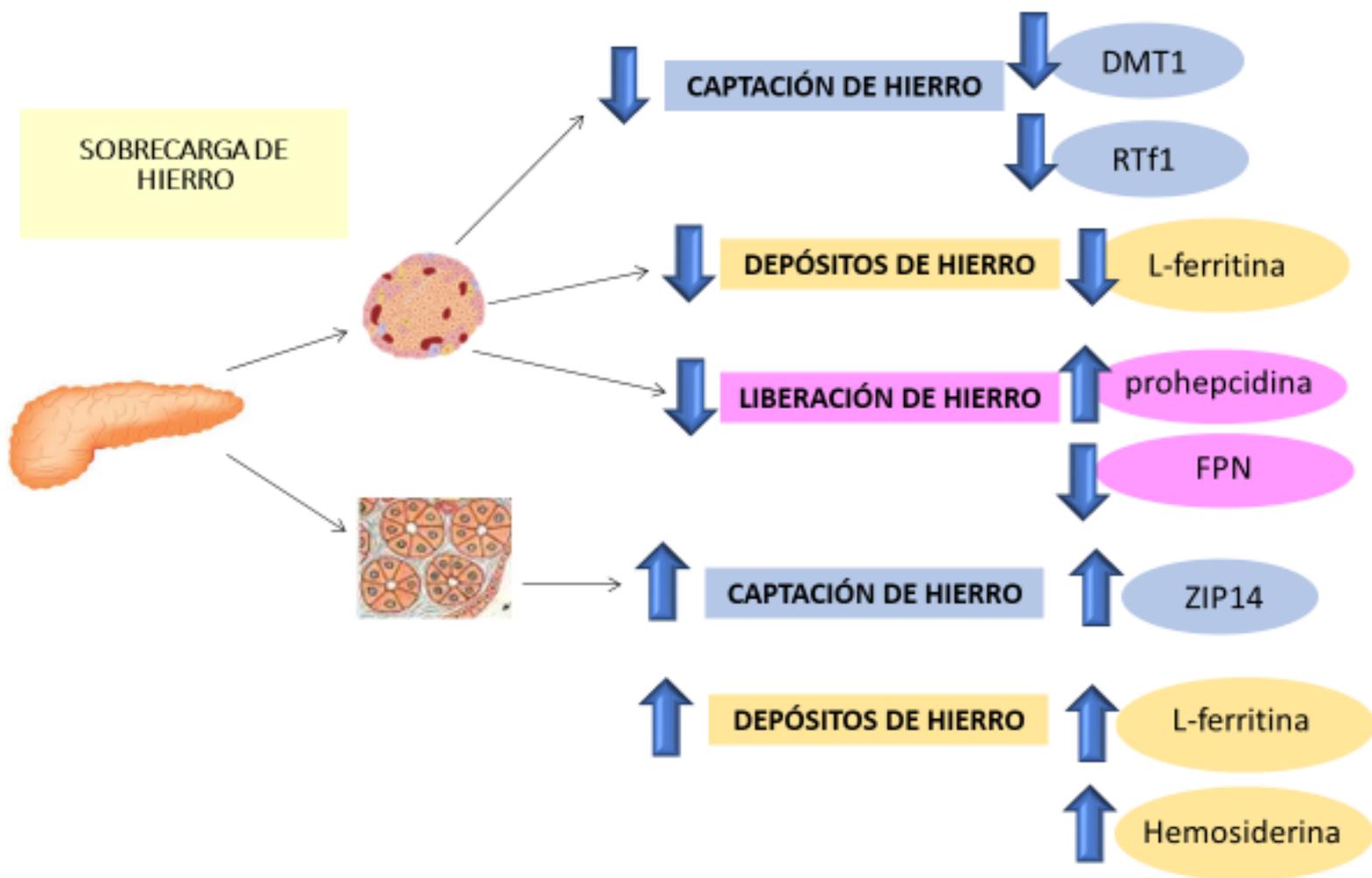
Este mecanismo de protección es necesario, debido a que las células del islote de Langerhans no poseen un mecanismo celular eficaz para la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (Lenzen et al. 1996). Estos autores demostraron que las células del islote de Langerhans de ratón son altamente sensibles al estrés oxidativo dado que presentan niveles muy bajos de enzimas como catalasa y superóxido dismutasa.

3.2.5 CONCLUSIONES

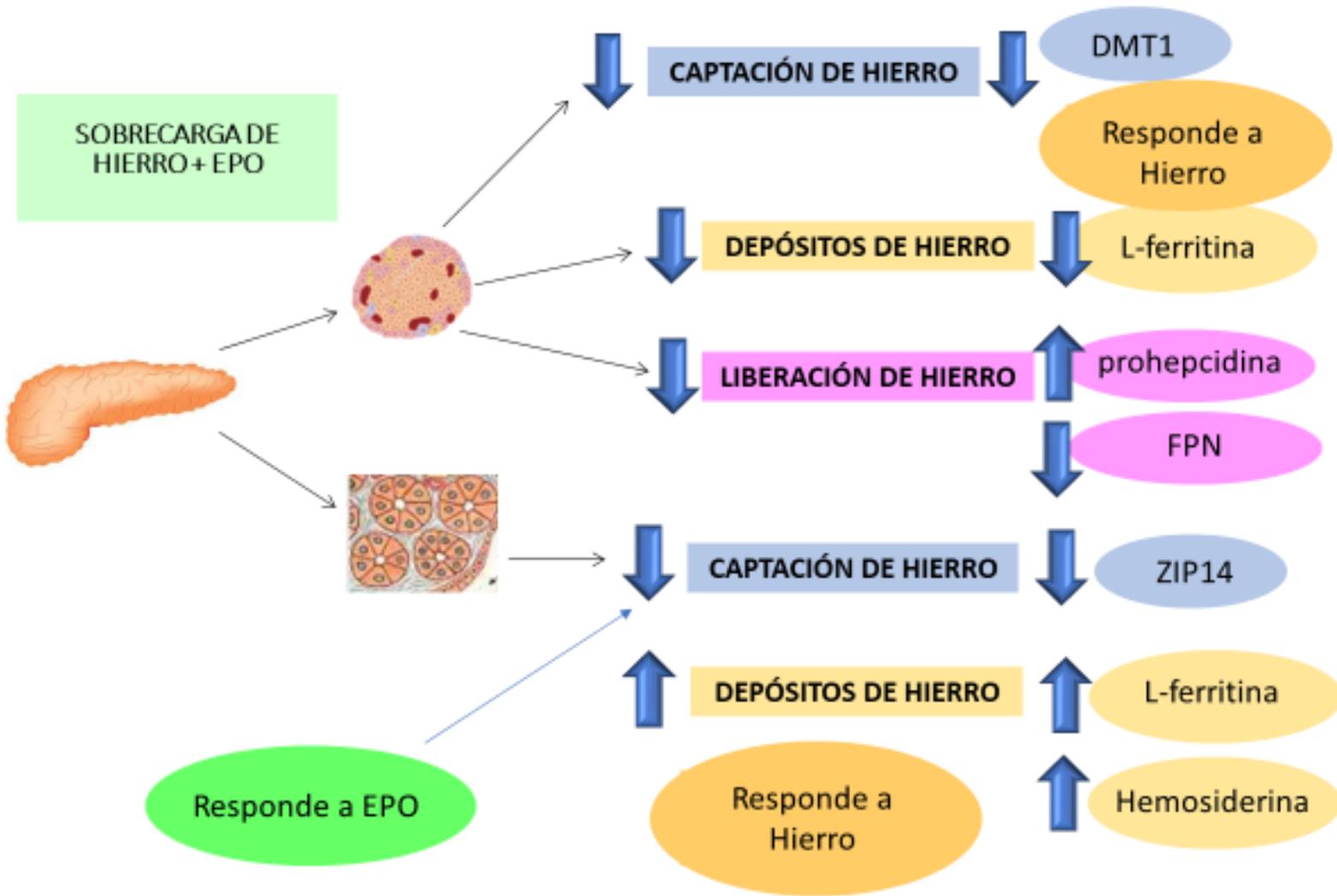
Postulamos que La homeostasis del hierro pancreática estaría desregulada en exceso de hierro, produciendo la sobrecarga, en una primera etapa, en el páncreas exocrino, con posibles consecuencias a largo plazo en el páncreas endócrino.

El mecanismo protector de eritropoyetina que se propone disminuiría los depósitos de hierro, de la zona exócrina mediado por el transportador ZIP14 (Esquema 3 D).

La zona endócrina seguiría un mecanismo protector mediado por hierro a través de la relación inversa entre prohepcidina y DMT1, además de la disminución de RTf1 para reducir los niveles de L-ferritina (Esquema 3 A).



A



B

Esquema 3. Regulación del metabolismo del hierro en páncreas. Captación, depósitos y liberación en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. En Sobrecarga de Hierro (A) aumenta la captación celular de hierro acinar mediado por ZIP14 que se refleja en el aumento de L-ferritina y hemosiderina como parte de un mecanismo protector en el que el páncreas exócrino es capaz de sobrecargarse de hierro protegiendo al páncreas endócrino. En islotes) se reduce la captación mediada por DMT1 y RTf1, reduciéndose los depósitos como L-ferritina. En cuanto al eje hepcidina-ferroportina se observó el aumento de la expresión de prohepcidina que conduciría a una disminución de FPN. En el Modelo de Sobrecarga de Hierro + EPO (B) los islotes siguen la señal de hierro mientras que los acinos siguen la señal de EPO disminuyendo la captación de hierro via la disminución de la expresión de ZIP14.

4. CONCLUSION GENERAL

Finalmente, podemos concluir que los estudios realizados mostraron una eficiente coordinación regulatoria de las proteínas responsables de la movilización y depósito de hierro en los tejidos cardíaco, pulmonar y pancreático.

Mostramos evidencias experimentales que, en desbalance de hierro, estos tejidos están ampliamente regulados por una red de proteínas favoreciendo, de esta manera a activar mecanismos protectores que contribuyen al depósito de hierro, como L-ferritina y hemosiderina, principalmente en macrófagos.

Se conoce que estos órganos están en continua exposición a las especies tóxicas del hierro, por su gran vascularización y a su alta demanda de oxígeno.

La acumulación de hierro extrahepática en desórdenes relacionados con hierro fue evidente en estos tejidos, pudiendo llegar a causar falla cardíaca, injuria pulmonar y diabetes entre otras. Asimismo, como el pulmón está constantemente expuesto al hierro atmosférico, el sistema respiratorio, es otra de las vías de ingreso del biometal.

El tejido pancreático desarrolla un mecanismo en el cual el tejido exócrino es capaz de almacenar hierro para proteger a la zona endócrina.

En los tejidos estudiados, un mecanismo protector para disminuir el exceso de hierro podría ser mediado por la disminución de su captación celular vía el importador DMT1 mientras que el responsable de la sobrecarga sería ZIP14.

Sugerimos la existencia de otros transportadores involucrados en la generación de la sobrecarga cardíaca como podría ser ZIP8, o los canales de calcio tipo L y T.

Discusión

La eritropoyetina protege a las células del exceso de hierro disminuyendo sus depósitos vía ZIP14 en pulmón y páncreas.

Más estudios serán necesarios para comprender el mecanismo protector de EPO en corazón dado que no sería mediado por ninguna de las proteínas del ciclo del hierro evaluadas.

Capítulo 4

***Estudios en Sistema Nervioso
Sobrecarga de Hierro y Eritropoyesis.***

***Modelo Celular. Células de
neuroblastoma humano SH-SY5Y***

***Modelo Animal. Regiones
cerebrales***

MODELO CELULAR

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es un biometal esencial para el desarrollo y crecimiento neuronal (Altamura y Muckenthaler 2009). En estos procesos clave relacionados al metabolismo y replicación neuronal el hierro actúa como cofactor asociado a la mielinización neuronal (Altamura y Muckenthaler 2009).

Si bien destacamos el rol esencial del hierro en estos procesos, su desregulación es extremadamente tóxica, especialmente, en condiciones de exceso, como inductor de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la reacción de Fenton (Winterbourn Christine C 1995).

Estos mecanismos conducen al declive de las funciones neurológicas generando enfermedades neurodegenerativas (Aguirre et al. 2005; Nuñez et al. 2012).

Estudios de nuestro grupo identificaron proteínas pulmonares y pancreáticas clave del transporte de hierro y mostraron su función en la movilización celular por el estrés oxidativo inducido por hierro (Giorgi y Roque 2014, Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

A partir de estos resultados, estudiamos cómo las células neuronales SH-SY5Y movilizan el hierro en estado de exceso.

Para ello desarrollamos un Modelo Celular de Sobrecarga de Hierro con FAC utilizando células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, modelo de elección para el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Aguirre et al. 2005; Preggi et al. 2006).

En estas condiciones estudiamos los procesos de captación, movilización y depósito de hierro identificando las proteínas relacionadas con los mismos, que se pueden asociar a los cambios en la viabilidad celular por estrés oxidativo.

Evaluamos el efecto neuroprotector de EPO frente al exceso de hierro dado que previene la apoptosis neuronal inducida por estaurosporina, TNF- α y la inflamación (Preggi et al. 2006; Wenker et al. 2013).

2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

2.1 EFECTO DEL CITRATO AMÓNICO FÉRRICO

La concentración de FAC a utilizar se determinó evaluando la viabilidad celular por el método de exclusión con azul tripán y el método de captación celular de rojo neutral realizando una curva dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de FAC (0, 30, 80, 150, 450, 600 μM) durante distintos tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Ambos métodos demostraron una diferencia significativa en la viabilidad celular utilizando dosis de FAC de 30 μM durante 72 h ($64 \pm 3\%$) (Figura 2) o dosis altas de FAC de 450 μM y 600 μM durante 24 h ($67 \pm 2\%$) (Figura 1) respecto al control ($100 \pm 12\%$). Por lo tanto, observamos que la viabilidad celular dependía de la concentración de FAC y del tiempo de incubación (Figura 3).

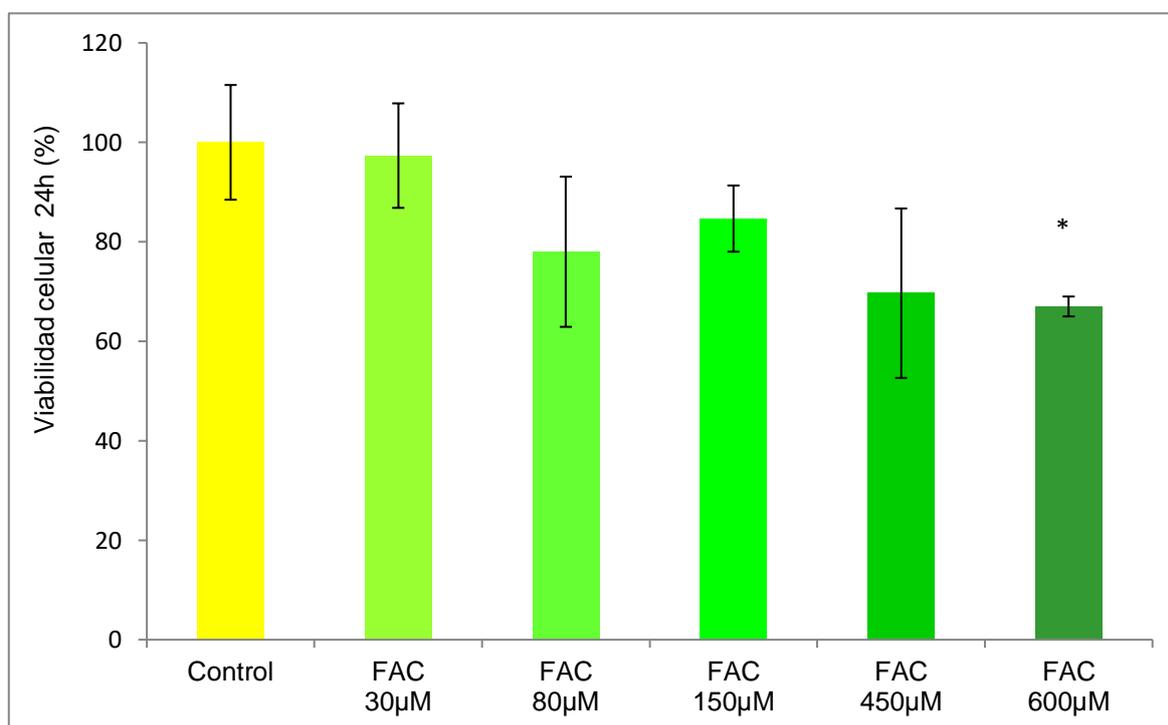


Figura 1. Viabilidad celular 24 h de incubación con diferentes dosis de FAC (0, 30, 80, 150, 450, 600 μM). * $p < 0,05$

Resultados

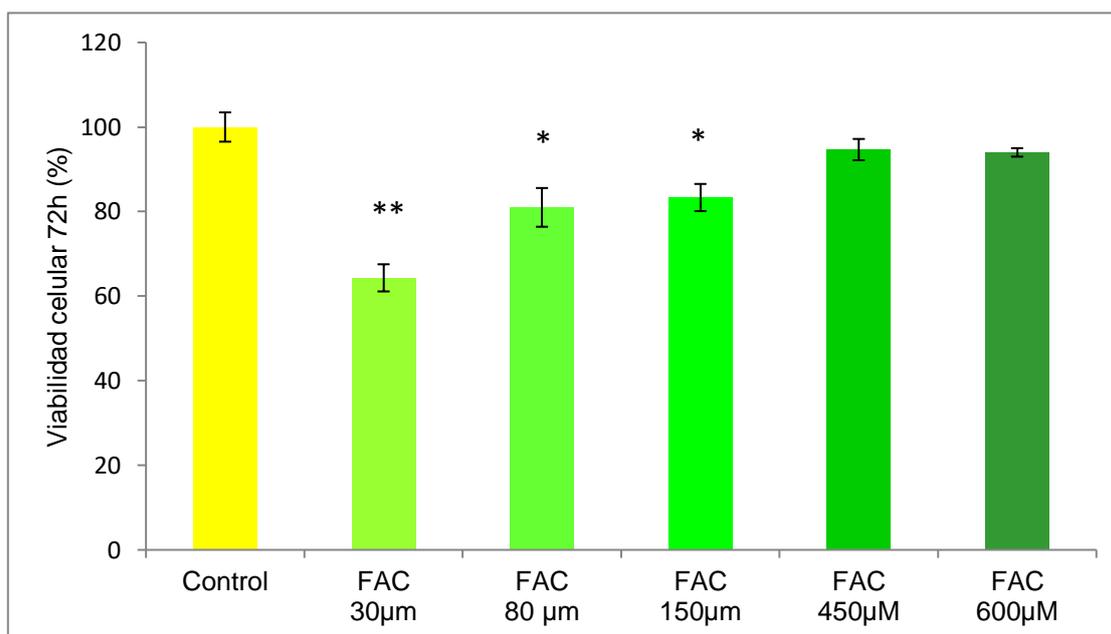


Figura 2. Viabilidad celular 72 h de incubación con diferentes dosis de FAC (0, 30, 80, 150, 450, 600 µM). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

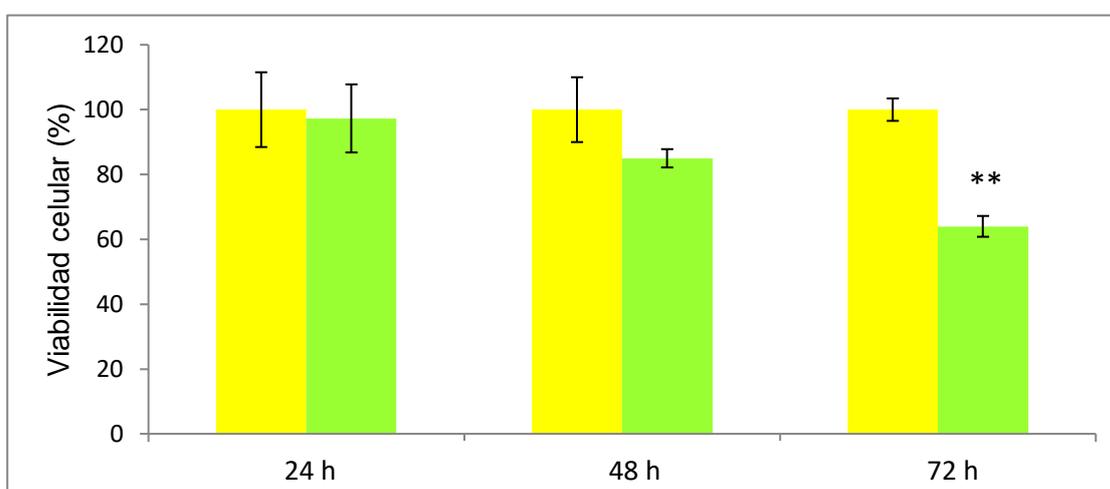


Figura 3. Viabilidad celular a diferentes tiempos de incubación con dosis de FAC 30 µM. ** $p < 0,01$

2.2 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se estudió el efecto del estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno.

Conociendo que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es inductor de estrés oxidativo generando ROS, se evaluó viabilidad celular utilizando diferentes concentraciones de H_2O_2 (100, 200, 300 y 400 µM) como tratamiento celular.

Resultados

En estas condiciones, se determinó que la concentración de H_2O_2 $400\mu\text{M}/6$ h de incubación disminuyó la viabilidad celular en un 30% (73 ± 6 %) respecto al control (100 ± 8 %) (Figura 4). Confirmando la muerte celular por especies reactivas de oxígeno generadas por H_2O_2 . Las concentraciones fueron elegidas en base a bibliografía existente en células de neuroblastoma SH-SY5Y por *Feng et al. (2016)*.

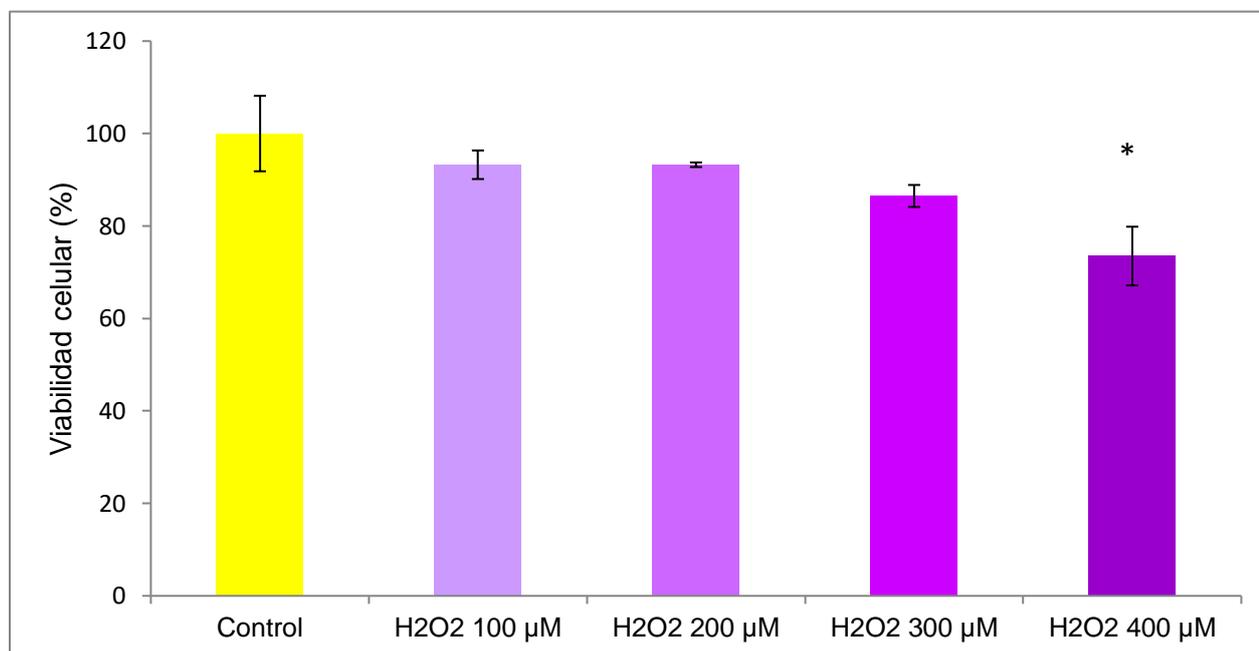


Figura 4. Viabilidad celular utilizando H_2O_2 (100-400 mM) por 6 h. * $p < 0,05$

3. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO CELULAR

Con el objetivo de evaluar si el hierro FAC estaba siendo internalizado por las células de neuroblastoma humano y causando la muerte celular decidimos cuantificar el nivel de hierro en el medio de cultivo para el tratamiento con FAC $30\mu\text{M}/72$ h y FAC $600\mu\text{M}/24$ h. Dado que con estas concentraciones y tiempos de incubación se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular, respecto al control.

Se observó que el contenido de hierro en el medio de cultivo disminuyó un 25% en la condición $600\mu\text{M}/24$ h (Figura 5) y un 42% en la condición $30\mu\text{M}/72$ h ($52,52 \pm 10,2\mu\text{g/dL}$) (Figura 6) respecto al control ($125,14 \pm 15,9\mu\text{g/dL}$). Estos resultados sugirieron la internalización del FAC $30\mu\text{M}/72$ h y

Resultados

la optimización del tratamiento dado que se comprobó que son más efectivas bajas dosis de hierro FAC durante periodos prolongados de tiempo.

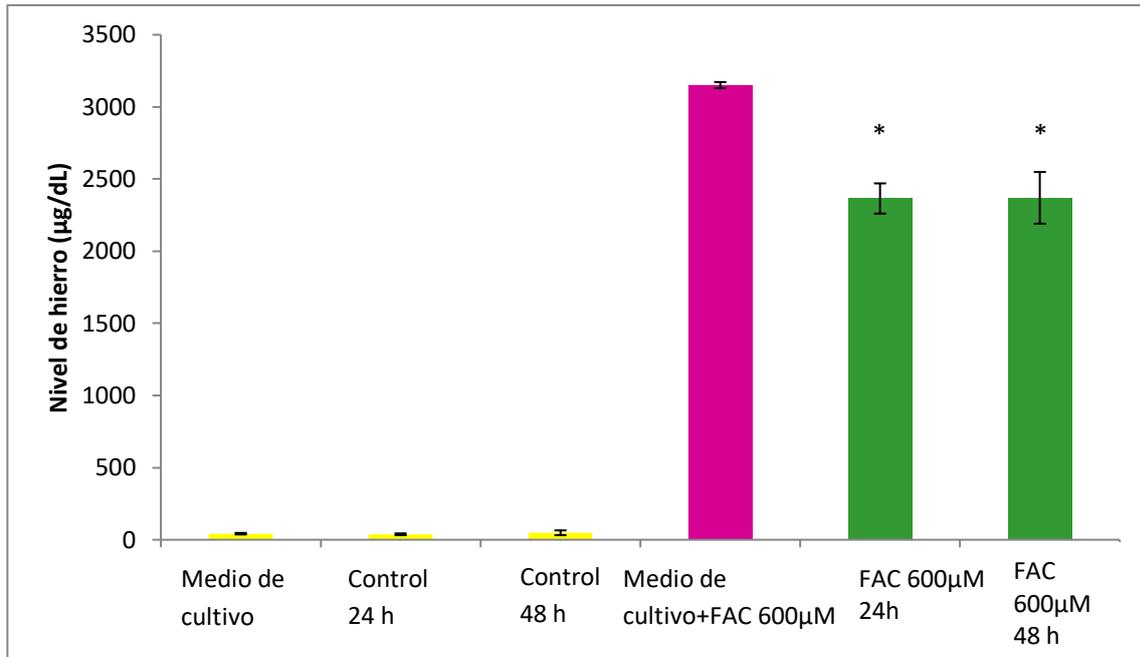


Figura 5. Cuantificación de hierro (µg/dL) en el medio de cultivo para tratamiento con FAC 600 µM 24 y 48 h. * $p < 0,05$

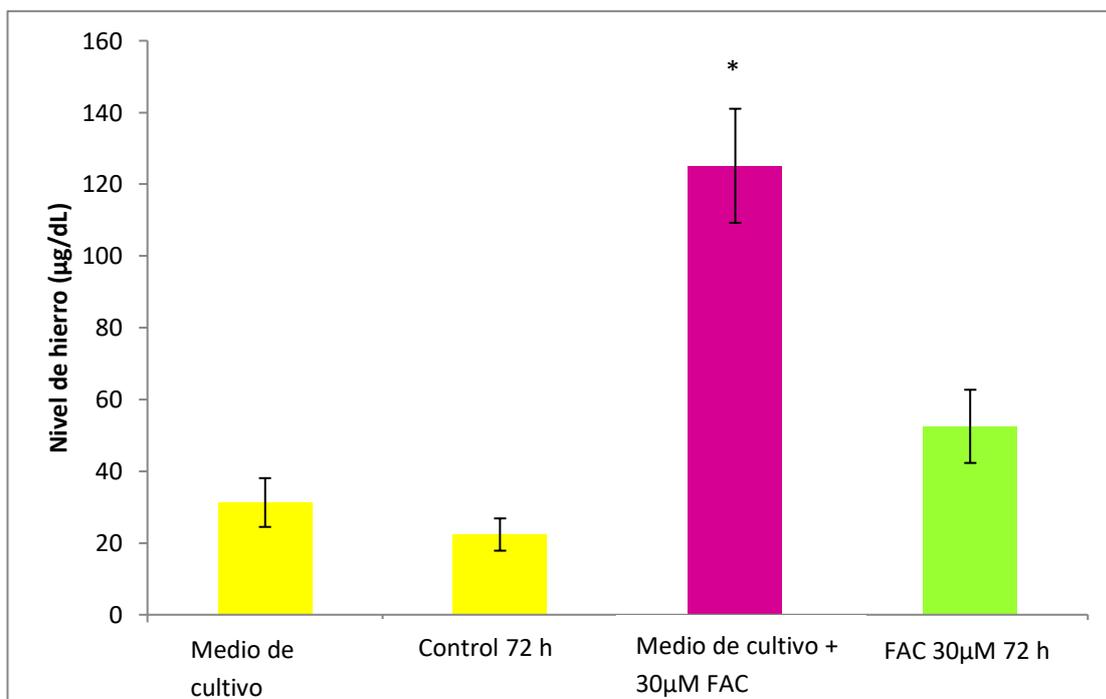


Figura 6. Cuantificación de hierro (µg/dL) en el medio de cultivo para tratamiento con FAC 30 µM 72 h. * $p < 0,05$

4. REVERSIÓN DEL EFECTO DE ROS CON N-ACETIL CISTEÍNA (NAC) EN SH-SY5Y

4.1 REVERSIÓN DEL EFECTO DE FAC

Para estudiar si el exceso de especies reactivas de oxígeno se relaciona con la muerte neuronal se decidió realizar un pretratamiento con un agente reductor conocido en la bibliografía (Kim et al. 2015).

La N-acetil cisteína (NAC) es un dador de grupos sulfhidrilo e interviene en la formación de glutatión y la reducción de las especies reactivas del oxígeno (Kim et al. 2015). Se evaluó viabilidad celular utilizando 2 concentraciones de NAC, 2mM y 4 mM 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.

Se mostró que el pretratamiento con NAC 2mM aumentó la viabilidad celular un 40% (74 ± 6 %) respecto a FAC 30 μ M (35 ± 6 %) (Figura 7), revirtiendo su efecto oxidativo, sugiriendo que el exceso de hierro induce la muerte neuronal por estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Posteriormente se decidió utilizar la dosis de NAC 2 mM 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/ 72 h.

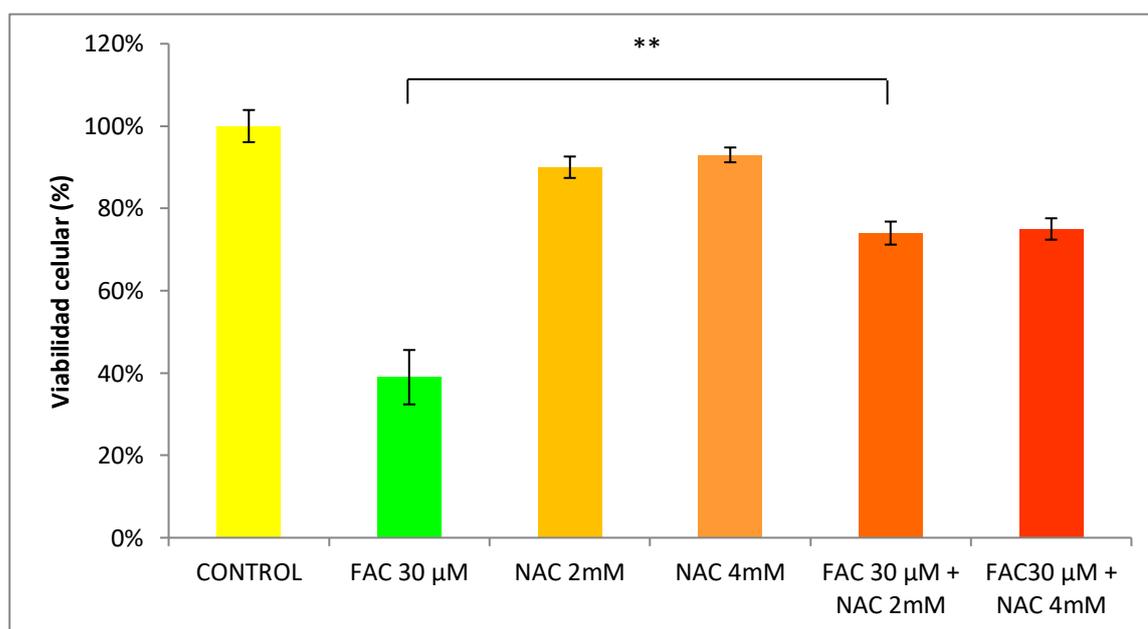


Figura 7. Viabilidad celular utilizando NAC 2 y 4 mM 12 h previas a la incubación con FAC 30 μ M/ 72 h. ** p <0,01.

4.2 REVERSIÓN DEL EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Una vez determinada la dosis óptima de peróxido de hidrógeno se evaluaron 2 concentraciones de NAC (2 y 4 mM) como pretratamiento 12 h previas al tratamiento con H_2O_2 /6 h.

Se observó que el NAC 4mM ($98 \pm 3\%$) revertía el efecto sobre la viabilidad celular inducido por el H_2O_2 400 μ M ($74 \pm 6 \%$) (Figura 8).

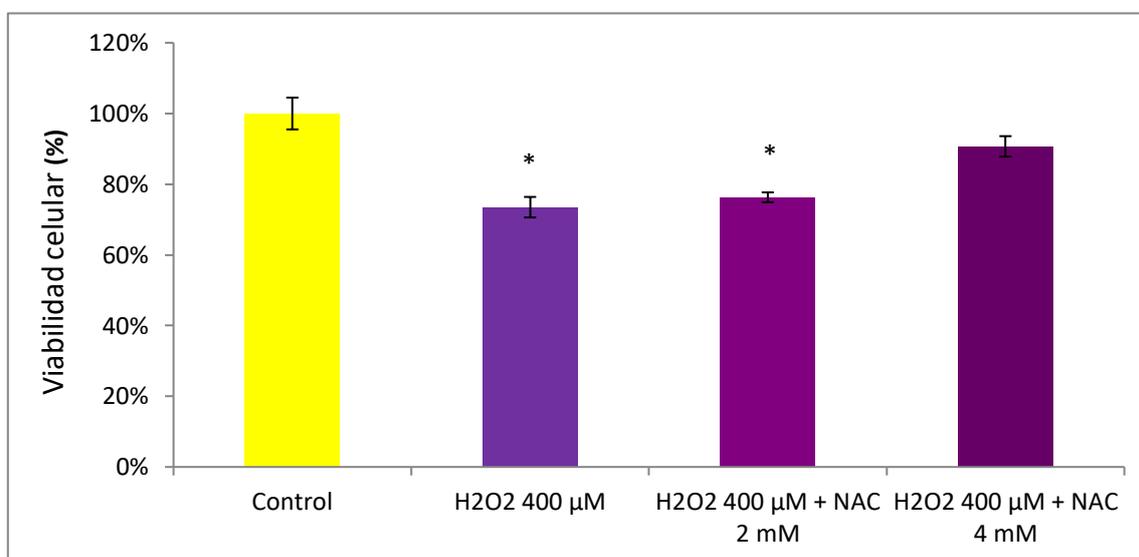


Figura 8. Viabilidad celular utilizando NAC 2 y 4 mM 12 h previas al tratamiento celular con H_2O_2 400 mM/6 h. * $p < 0,05$

5. EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR INDUCIDO POR EPO

5.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL PRETRATAMIENTO CELULAR CON ERITROPOYETINA HUMANA

El pretratamiento con EPO se basa en sus características de molécula neuroprotectora frente a agentes neurotóxicos e hipoxia (Preggi et al. 2006; Wenker et al. 2010), además de su clásica función en la eritropoyesis y la movilización de hierro. La evaluación de la función neuroprotectora de la eritropoyetina (EPO) frente al exceso de hierro, se realizó evaluando viabilidad celular con diferentes dosis de eritropoyetina humana recombinante (RhuEPO) (10, 25, 50, 75 y 100 UI) 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72h, de acuerdo a la bibliografía consultada (Preggi et al. 2006).

Dosis de EPO de 50 UI revirtieron el efecto del FAC 30 μ M/72h sobre la viabilidad celular, con un aumento significativo del 30% (Figura 9).

Resultados

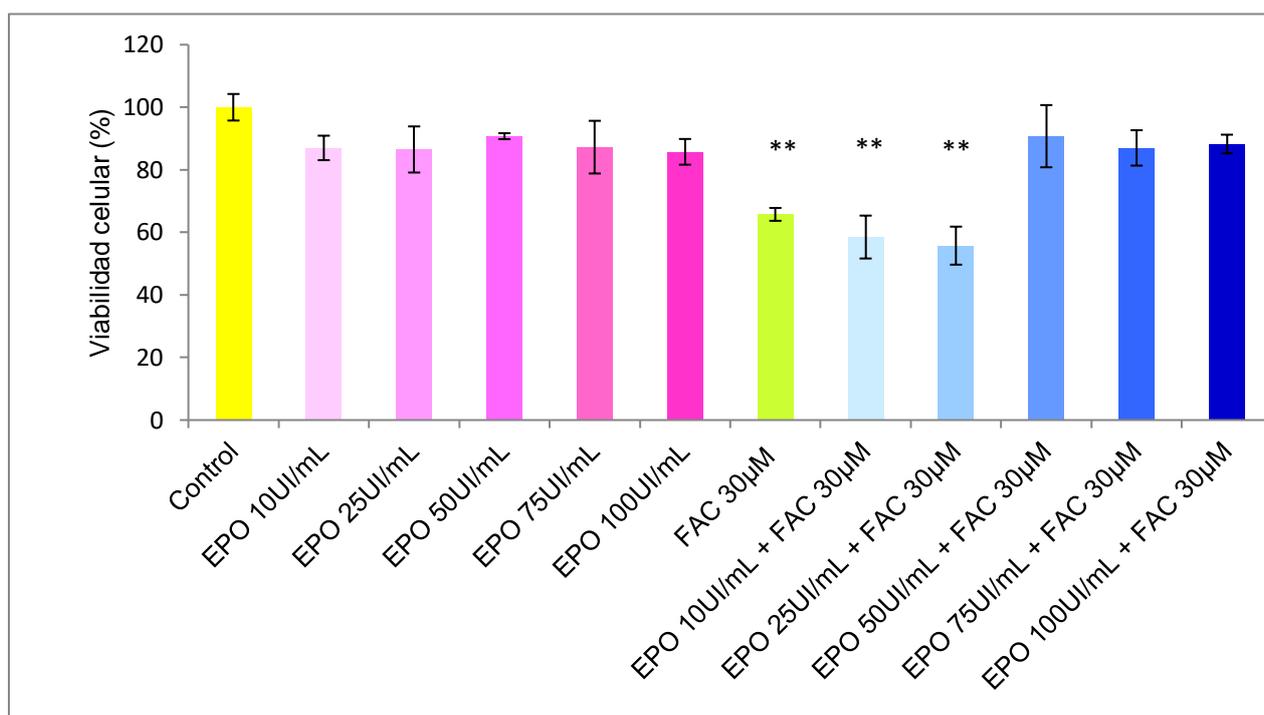


Figura 9. Viabilidad celular utilizando EPO 10, 25, 50, 75 Y 100 UI/mL como pretratamiento 12 h previas al tratamiento celular con FAC 30 µM/72 h. ** $p < 0,01$

5.2 EFECTO DE LA ALBÚMINA SOBRE EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO

Dado que EPO HEMAX contiene un elevado porcentaje de albúmina (5 mg de albúmina en cada ampolla de 3000 UI/2 mL de EPO), se realizó un control interno para descartar posibles efectos de la albúmina sobre las células de neuroblastoma y así asegurar que el efecto neto neuroprotector que demostramos es propio de EPO.

Se preincubaron las células con 125 µg/ml (la cantidad de albúmina contenida en la dosis de EPO 75 UI/mL) 12 h previas al tratamiento con FAC 30µM/72 h y no se observan diferencias sobre la viabilidad celular respecto al tratamiento con FAC sugiriendo que el efecto observado es netamente de EPO (Figura 10).

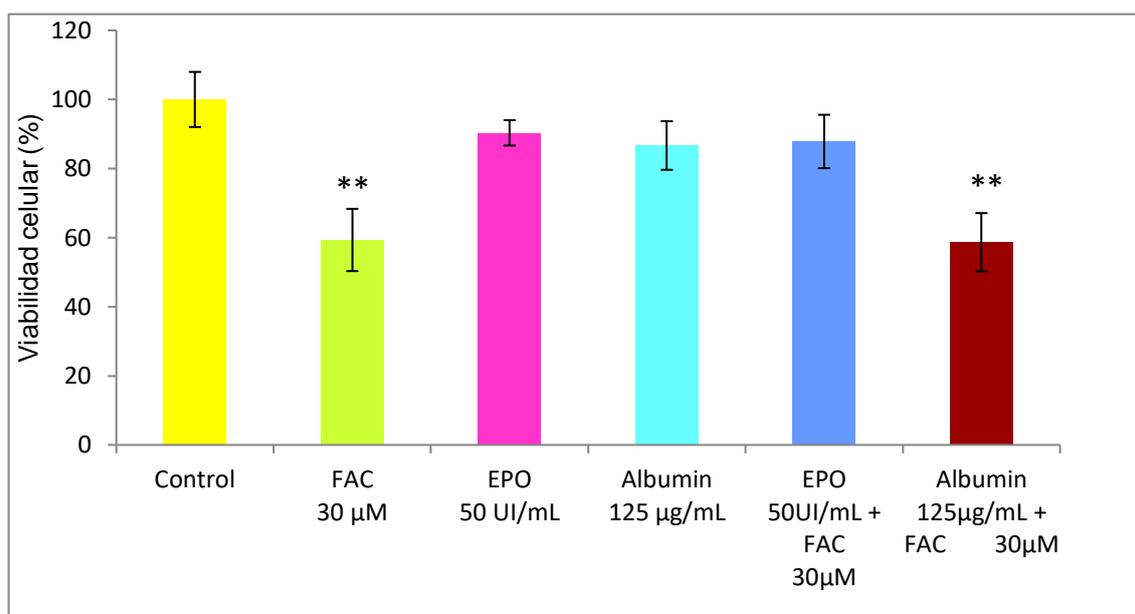


Figura 10. Viabilidad celular utilizando albúmina 125 μ g/mL 12 h previas al tratamiento celular con FAC 30 μ M/72 h. ** p <0,01

6. EVALUACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DEL HIERRO CELULAR. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO NEURONAL

Una vez optimizado el Modelo Celular de Sobrecarga de Hierro evaluamos el efecto de las siguientes proteínas regulatorias del ciclo del hierro: a) propéptido de la proteína reguladora hepcidina (prohepcidina); b) importadores del hierro: Receptor de Transferrina 1 (RTf1), transportador de metales divalentes (DMT1), Zrt-Irt like protein (ZIP14); c) de depósito como L y H ferritina, y d) de transporte del grupo hemo como heme carrier protein (HCP1) y felin leukemia virus subgroup C receptor related protein 1 (FLVCR1).

La expresión de estas proteínas se estudió en presencia o ausencia de EPO y NAC.

6.1. EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1

6.1.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC

La expresión de DMT1 fue claramente identificada en el citoplasma de las células del Grupo Control (Figura 11 A). En presencia de FAC la inmunoreactividad de DMT1 citoplasmática fue débil

Resultados

respecto a la condición basal (Figura 11 B), sugiriendo que el transportador no presenta un rol principal en la captación de hierro celular en exceso de hierro.

El pretratamiento con NAC revirtió el efecto observado con el tratamiento con FAC siendo la expresión de DMT1 similar al control (Figura 11 D)

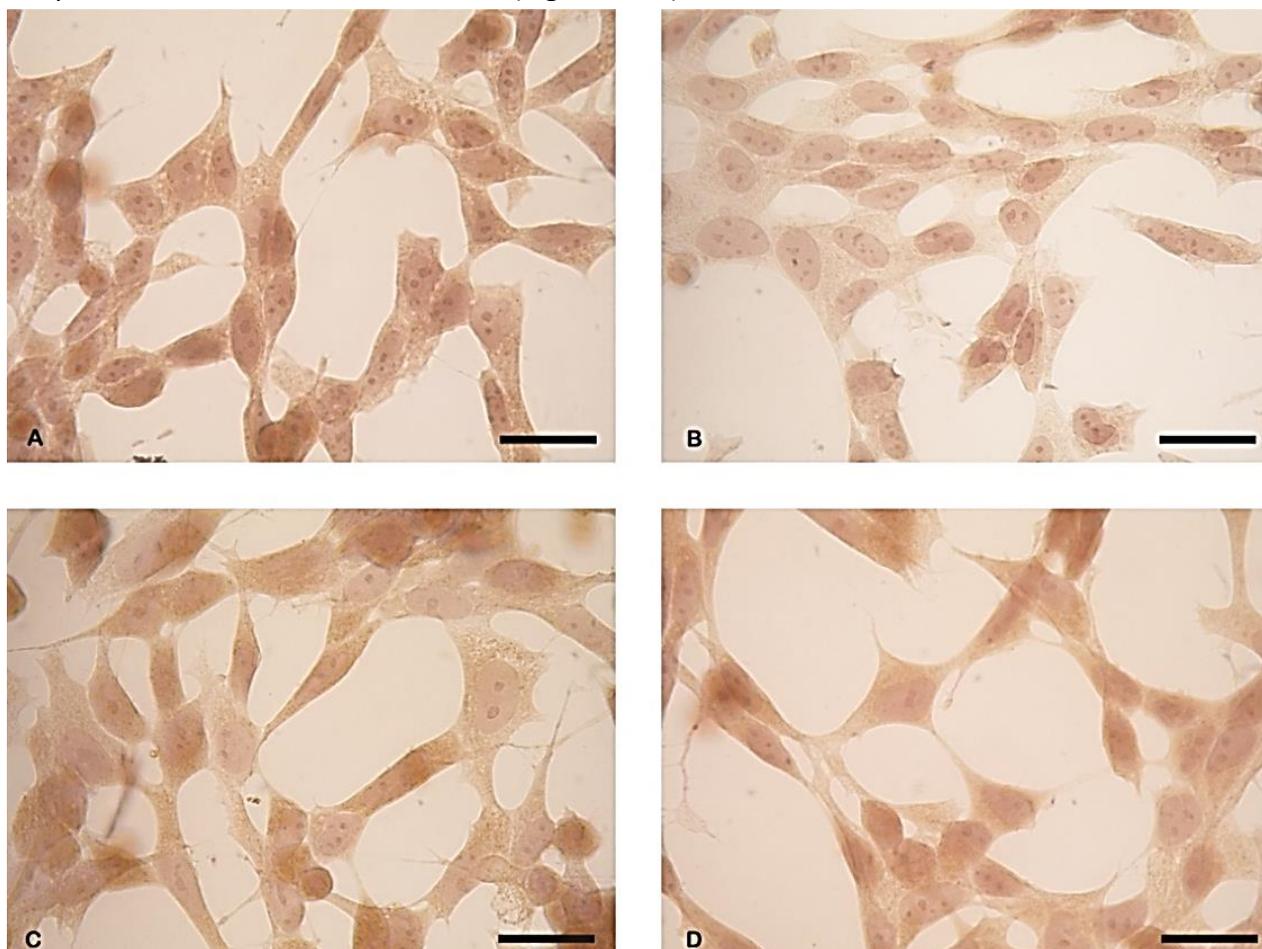


Figura 11. Inmunomarcación de DMT1 en células de neuroblastoma humano. Grupo Control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M 72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con NAC 2mM (C). Células SH-SY5Y pretratadas con NAC 2 mM/ 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/ 72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-DMT1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.1.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

Una vez que se mostró la disminución de la expresión de DMT1 en sobrecarga de hierro, evaluamos su expresión utilizando EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC.

La expresión de DMT1 fue muy leve siguiendo la señal de hierro como señal predominante (Figura 12 B y D), también mostramos que EPO no revierte el efecto inducido por FAC como lo hacía el antioxidante NAC. Este resultado sugiere que el efecto protector de EPO sobre la viabilidad celular no sería mediado por este transportador.

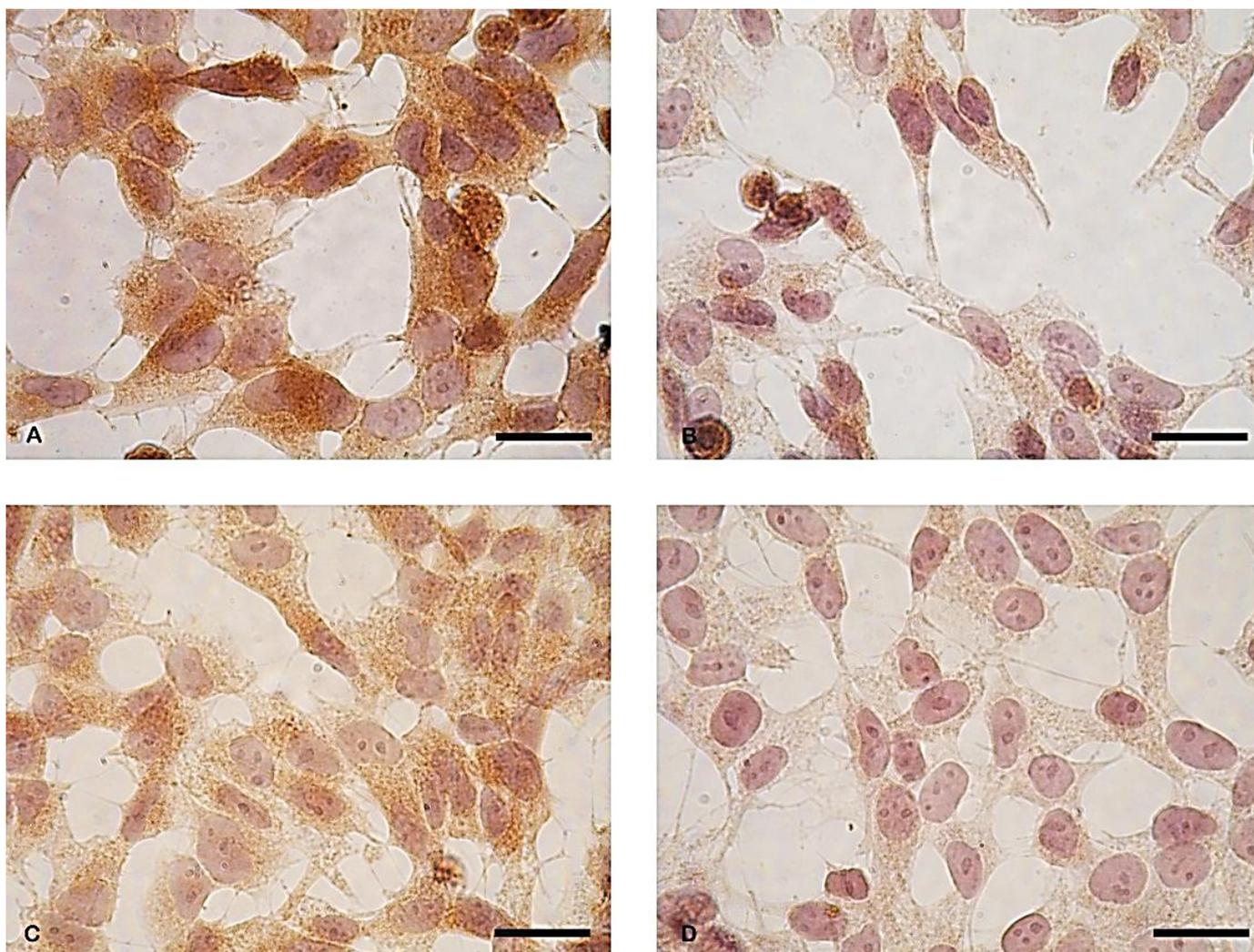


Figura 12. Inmunomarcación de DMT1 en células de neuroblastoma humano. Grupo Control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M/ 72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-DMT1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.2. EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR ZRT-IRT like PROTEIN 14 (ZIP14)

6.2.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC

En condiciones basales ZIP 14 se localizó en el citoplasma celular (Figura 13 A), en presencia de FAC la expresión de ZIP14 fue intensa respecto al control (Figura 13 B) sugiriendo su participación en la captación del exceso de hierro, que podría conducir posteriormente a la muerte neuronal. La utilización del antioxidante N-acetil cisteína como pretratamiento produjo una disminución de la expresión de ZIP14 respecto a la condición con FAC similar al control (Figura 13 D).

La evidente expresión de ZIP14 reflejaría su participación en la captación neuronal de hierro en estados de exceso.

Resultados

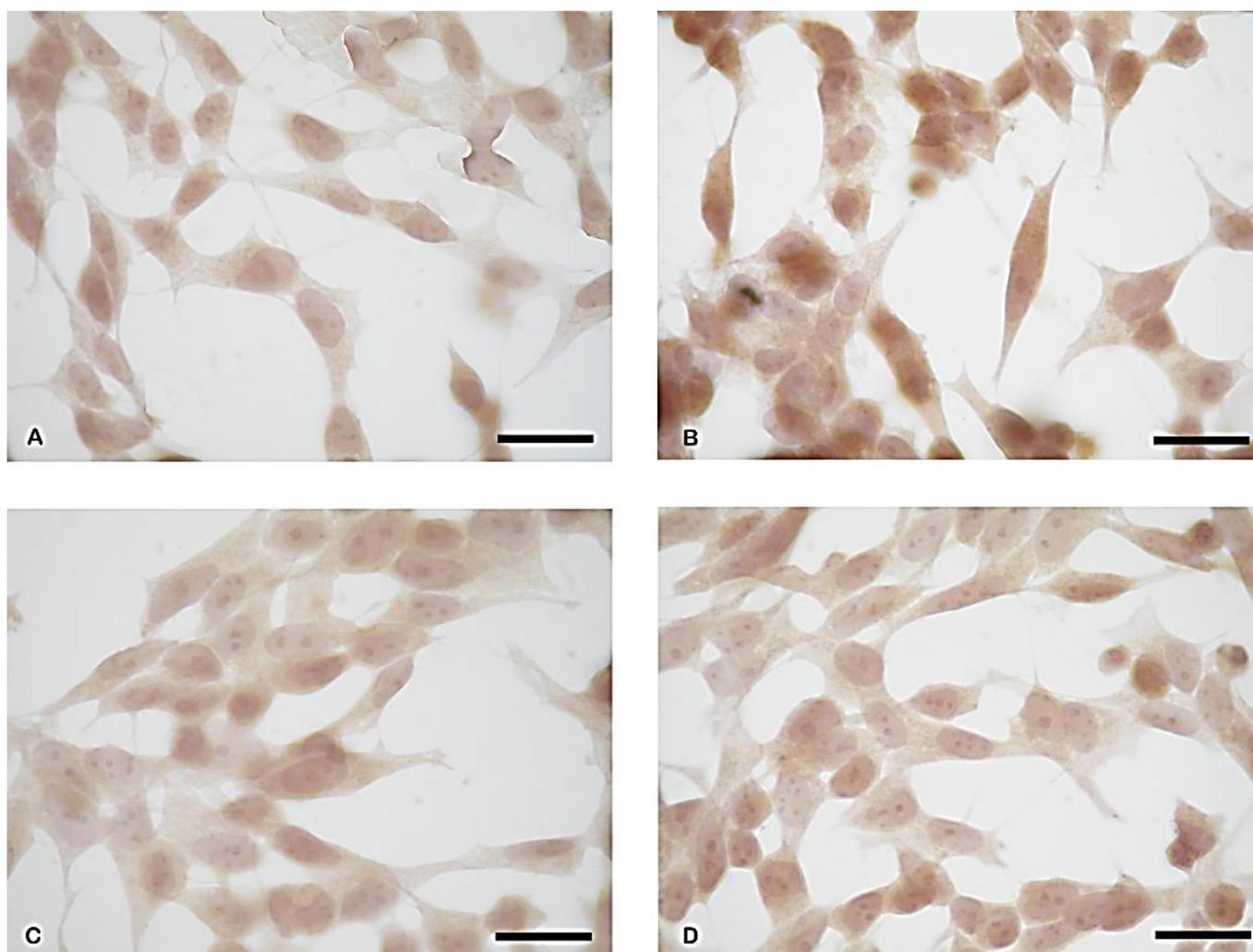


Figura 13. Inmunomarcación de ZIP14 en células de neuroblastoma humano. Grupo Control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M/72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con NAC 2Mm (C). Células SH-SY5Y pretratadas con NAC 2 Mm/ 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/ 72 h (D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.2.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

Una vez que observamos el marcado aumento en la inmunomarcación de ZIP14 frente a hierro y que el mismo se revertía por el pretratamiento con NAC, evaluamos si el efecto neuroprotector de EPO se relacionaba con la expresión de esta proteína.

Observamos que EPO no producía cambios en la expresión de ZIP14, es decir en el grupo FAC + EPO la inmunomarcación fue similar al grupo FAC siendo muy intensa (Figura 14 B y D), sugiriendo que el efecto de EPO no sería mediado por esta proteína.

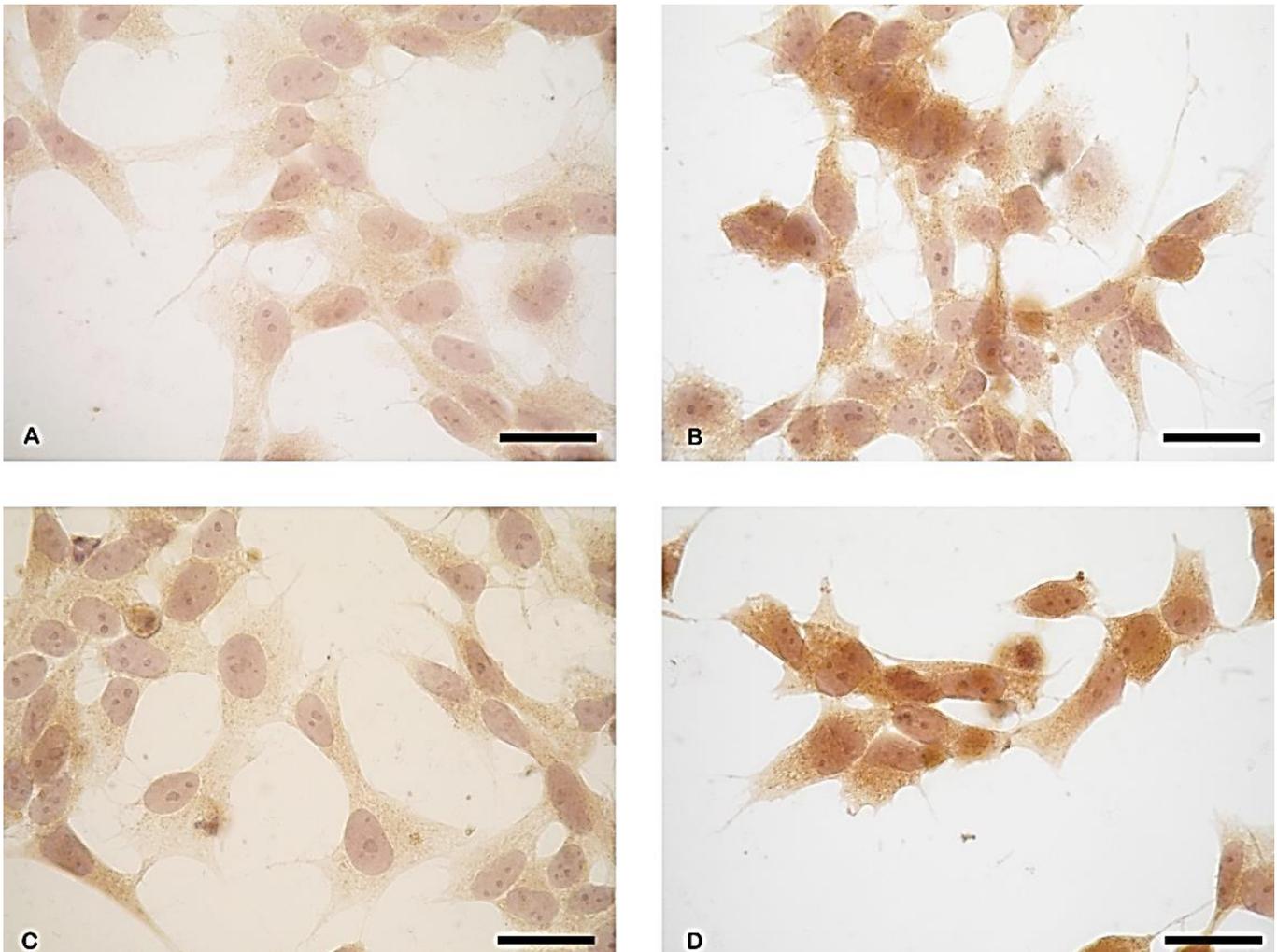


Figura 14. Inmunomarcación de ZIP14 en células de neuroblastoma humano. Grupo Control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M/72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA 1 (RTf1)

6.3.1 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

La expresión del receptor de transferrina 1 (RTf1) se observó en la membrana y en el citoplasma celular de las células control (Figura 15 A).

En exceso de hierro se observó un cambio de localización del importador de hierro celular limitándose al citoplasma celular (Figura 15 B), sugiriendo su endocitosis al unirse a su ligando hierro unido a transferrina (TBI) y de esta forma mediar una mayor captación de hierro.

Resultados

En presencia de EPO como pretratamiento no se observaron cambios en la expresión del transportador de hierro RTf1 (Figura 15 D), indicando que el efecto neuroprotector de EPO no sería mediado por dicho importador.

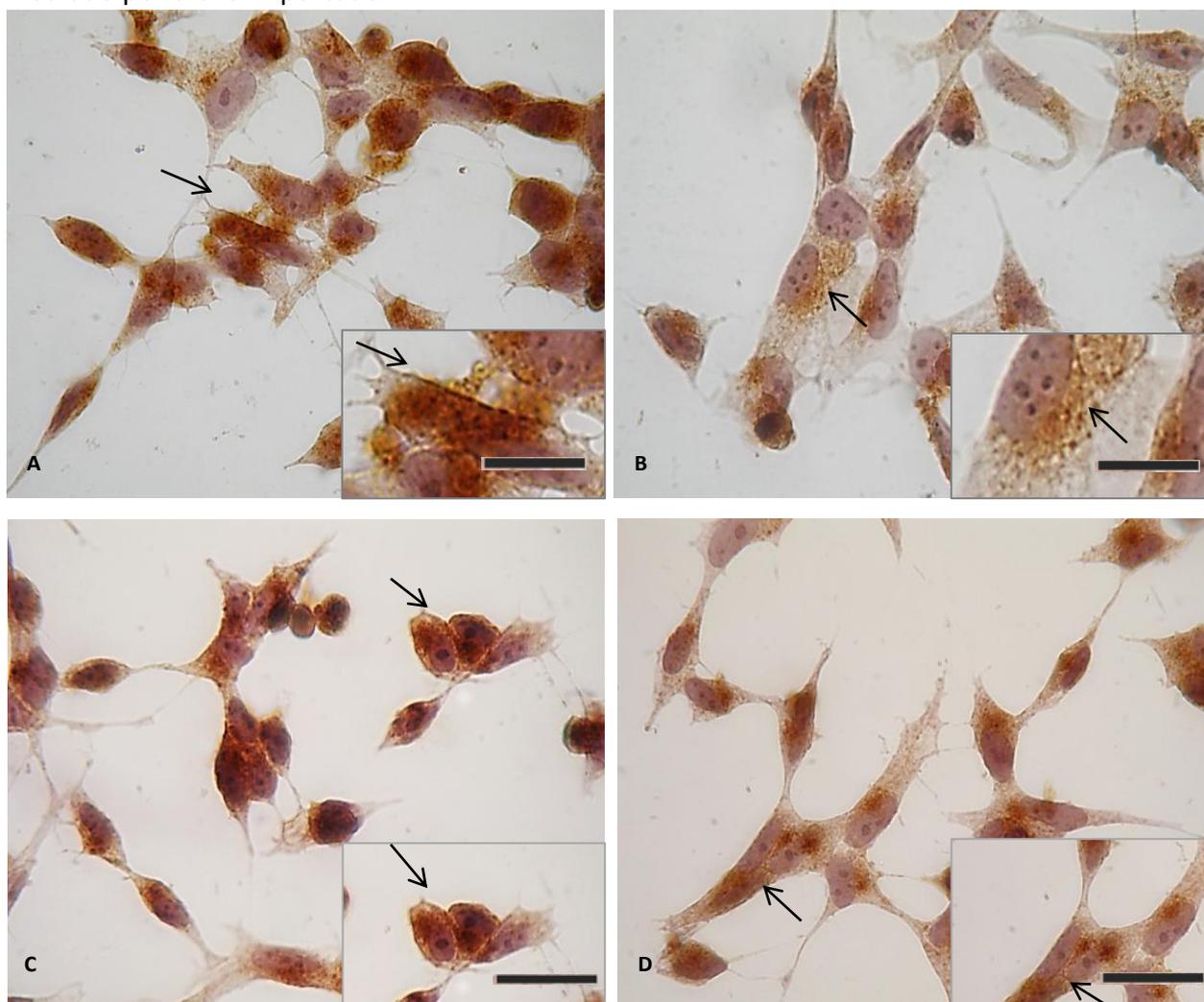


Figura 15. Inmunomarcación del Receptor de Transferrina 1 en células de neuroblastoma humano. Grupo Control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M/72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-RTf1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m. Las flechas indican la localización del importador, en membrana o intracelular. Sobre el borde inferior detalle una ampliación de la marcación celular.

6.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE DEPÓSITO FERRITINA

6.4.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC

Cuando evaluamos la expresión de L-Ferritina observamos una intensa marcación intracelular en el grupo expuesto a FAC respecto al Grupo Control (Figura 16 B), sugiriendo un mayor depósito de hierro intracelular como mecanismo protector debido a su capacidad de almacenar hierro

Resultados

disminuyendo su biodisponibilidad en las organelas celulares, evitando la formación de radicales libres de oxígeno. El pretratamiento con NAC revirtió dicho efecto siendo la expresión similar al control (Figura 16 D).

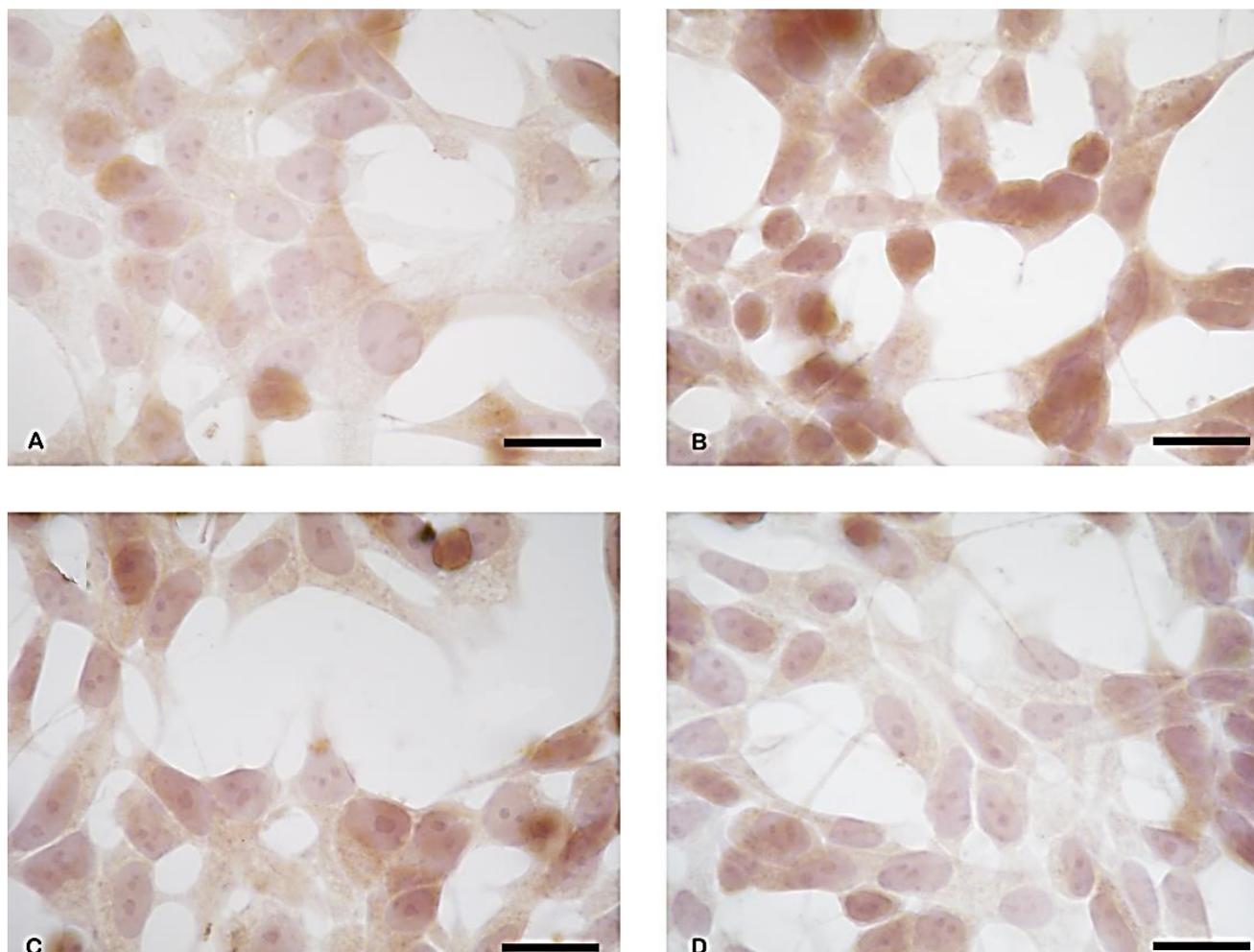


Figura 16. Inmunomarcación de L-ferritina en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M / 72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con NAC 2Mm (C). Células SH-SY5Y pretratadas con NAC 2 mM/ 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/ 72 h. Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-L-ferritina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.4.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

Una vez que observamos que en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y frente al hierro aumenta la expresión de L-ferritina y que este efecto se revertía con NAC, evaluamos la expresión de esta proteína con EPO como pretratamiento celular.

Evaluamos si el efecto protector de EPO observado es mediado por esta proteína del ciclo del hierro, sin embargo, no observamos diferencias en la expresión de L-ferritina respecto a la condición

Resultados

de exceso de hierro encontrándose en ambos casos altamente expresada en el citoplasma celular en relación al Grupo Control (Figura 17 B y D).

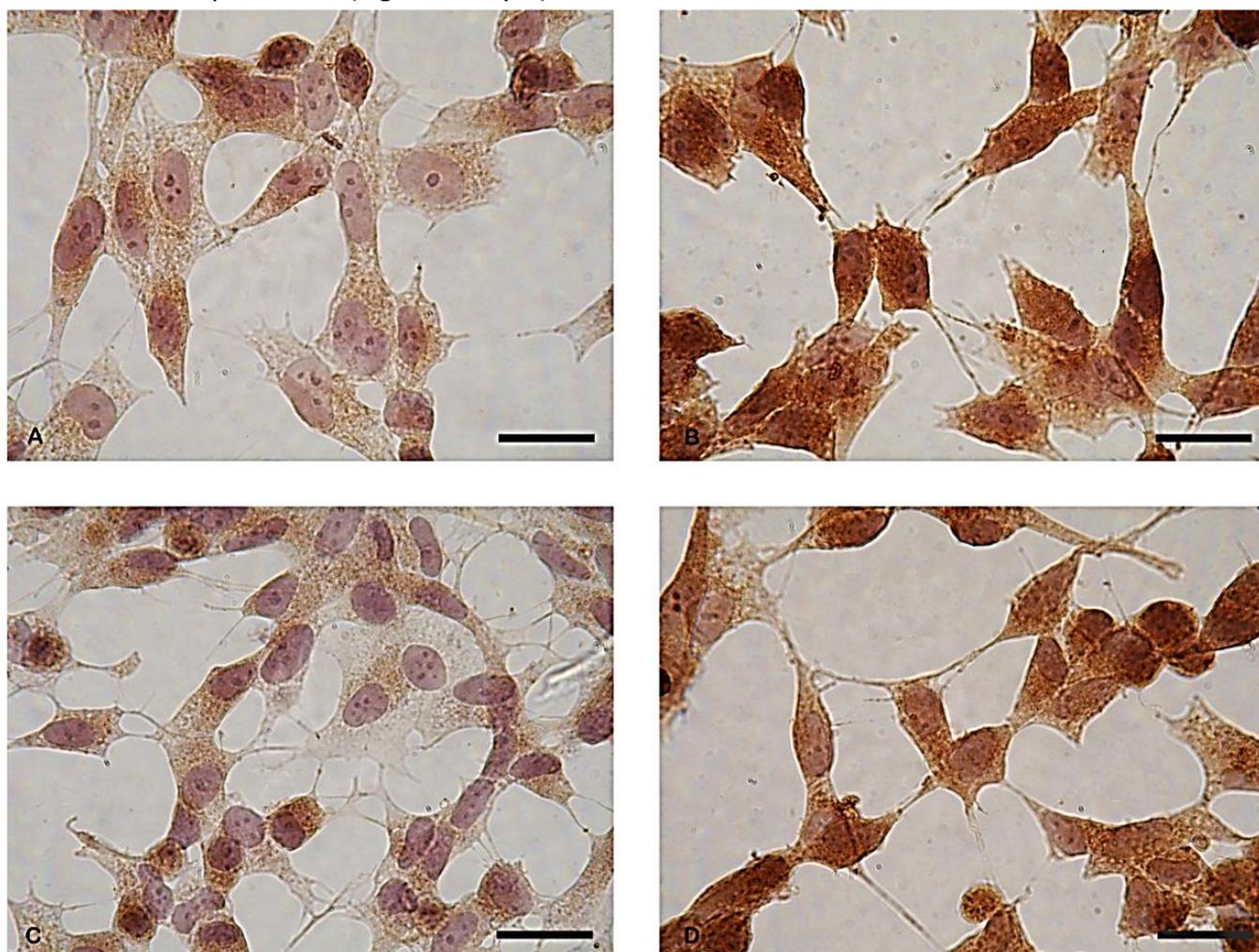


Figura 17. Inmunomarcación de L-Ferritina en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M/ 72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-L-ferritina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

También evaluamos la expresión de la isoforma H de la proteína ferritina mediante inmunofluorescencia. Al igual que para L-ferritina se observó un aumento de su expresión en Sobrecarga de Hierro respecto al Grupo Control (Figura 18 F) sugiriendo una mayor acumulación intracelular como mecanismo protector frente al exceso de hierro. No se demostraron cambios en presencia de eritropoyetina como pretratamiento (Figura 18 L).

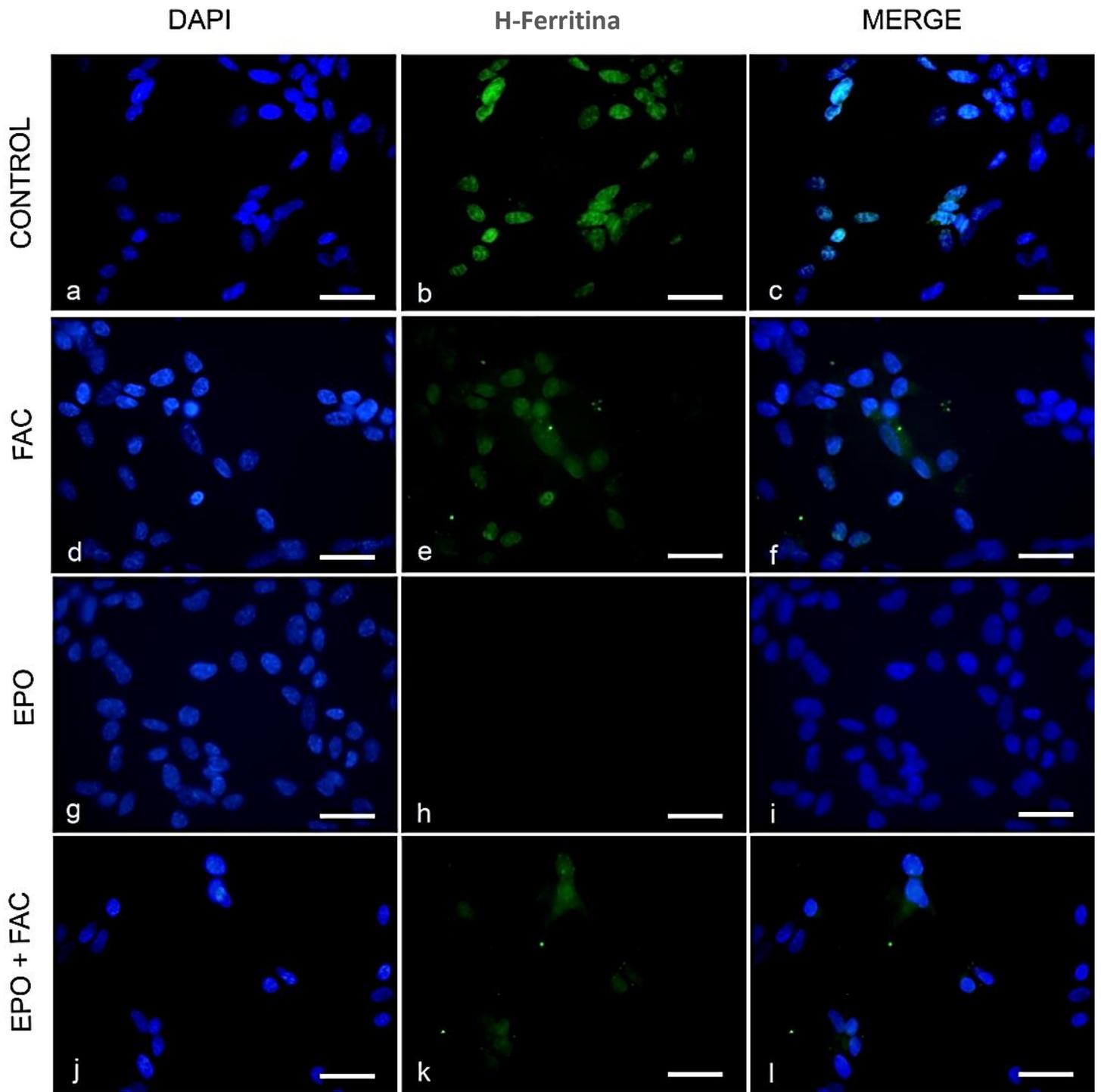


Figura 18. Inmunofluorescencia para H-ferritina en células de neuroblastoma humano. Núcleos de grupo control marcación con DAPI (A). Expresión de H-ferritina en grupo control (B). Merge grupo control (C). Núcleos de grupo sobrecarga de hierro (D). Expresión de H-ferritina grupo FAC (E). Merge grupo FAC (F). Núcleos grupo con eritropoyetina (G). Expresión de H-ferritina grupo EPO (H). Merge grupo EPO (I). Núcleos de células pretratadas con Eritropoyetina 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h (J). Expresión de H-ferritina grupo EPO+FAC (K). Merge grupo EPO+FAC (L). Las células se procesaron utilizando el anticuerpo primario anti-H-ferritina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.5 EXPRESIÓN DEL PROPÉPTIDO DE LA PROTEÍNA REGULATORIA HEPCIDINA

6.5.1 CÉLULAS INCUBADAS CON NAC

A partir de los cambios en la importación de hierro que observamos, nos preguntamos si el regulador principal del ciclo del hierro, la proteína hepcidina, tendría una función en el control de la movilización neuronal en estados de exceso de hierro.

Es bien conocida la función de hepcidina hepática a nivel sistémico, disminuyendo la captación de hierro duodenal y su liberación desde los sitios de depósito (Ganz y Nemeth 2012). De esta forma disminuye los niveles de hierro en estados de exceso mediante la internalización y degradación del único exportador de hierro conocido Ferroportina. También se ha observado la producción de esta hormona a nivel de los macrófagos esplénicos (Liu et al. 2005) y adipocitos en obesidad severa (Bekri et al. 2006), sin embargo, su rol extrahepático no es del todo claro y se cree que podría tener regulaciones locales dependiendo de los diferentes órganos.

En nuestro laboratorio se observó en células pancreáticas y hepáticas que en exceso de hierro aumenta la expresión de prohepcidina (D'Anna y Roque, 2013; Giorgi y Roque, 2014), sin embargo, poco se conoce sobre su rol en neuronas. La presencia del propéptido de hepcidina en células de neuroblastoma humano que observamos en nuestro modelo celular de sobrecarga de hierro despeja cuestiones sobre el rol de hepcidina en neuronas, demostrando que es regulada por hierro.

En presencia de FAC la inmunomarcación intracelular de prohepcidina fue intensa respecto al control (Figura 19 B) y al pretratamiento con NAC lo que reflejaría una aumentada síntesis de hepcidina que podría contribuir a la acumulación de hierro neuronal.

Resultados

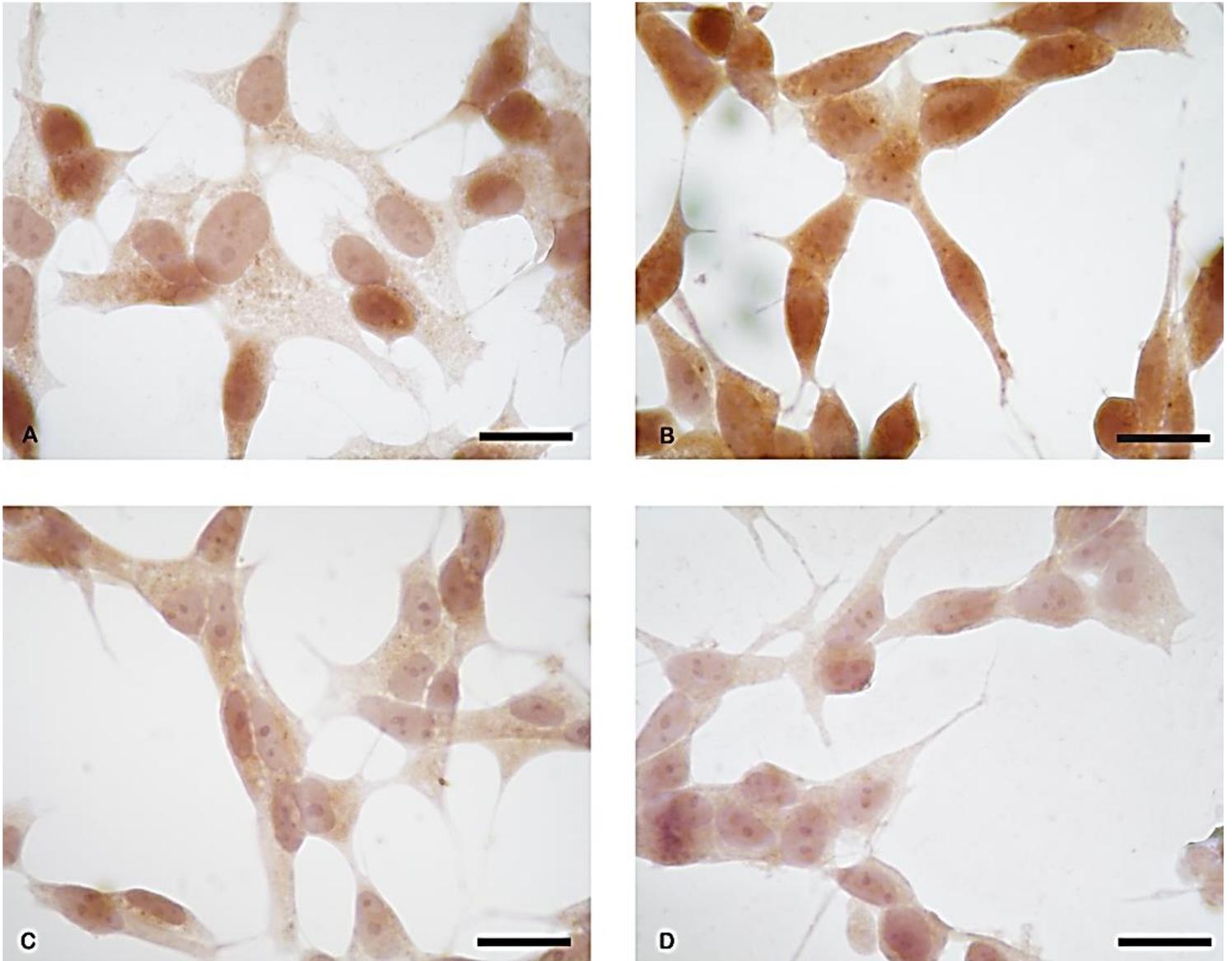


Figura 19. Inmunomarcación de prohepcidina en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M /72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con NAC 2Mm (C). Células SH-SY5Y pretratadas con NAC 2 Mm/ 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h. Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-prohepcidina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.5.2 CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

Una vez demostrado con nuestro Modelo de Sobrecarga de Hierro neuronal que hepcidina es regulada positivamente por hierro en neuronas evaluamos el efecto sobre la expresión del propéptido de hepcidina previo tratamiento con EPO.

No se observaron diferencias en la expresión de prohepcidina neuronal utilizando EPO como pretratamiento siendo su expresión similar a la de las células únicamente tratadas con FAC (Figura 20 B y D).

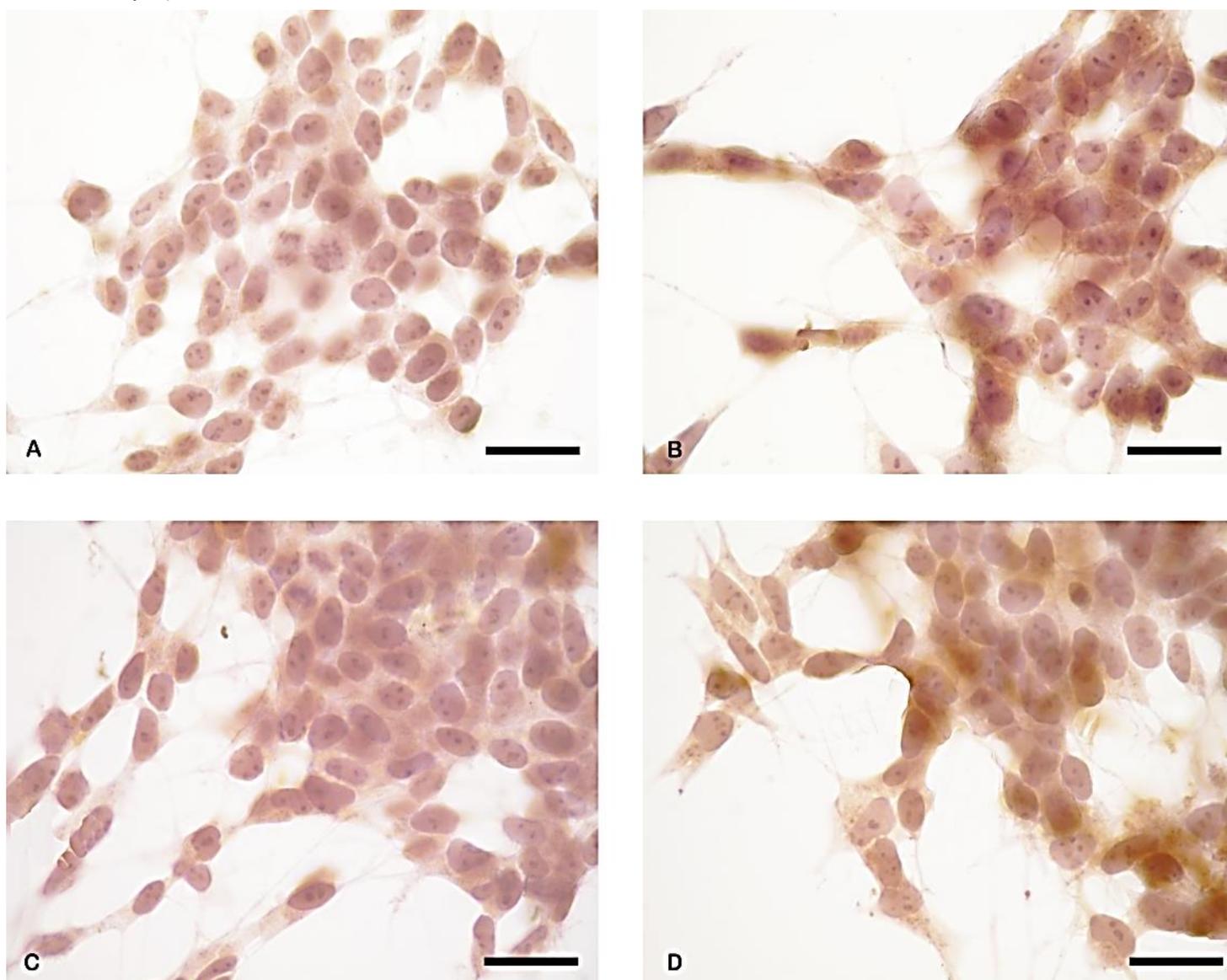


Figura 20. Inmunomarcación de prohepcidina en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30μM /72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30μM/72 h (D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-prohepcidina según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μm.

6.6 EVALUACIÓN DEL MECANISMO REGULADOR DE LA SÍNTESIS DE HEPCIDINA NEURONAL

Una vez que observamos que el exceso de hierro aumentó la expresión de prohepcidina sugiriendo un aumento de la síntesis de hepcidina, estudiamos el mecanismo regulador para la síntesis de hepcidina. Mediante ensayos de inmunofluorescencia de proteínas que participan en las vías que controlan la síntesis de este pro-péptido regulador, el RTf2 y HFE: evaluando la expresión y localización o colocalización del Receptor de Transferrina 2 (RTf2) y la proteína reguladora del hierro HFE.

La función del complejo RTf2-HFE es aún discutida, pero es conocido que ambas proteínas son necesarias para el sensado de la transferrina diférrica. La interacción de RTf2 y HFE podría ser necesaria para que el complejo HJV-BMP2-RBMP tipo II sea endocitado eficientemente proporcionando un vínculo entre la transferrina diférrica y la vía de señalización BMP-SMAD (Latour et al. 2016).

En nuestro modelo celular observamos que en condiciones basales estas proteínas se encontraban aisladas mientras que en presencia de exceso de hierro colocalizaban (Figura 21a H) lo que sugiere que se desencadenaría el mecanismo de transcripción del gen de la proteína hepcidina por la vía de señalización celular de las BMP-SMAD. No se observaron diferencias al pretratar a las células con EPO respecto al tratamiento únicamente con FAC (Figura 21a P).

Mediante la utilización del programa Image J se observó colocalización en presencia de exceso de hierro (Figura 21b B) (Pearson's R value (no threshold): 0.96 Pearson's R value (below threshold): 0.55 Pearson's R value (above threshold): 0.94) mientras que la coexpresión de proteínas fue baja en el control (Fig 21b A) (Pearson's R value (no threshold): 0.72 Pearson's R value (below threshold): -0.01 Pearson's R value (above threshold): 0.38).

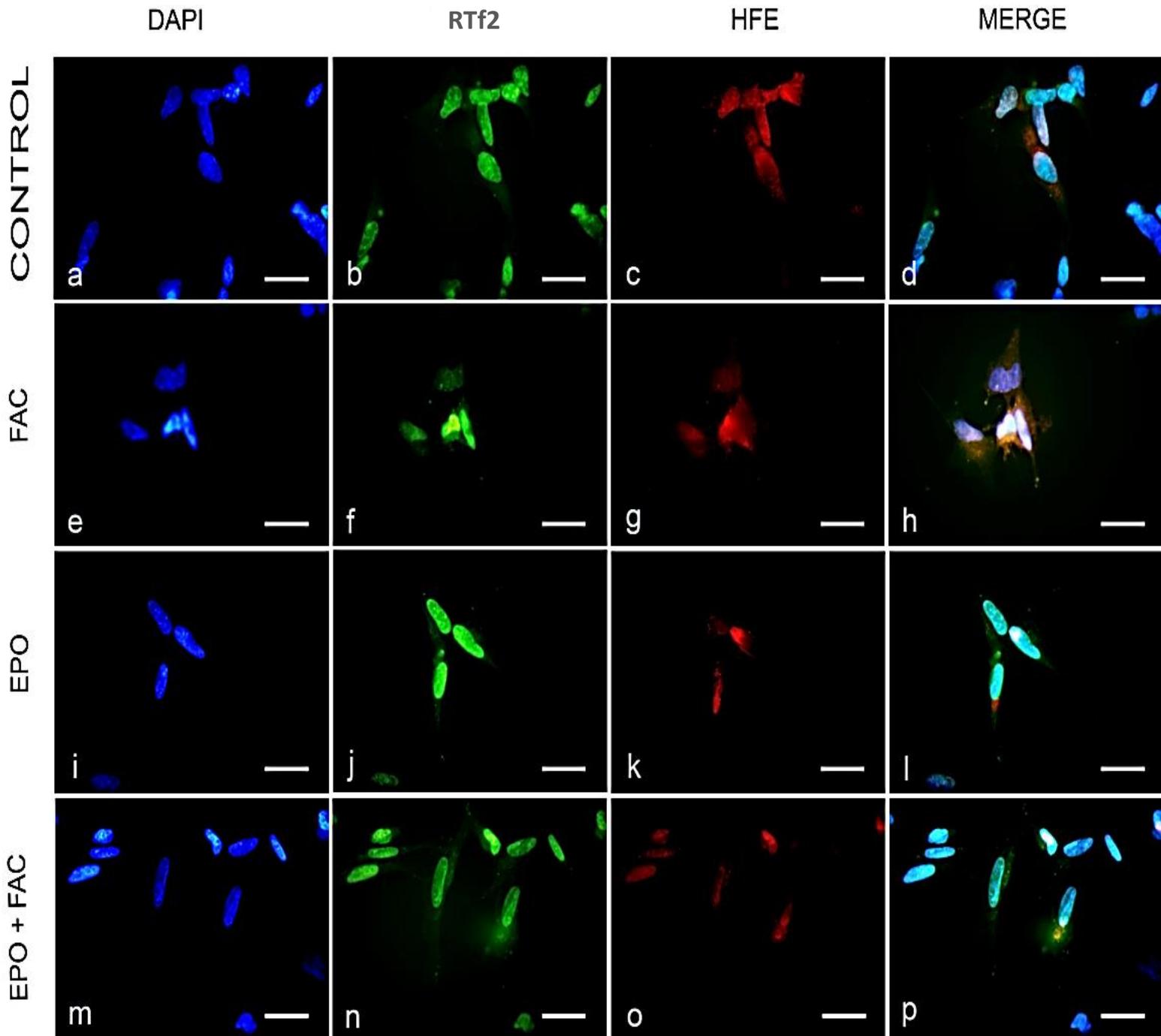


Figura 21 a). *Inmunofluorescencia para RTf2 y HFE en células de neuroblastoma humano.* Núcleos de grupo control marcación con DAPI (A). Expresión de RTf2 grupo control (B). Expresión de HFE grupo control (C). Merge grupo control (D). Núcleos de grupo sobrecarga de hierro (E). Expresión de RTf2 grupo FAC (F). Expresión de HFE grupo FAC (G). Merge grupo FAC (H). Núcleos grupo con eritropoyetina (I). Expresión de RTf2 grupo EPO (J). Expresión de HFE grupo EPO (K). Merge grupo EPO (L). Núcleos de células pretratadas con Eritropoyetina 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h (M). Expresión de RTf2 grupo EPO+FAC (N). Expresión de HFE grupo EPO+FAC (O). Merge grupo EPO+FAC (P). Las células se procesaron utilizando los anticuerpos primarios anti-RTf2 y anti-HFE según lo descrito en materiales y métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

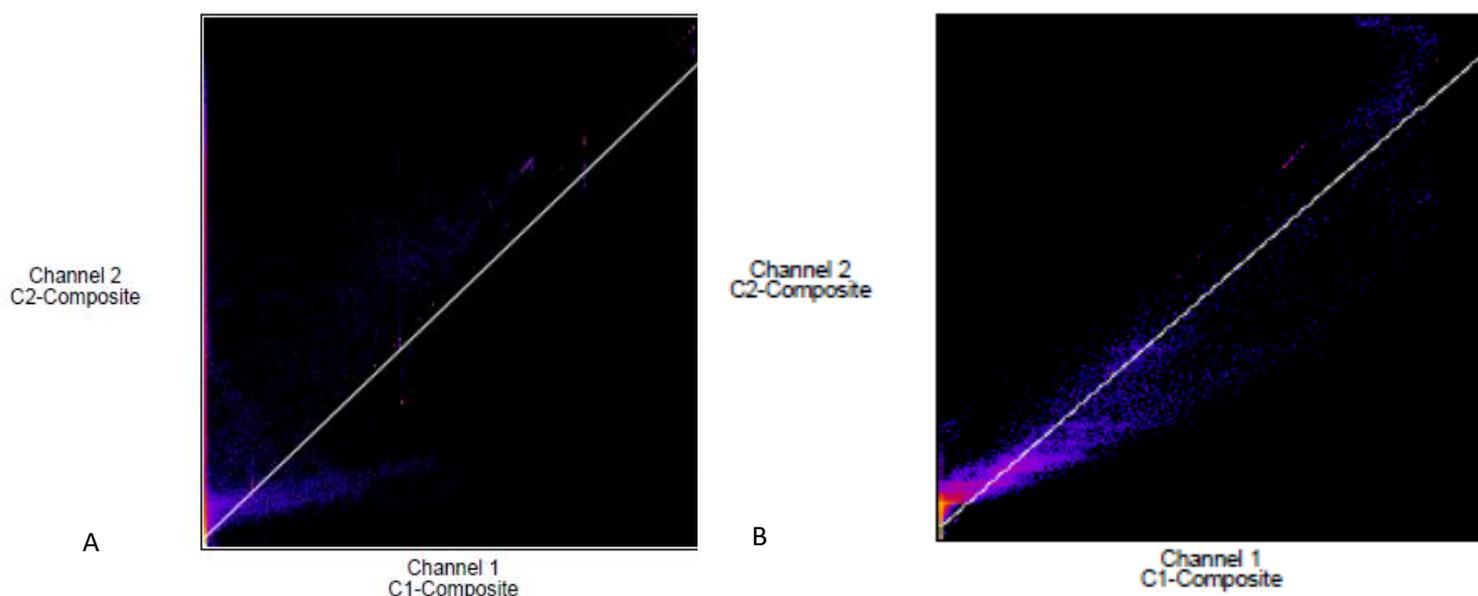


Figura 21 b). Análisis de colocalización de RTF2 y HFE en células de neuroblastoma humano. Image J.

(A) Grupo Control (B) Grupo FAC.

6.7 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA IMPORTADORA DEL GRUPO HEMO, HCP1

6.7.1. CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

El transportador HCP1 (heme carrier protein 1) es una proteína enterocítica de 9 dominios transmembrana, hidrofóbica de 446 aminoácidos que transporta moléculas desde el lumen del tracto digestivo. Se localiza en la membrana apical de los enterocitos, principalmente en duodeno, aunque también ha sido detectada en hígado y riñón.

Su expresión es regulada por mecanismos pre y post transcripcionales, asociándose ésta última a su movilización celular desde membrana a citoplasma (Przybyszewska y Żekanowska 2014).

Nuestro interés en estudiar la expresión del importador de hierro hemo HCP1 en el Modelo Celular de Sobrecarga de Hierro neuronal se basa en que alteraciones en el grupo hemo se han asociado a la acumulación de hierro neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Li et al. 2017).

En nuestro Modelo Celular el importador HCP1 se localizó en la membrana celular y no se observaron cambios en ninguna de las 4 condiciones evaluadas, indicando su rol en la captación de hierro hemo en condiciones basales (Figura 22). La expresión de HCP1 no sería regulado por FAC ni EPO.

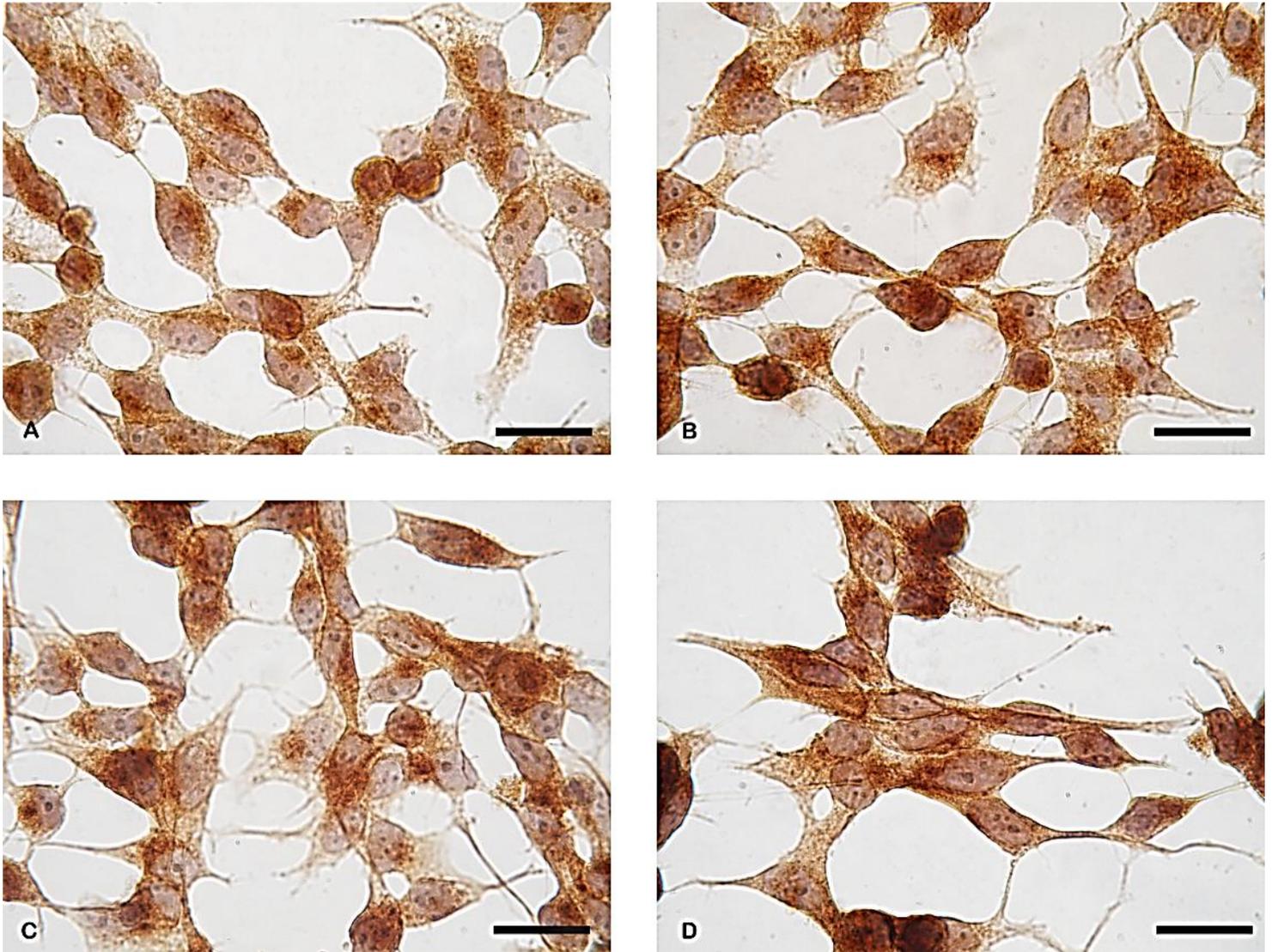


Figura 22. Inmunomarcación de HCP1 en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M /72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-HCP1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.8 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EXPORTADORA DEL GRUPO HEMO, FLVCR

6.8.1. CÉLULAS INCUBADAS CON EPO

Un exportador de hierro hemo, el receptor del virus de la leucemia felina subgrupo C (FLVCR) es un miembro de la familia de SLC49 de 4 genes parálogos. Se encuentra en la superficie celular y es esencial para la eritropoyesis y la homeostasis del hierro (Khan y Quigley 2013).

Resultados

Se ha identificado a FLVCR como el exportador principal de hemo en los mamíferos protegiendo a los progenitores eritroides de la toxicidad potencial del hierro durante la síntesis del grupo hemo (Quigley et al. 2004).

Decidimos estudiar la expresión de FLVCR en el modelo celular de exceso de hierro por sus funciones en la eritropoyesis (Quigley et al. 2004) y porque en pacientes con desórdenes neurodegenerativos se han observado mutaciones del gen SLC49A1 que codifica para FLVCR1.

En nuestro Modelo Celular el exportador de hemo FLVCR se observó en la membrana celular y en el citoplasma sin observarse cambios en ninguna de las 4 condiciones evaluadas indicando su rol en la exportación de hierro hemo en condiciones basales (Figura 23). La expresión de ésta proteína no sería regulado por hierro ni EPO, en este modelo celular.

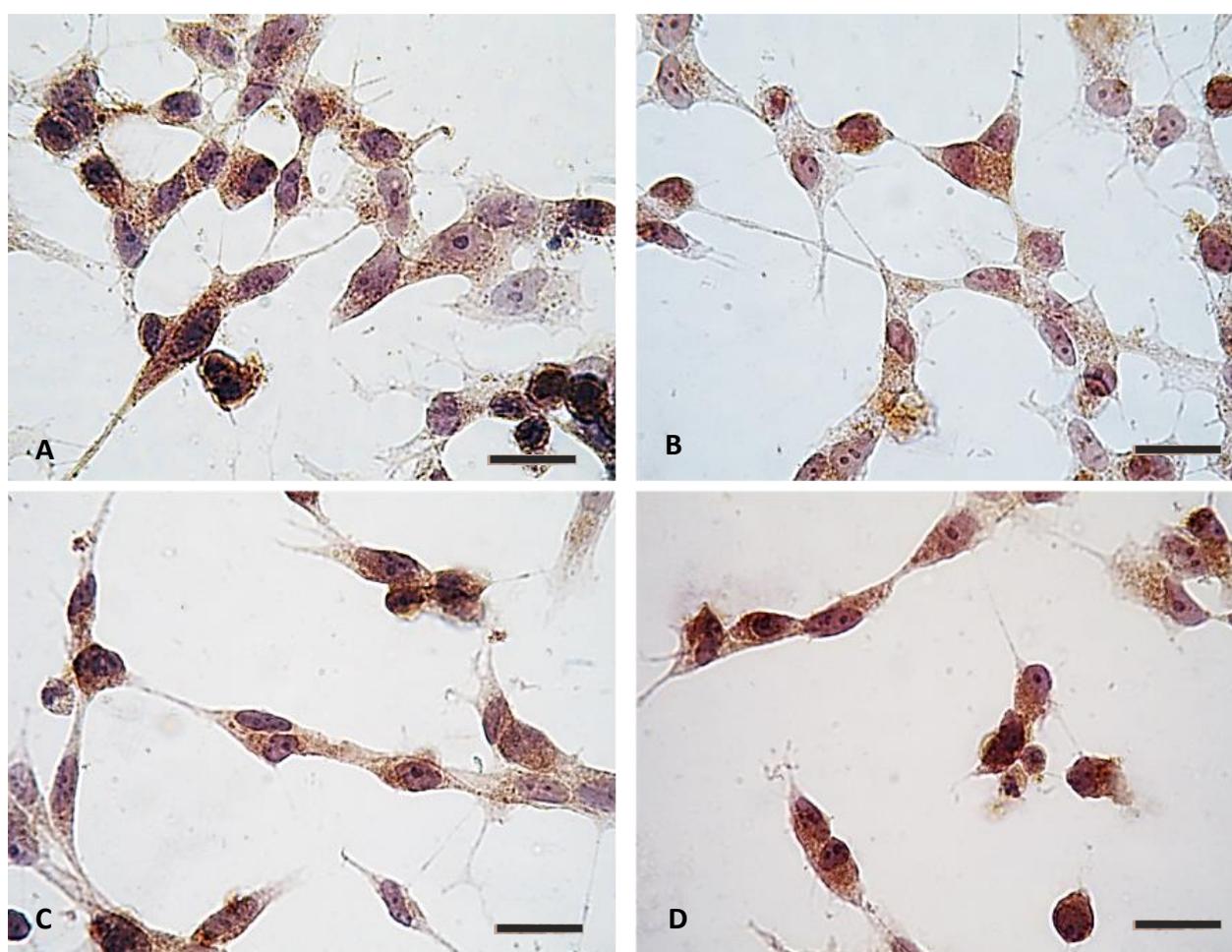


Figura 23. Inmunomarcación de FLVCR en células de neuroblastoma humano. Grupo control (A). Células SH-SY5Y tratadas con FAC 30 μ M /72 h (B). Células SH-SY5Y tratadas con EPO 50 UI/mL (C). Células SH-SY5Y pretratadas con EPO 50 UI/mL 12 h previas al tratamiento con FAC 30 μ M/72 h.(D). Las células se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-FLVCR según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

6.9 CONTROL NEGATIVO DE INMUNOMARCACION CELULAR

La incubación de células con PBS reemplazando al anticuerpo primario no mostró marcación en ninguna de las proteínas estudiadas (Figura 24).

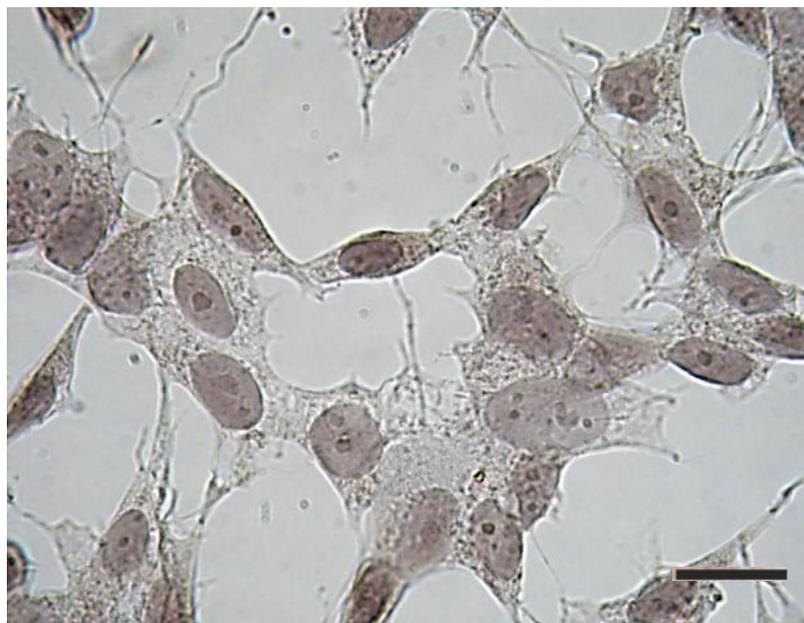


Figura 24. Control negativo celular. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y incubadas con PBS en lugar del anticuerpo primario. Las células se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

MODELO ANIMAL

7. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han propuesto que la acumulación de hierro en áreas específicas del cerebro conduce a la producción de estrés oxidativo. Siendo este efecto crítico en la patogenia y progresión en las enfermedades neurodegenerativas (von Bernhardt and Eugenin 2012; Nuñez et al. 2012).

Estudios de Hänninen et al. (2009) describieron que genes que codifican proteínas del ciclo del hierro como hepcidina, RTf1, RTf2 y HFE se expresan en cerebro en condiciones normales y su patrón de expresión se altera en presencia de tumores cerebrales sugiriendo que estos genes tendrían un rol en la homeostasis de hierro cerebral.

En este trabajo se inició el estudio de la sobrecarga de hierro en sistema nervioso con el objeto de clarificar aspectos de la expresión de proteínas clave del ciclo del hierro y la acumulación del biometal en diferentes regiones cerebrales.

8. IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES

Para identificar las distintas regiones cerebrales extraídas según se describió en Materiales y Métodos, se realizó la tinción de hematoxilina y eosina a cortes de cada sección. Posteriormente, se indicaron las regiones de interés en base a las coordenadas stereotáxicas de cerebro de ratón observadas al microscopio óptico y/o bajo lupa (Figuras 25,26 y 27).



Figura 25. Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de neocorteza, tálamo, hipotálamo e hipocampo. Los tejidos se procesaron para tinción de hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos. Observación con lupa.

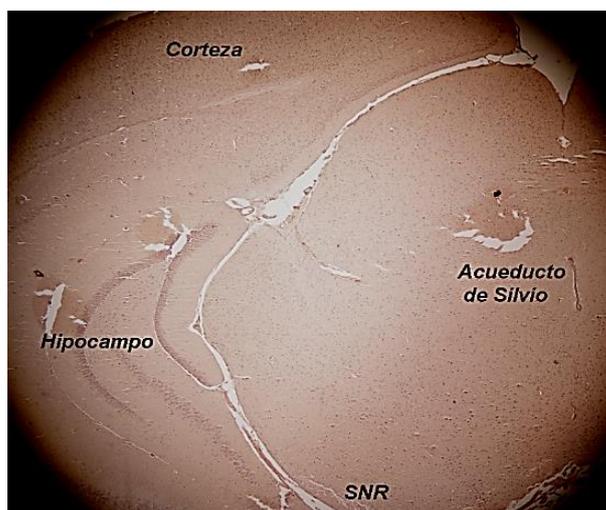


Figura 26. Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de corteza, hipocampo. Los tejidos se procesaron para tinción de hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos. Observación con lupa. Corte sagital

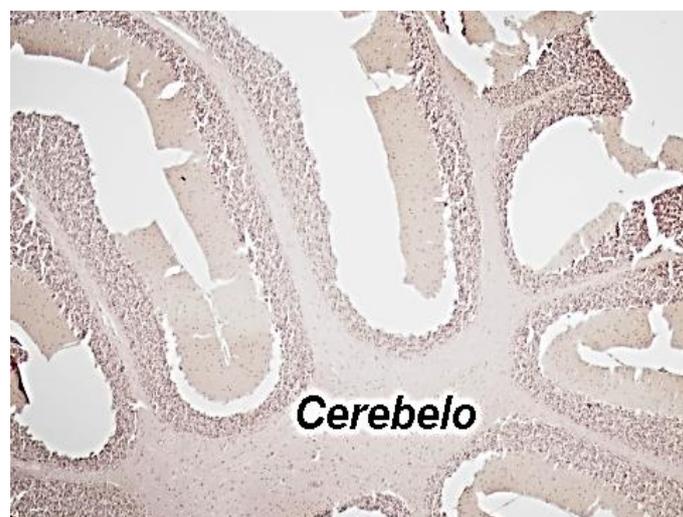


Figura 27. Hematoxilina y eosina de regiones cerebrales. Identificación de cerebelo. Los tejidos se procesaron para tinción de hematoxilina y eosina según lo descrito en Materiales y Métodos. Observación con lupa. Corte sagital

9. EVALUACIÓN DEL HIERRO CEREBRAL

9.1 CUANTIFICACIÓN DE HIERRO TISULAR EN LAS REGIONES CEREBRALES

Con el objetivo de evaluar en los grupos en estudio (Control, Sobrecarga de hierro, EPO y Sobrecarga de Hierro + EPO) la distribución de hierro en las distintas regiones cerebrales se cuantificó el hierro según lo descrito en Materiales y Métodos.

En el estriado de ratón se observó un aumento significativo de hierro en el grupo de Sobrecarga de Hierro (334,7 μmol de hierro/g de tejido) respecto al control (125,5 μmol de hierro/g de tejido) y al grupo EPO (151,08 μmol de hierro/g de tejido) (Figura 28). Mientras, que en ratones que recibieron hierro + EPO no se observaron diferencias significativas con el grupo de Sobrecarga de Hierro (257,6 μmol de hierro/g de tejido) (Figura 28).

La misma tendencia fue observada en cerebelo, en donde el grupo de Sobrecarga de Hierro mostró un aumento significativo (2124,4 μmol de hierro/g de tejido) respecto al Grupo Control (4,79 μmol de hierro/g de tejido) y al grupo EPO (14,1 μmol de hierro/g de tejido).

En el grupo de Sobrecarga de Hierro + EPO se observó una disminución no significativa (1664,8 μmol de hierro/g de tejido) respecto al grupo de Sobrecarga y además los Grupos Control y EPO presentaron muy bajo contenido de hierro (Figura 29).

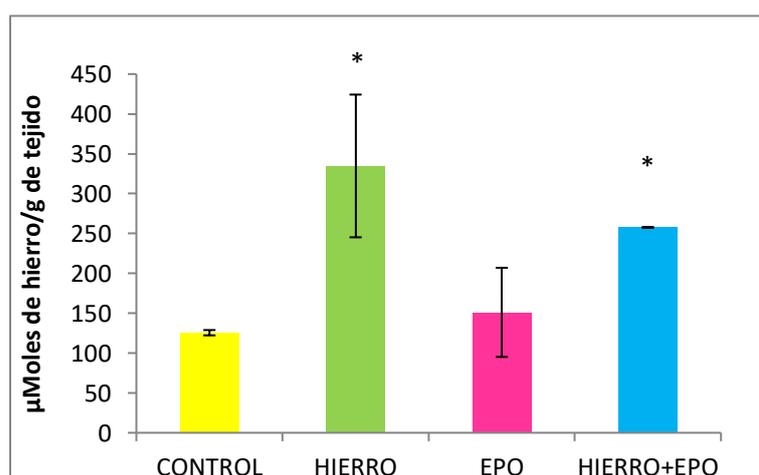


Figura 28. Cuantificación de hierro en estriado en el modelo animal de sobrecarga de hierro + EPO. Valores expresados en μMoles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$

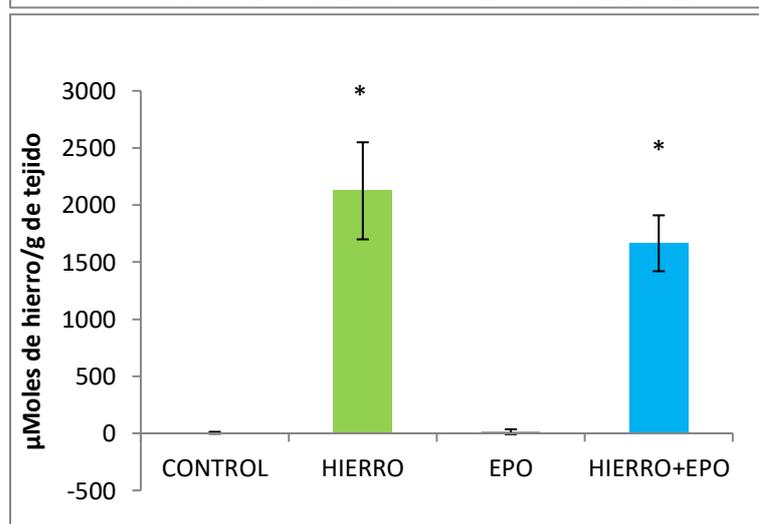


Figura 29. Cuantificación de hierro en cerebelo en el modelo animal de Sobrecarga de Hierro + EPO. Valores expresados en μMoles de hierro/g de tejido. * $p < 0,05$

9.2 ANÁLISIS CUALITATIVO DEL HIERRO TISULAR. OBSERVACIÓN DE HEMOSIDERINA

La acumulación de hierro en cerebelo, estriado e hipocampo se observó con ensayos cualitativos que mostraron el aumento de hemosiderina mediante la tinción de Perls modificada que fue más sensible que la tinción de Perls clásica dado que utiliza DAB (Materiales y Métodos).

Mediante esta tinción específica se pudo observar abundante hemosiderina en el Grupo de Sobrecarga de Hierro en áreas cerebrales como estriado (Figura 30 B), hipocampo (Figura 31 B), cerebelo (Figura 32 B) y médula espinal (Figura 33 B), mientras que en el Grupo Control no se identificó hemosiderina.

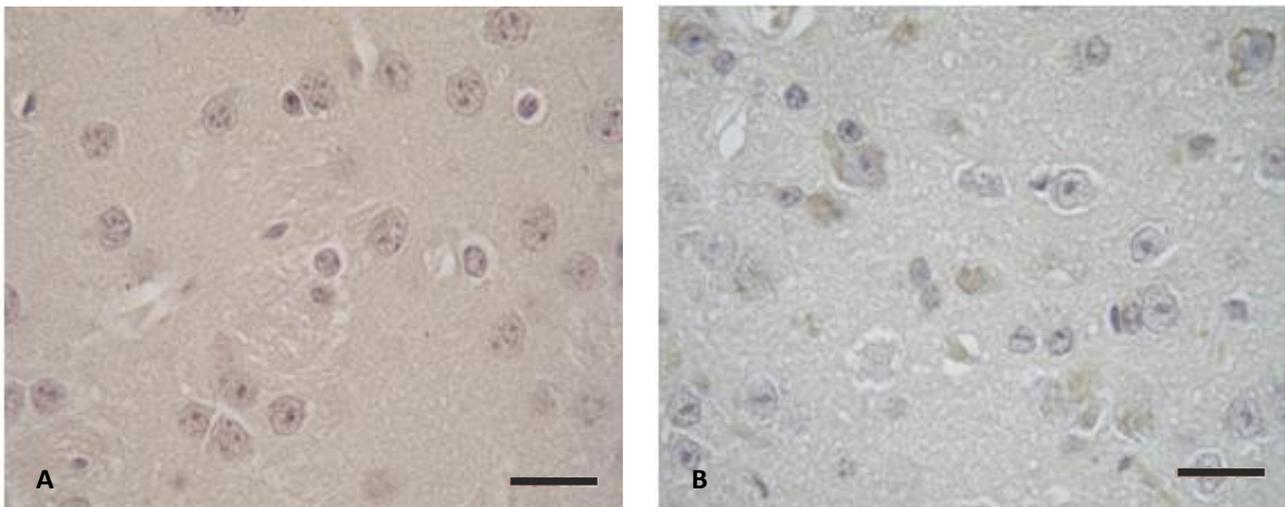


Figura 30. Hemosiderina en estriado. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para tinción de Perls modificada según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

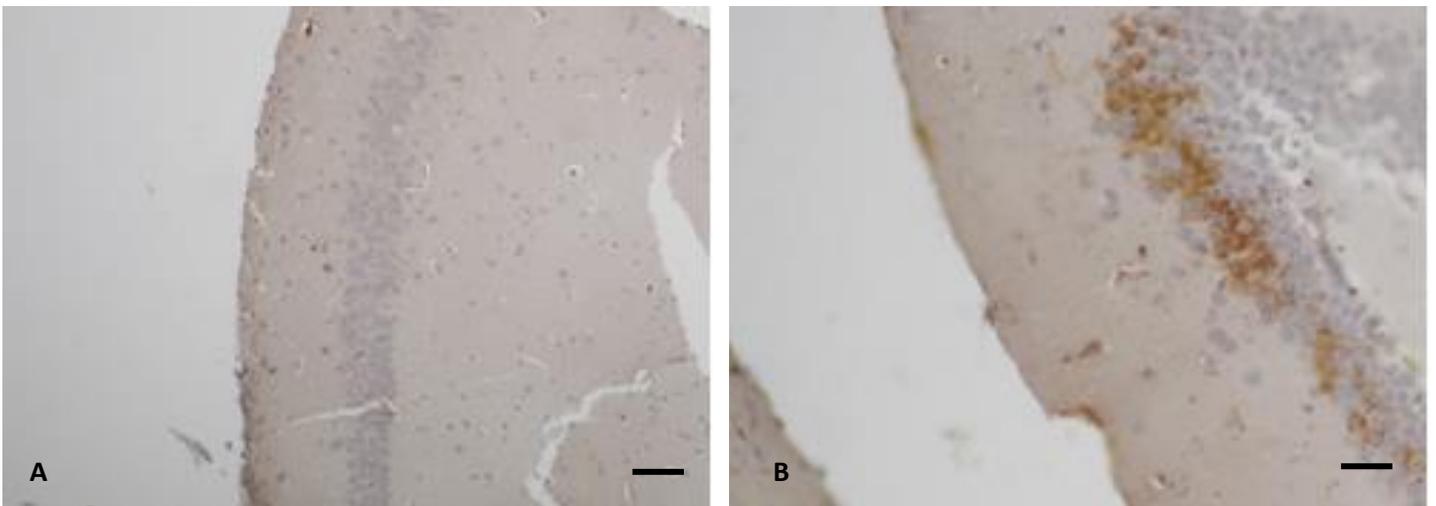


Figura 31. Hemosiderina en hipocampo. Grupo control (A). Grupo de sobrecarga de hierro (B). Los tejidos se procesaron para tinción de Perls modificada según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

Resultados

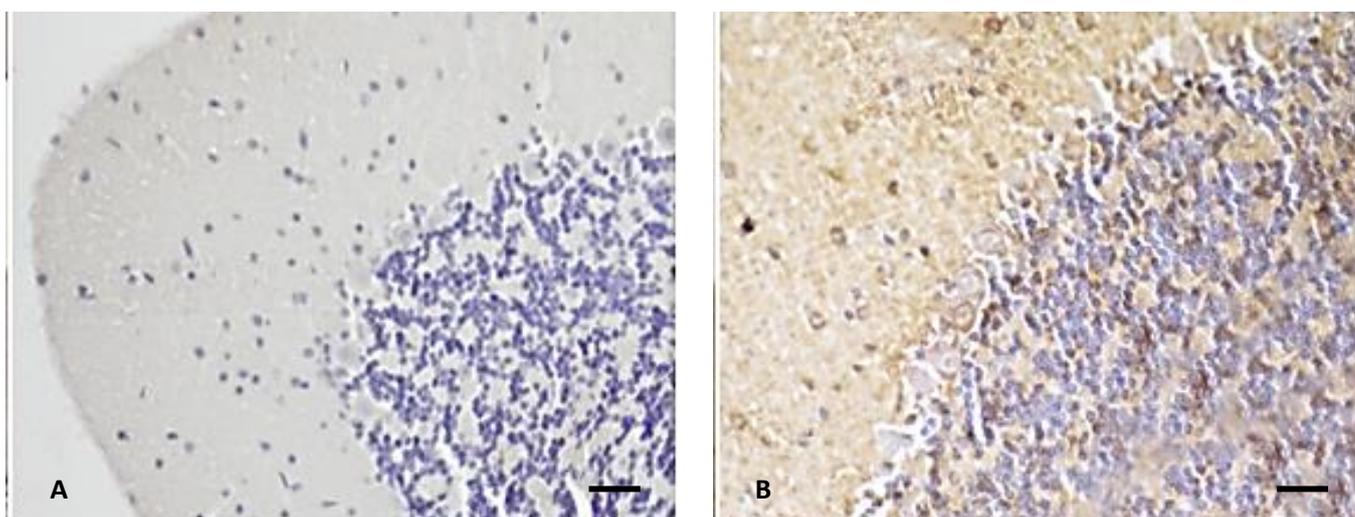


Figura 32. Hemosiderina en cerebelo. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para tinción de Perls modificada según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

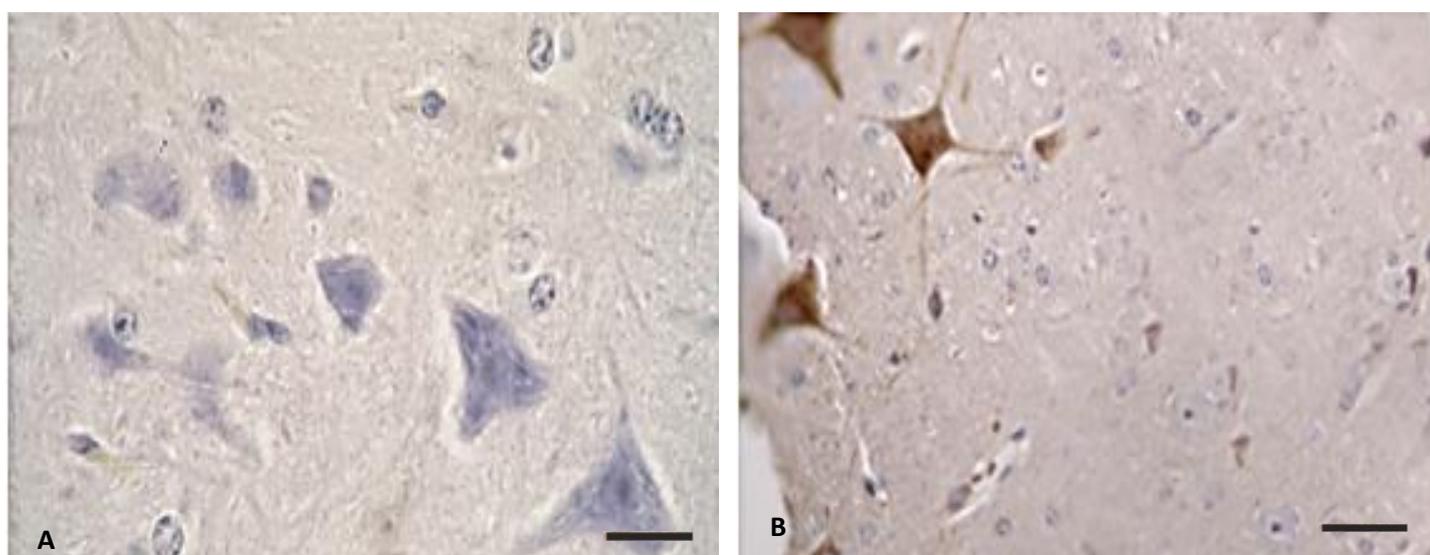


Figura 33. Hemosiderina en médula espinal. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para tinción de Perls modificada según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CLAVE DEL CICLO DEL HIERRO

10.1 EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES DMT1

Con el objetivo de identificar si la captación de hierro es mediada por DMT1 se realizó una inmunohistoquímica incubando las diferentes regiones del sistema nervioso con el anticuerpo anti-DMT1.

Se observó una disminución de la expresión de DMT1 en cuerpo estriado (Figura 34 B), hipocampo (Figura 35 B) y cerebelo (Figura 36 B) en Sobrecarga de Hierro respecto al Control sugiriendo que este importador no sería el responsable de la captación de hierro en estados de exceso.

Resultados

De manera similar a las células de neuroblastoma tratadas con FAC pudimos determinar que DMT1 no participaría en la captación y acumulación de hierro observado en las regiones cerebrales estudiadas.

En efecto en hipocampo, cerebelo y estriado disminuye la expresión de DMT1 en presencia de hierro. Este mecanismo se podría explicar en base a nuestros resultados previos en donde mostramos una regulación negativa de hepcidina sobre DMT1 en el Modelo Celular de Sobrecarga de Hierro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 19 B). Por lo tanto, podríamos explicar la disminución de la expresión de DMT1 en hipocampo, cerebelo y estriado mediante un aumento de la expresión de hepcidina o mediante la regulación IRE-IRP de DMT1.

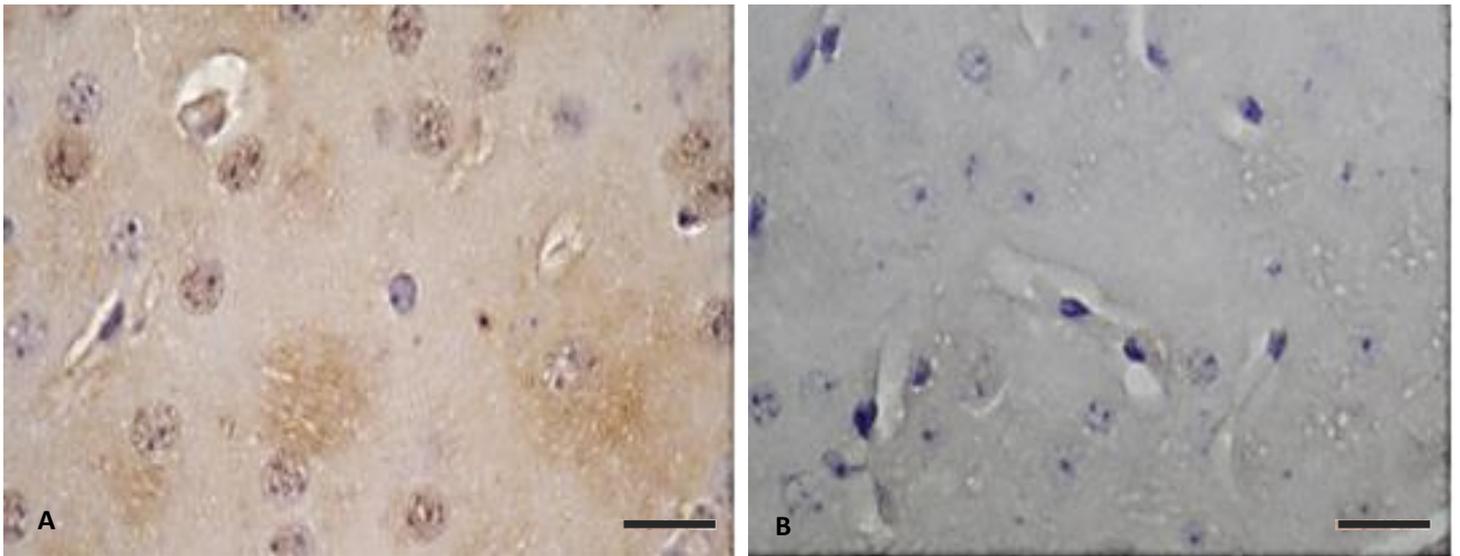


Figura 34. Expresión de DMT1 en estriado. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-DMT1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

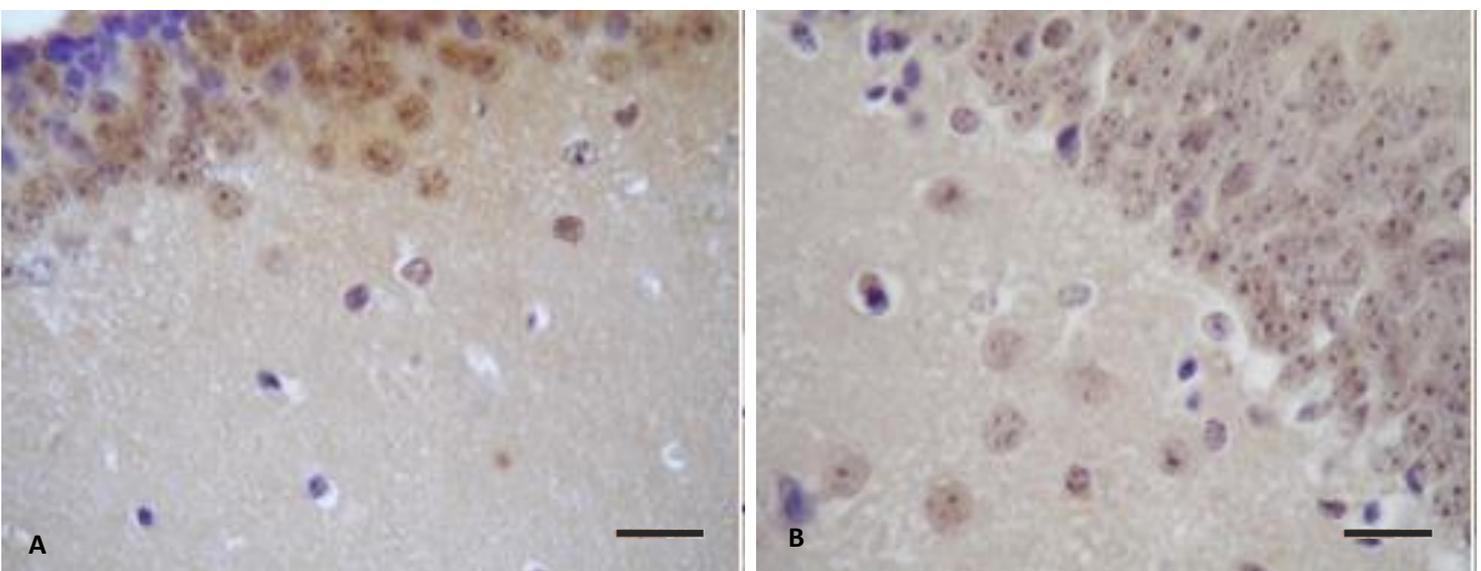


Figura 35. Expresión de DMT1 en hipocampo. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-DMT1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 µm.

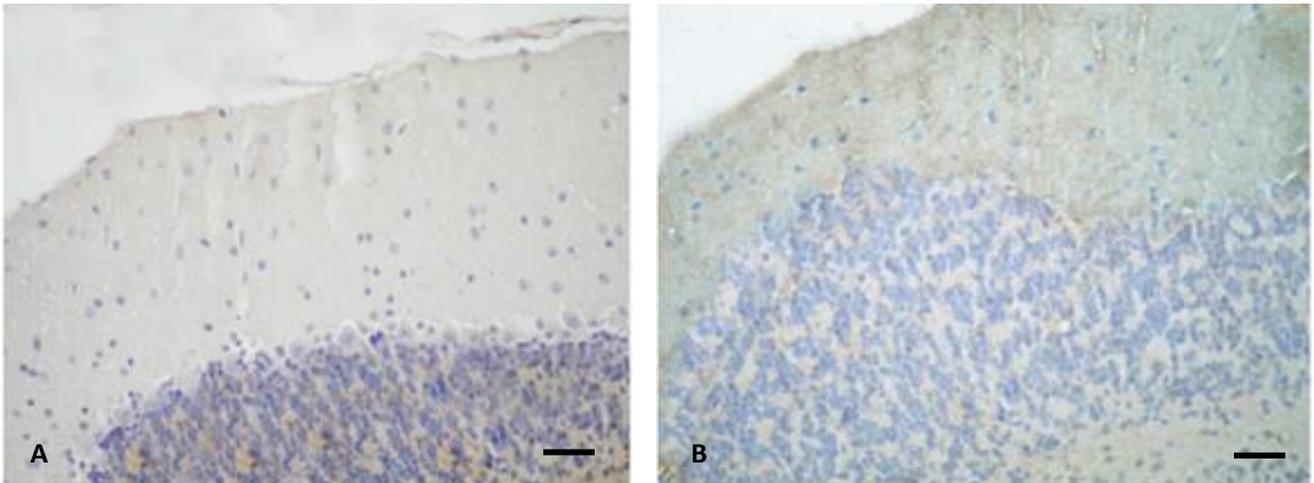


Figura 36. Expresión de DMT1 en cerebelo. Grupo control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron utilizando anticuerpo primario anti-DMT1 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

10.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL TRANSPORTADOR ZIP14

Posteriormente comparamos la expresión del importador ZIP14 en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro con el Modelo Celular. Para ello evaluamos en el modelo in vivo si la expresión de ZIP14 mostraba una intensa marcación similar a la observada en el Modelo Celular en presencia de hierro.

Nuestros resultados mostraron una intensa marcación en las diferentes regiones estudiadas respecto al Grupo Control (Figuras 37 B, 38 B, 39 B y 40 B). Nuestros resultados sugieren que ZIP14 podría cumplir una función relevante en la sobrecarga de hierro en tejido nervioso.

En el cerebelo de los ratones en el Grupo de Sobrecarga de Hierro, ZIP14 se expresó intensamente en las células granulares y en la capa molecular (Figura 39 B). Este cambio sugiere una mayor captación de hierro a través de la regulación de ZIP14.

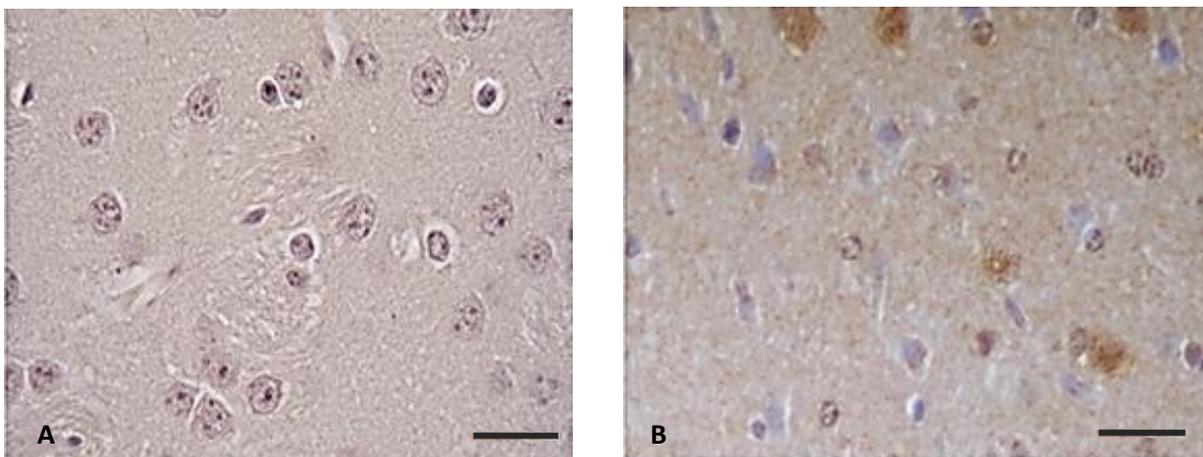


Figura 37. Expresión de ZIP14 en estriado. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

Resultados

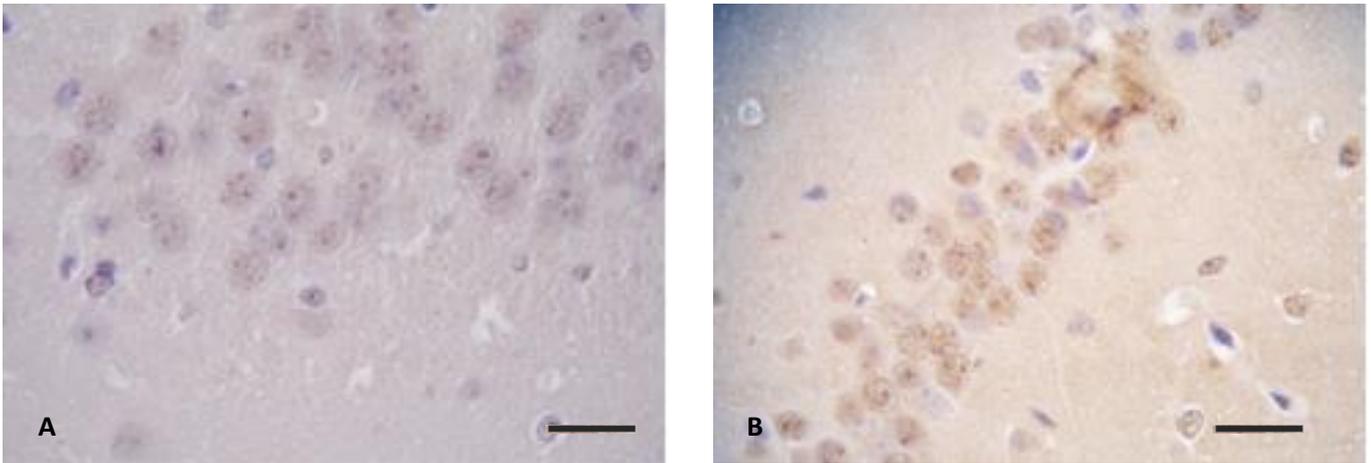


Figura 38. Expresión de ZIP14 en hipocampo. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

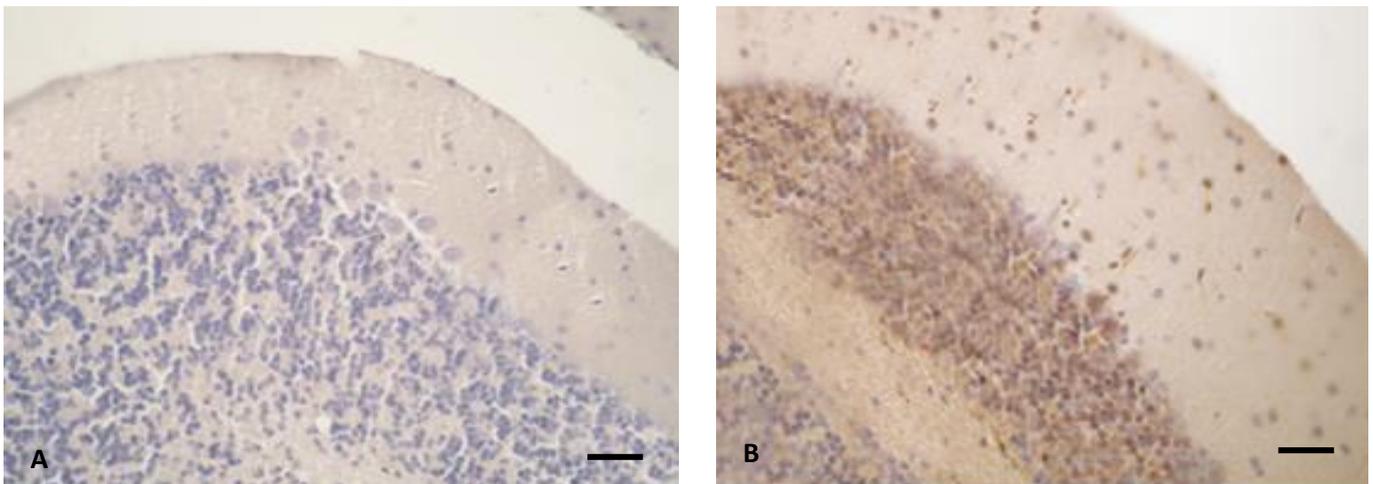


Figura 39. Expresión de ZIP14 en cerebelo. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

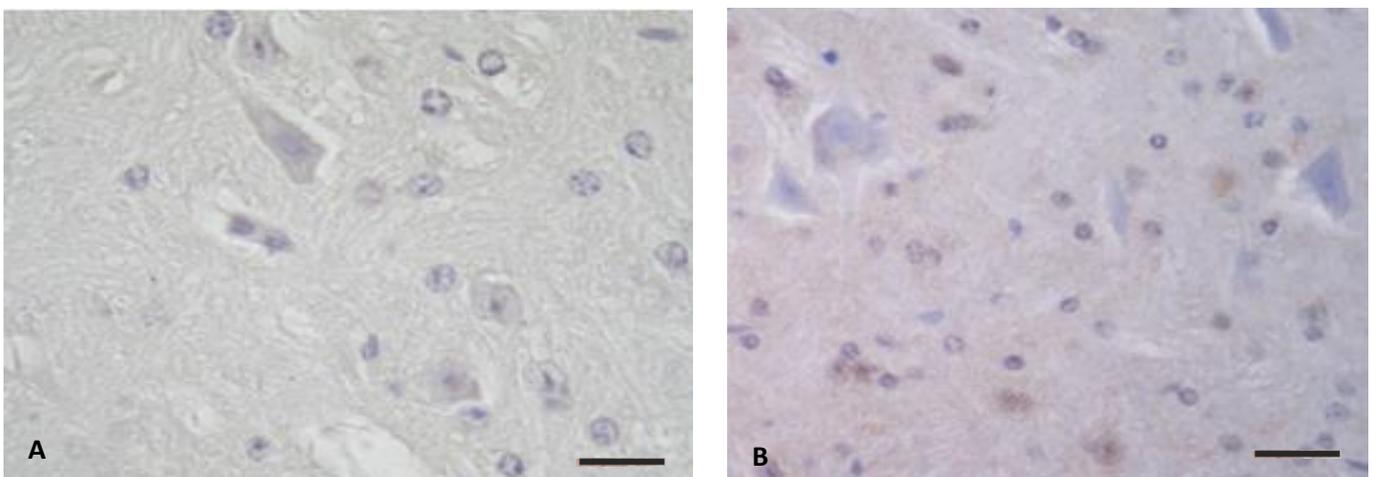


Figura 40. Expresión de ZIP14 en médula espinal. Grupo Control (A). Grupo Sobrecarga de Hierro (B). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica utilizando anticuerpo primario anti-ZIP14 según lo descrito en Materiales y Métodos (n=3/grupo). La barra representa 20 μ m.

Resultados

10.3 CONTROLES NEGATIVOS DE INMUNOMARCACION

La incubación de las diferentes regiones estudiadas, estriado (Figura 41), hipocampo (Figura 42), cerebelo (Figura 43) y médula espinal (Figura 44) con PBS reemplazando al anticuerpo primario no mostró marcación en ninguna de las proteínas evaluadas.

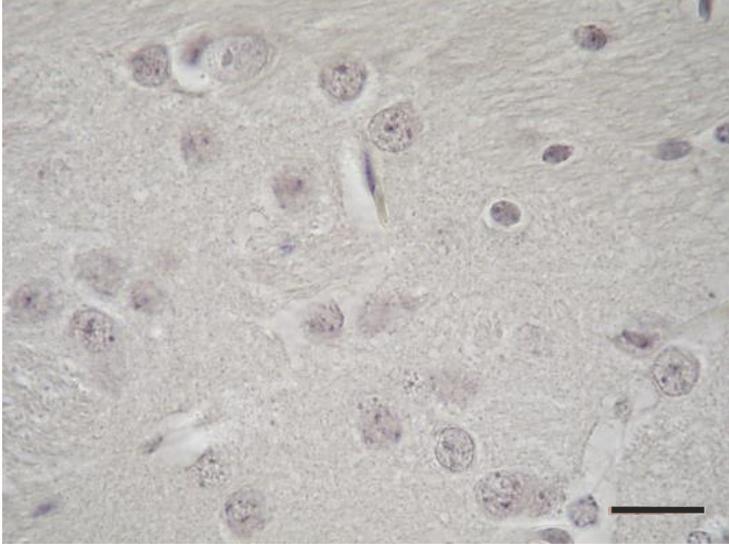


Figura 41. Control negativo estriado. Sección de tejido incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos células se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .



Figura 42. Control negativo hipocampo. Sección de tejido incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos células se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

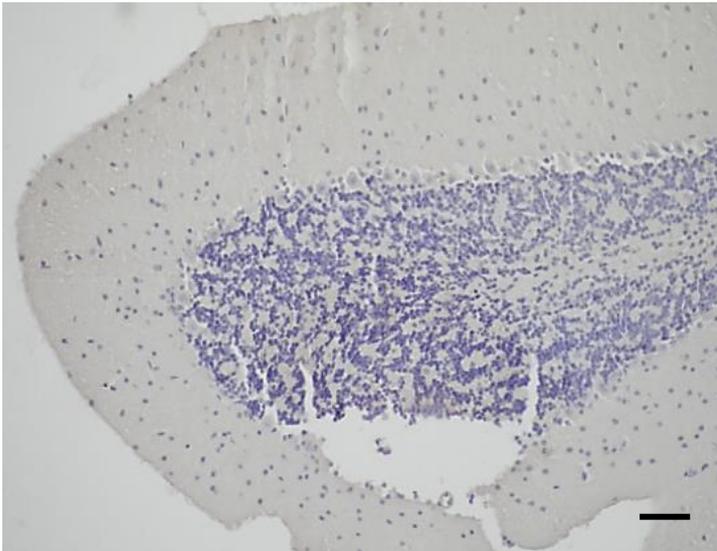


Figura 43. Control negativo cerebelo. Sección de tejido incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos células se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

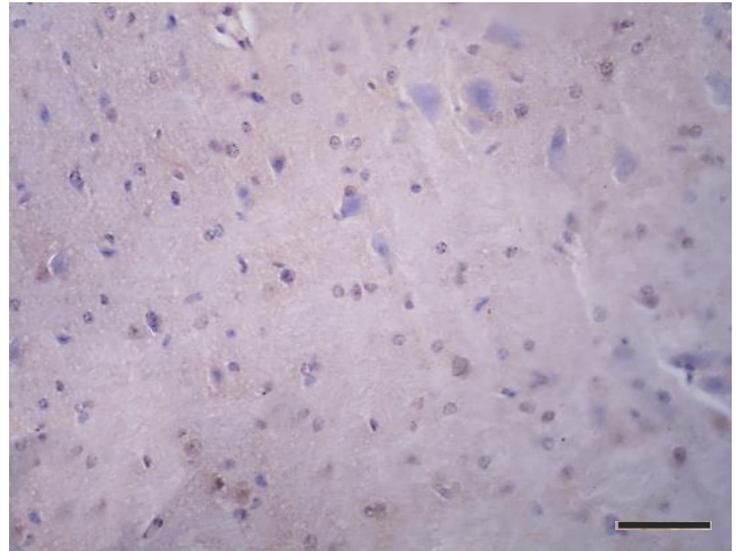


Figura 44. Control negativo médula espinal. Sección de tejido incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos células se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

1. MODELO CELULAR

1.1 VIABILIDAD CELULAR

En este trabajo, demostramos la mayor captación de hierro del medio de cultivo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y incubadas con FAC 30 μ M/72hs en concordancia con resultados de Salvador y Oteiza (2011) quienes observaron muerte celular al utilizar un modelo in vitro de células de neuroblastoma IMR-32 incubadas con FAC. Asimismo, Rakshit et al. (2019) demostraron que FAC induce muerte neuronal en células SH-SY5Y en función de la dosis utilizada (2,5 y 5 mM/48 h).

Numerosos estudios relacionan a las enfermedades neurodegenerativas con la dishomeostasis del hierro (Altamura y Muckenthaler 2009; Zecca et al. 2001, Aguirre et al. 2007).

Nuestros estudios reportan que la desregulación del ciclo del hierro induce la muerte neuronal de manera dosis y tiempo dependiente. Es ampliamente conocido que el hierro es un agente oxidante altamente tóxico cuando se encuentra en exceso dado que induce estrés oxidativo porque cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno mediante la reacción de Fenton (Wang, 2011).

Con el objetivo de evaluar la participación de especies reactivas de oxígeno en la muerte celular utilizamos un antioxidante como pretratamiento. El agente reductor N-acetil cisteína (NAC) es un dador de grupos sulfhidrilo e interviene en la formación de glutatión y la reducción de las especies reactivas del oxígeno.

De esta manera demostramos que la muerte celular se debe a estrés oxidativo. Esta hipótesis es sustentada por un estudio de Rakshit et al. (2019) que demuestra que el hierro induce la generación intracelular de ROS en células de neuroblastoma humano.

En nuestros ensayos determinamos que el estrés oxidativo aumenta la vulnerabilidad de las células neuronales al incubarlas con un agente oxidante, el peróxido de hidrógeno. Esta interrelación detectada entre el estrés oxidativo y la viabilidad celular fue descrita por otros autores que observaron que la presencia de altas concentraciones de hierro aumenta la susceptibilidad de las células neuronales al estrés oxidativo mediante la producción de ROS en un modelo de SH-SY5Y incubadas con FeCl₃ (Bautista et al. 2015).

Nuestros estudios en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se continuaron con el análisis del efecto de la eritropoyetina como pretratamiento. La eritropoyetina es conocida por su acción hematopoyética estimulando la proliferación, diferenciación y supervivencia de los precursores

eritroides (Fandrey, 2004). A esta conocida acción de EPO se le suma su capacidad citoprotectora observada en diversos tipos celulares como neuronas, células pancreáticas y pulmonares entre otras (Pregi et al. 2006; Wenker et al. 2006; Choi et al. 2010; Hamdi et al. 2009; Bany-Mohammed et al. 1996).

En el presente trabajo demostramos que EPO es capaz de prevenir la acción tóxica del hierro sobre las células de neuroblastoma cuando se utiliza como pretratamiento 12 h previas a la incubación con FAC.

En concordancia con nuestros resultados, otros autores han visualizado esta función no-hematopoyética de la citoquina cuando las células SH-SY5Y son tratadas con distintos inductores de apoptosis como la staurosporina, TNF- α e hipoxia (Pregi et al. 2006, Wenker et al. 2013).

Una vez demostrado el efecto protector de NAC y EPO como pretratamientos celulares decidimos evaluar si dicho mecanismo era mediado o no por las proteínas clave del ciclo del hierro. De esta forma nuestro Modelo Celular nos permitió clarificar dudas sobre los efectos del exceso de hierro en el metabolismo del hierro neuronal, comprendiendo los mecanismos que participan en su captación, movilización, y acumulación celular.

1.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

1.2.1 *Importador de hierro ZIP14*

Un aspecto relevante de nuestro estudio es que demostramos la localización citoplasmática de ZIP14 en neuronas en condiciones basales sugiriendo que este importador participaría en la movilización intracelular del biometal. Esta localización fue también descrita en cultivo primario de neuronas de hipocampo (Ji y Kosman 2015).

Pelizzoni et al. (2011-2012) han demostrado la captación neuronal de NTBI mediante el transportador ZIP14. Se conoce la función del transportador ZIP14 en la captación de hierro NTBI cuando se localiza en membrana celular y que su expresión aumenta en condiciones fisiopatológicas de sobrecarga de hierro (Liuzzi et al. 2006).

Por otra parte, estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelaron la expresión citosólica de ZIP14 en células bronquiales que favorecería la movilización intracelular del hierro TBI en estado de sobrecarga (Giorgi, D'Anna y Roque, 2015).

Esta función intracelular de ZIP14 también fue sugerida en células acinares pancreáticas en ratas alimentadas con una dieta enriquecida en hierro (Nam et al. 2013).

En nuestro Modelo Celular, en presencia de exceso de hierro la aumentada expresión del importador ZIP14 refleja una mayor captación de hierro celular que aumentaría la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta hipótesis fue demostrada por nuestros ensayos con el antioxidante NAC que mostraron que la expresión del importador ZIP14 vuelve a ser similar al control cuando las células se pretrataron con NAC.

El ARNm de ZIP14 no posee elementos IRE por lo tanto, es poco probable que sea regulado por el sistema IRE-IRP. Si bien no se conocen con precisión los eventos celulares que regulan post-transcripcionalmente a ZIP14, Nam et al. (2013) sugirieron que este control podría incluir la inhibición de la traducción, la represión de la traducción por micro ARN y la regulación de la localización de su ARNm.

1.2.2 Importador de hierro RTf1

En 1996 Moos describió la captación neuronal de hierro unido a transferrina mediada por el receptor de transferrina 1 (RTf1) como un mecanismo celular de incorporación de hierro.

En nuestro Modelo Celular reportamos la expresión del transportador en condiciones basales localizado en la membrana celular de las células SH-SY5Y. Este hallazgo indicaría su participación en la captación celular de hierro TBI.

La localización de RTf1 en membrana fue previamente observada por Siddapa et al. (2002) en neuronas de rata en condiciones de adecuado hierro.

En nuestro Modelo Celular en condiciones de exceso del biometal observamos de manera novedosa un cambio de localización de RTf1, encontrándose predominantemente en el interior celular.

Este cambio de localización que demostramos por primera vez en neuronas podría reflejar su participación en la captación de hierro TBI desde el medio extracelular mediante la unión RTf1-transferrina y su posterior endocitosis e internalización.

Concluimos que estos dos transportadores, ZIP14 y RTf1, serían los responsables de la captación celular de hierro y su posterior acumulación en ferritina en el interior celular conduciendo a la muerte neuronal.

1.2.3 Importador de hierro DMT1

DMT1 es un importador clave del ciclo del hierro que participa en la captación de hierro ferroso en varios tipos celulares.

En nuestro laboratorio se ha estudiado su participación en la captación de hierro en células pancreáticas y pulmonares en condiciones basales y en estados de sobrecarga de hierro (Giorgi, D'Anna y Roque 2015, Giorgi, D'Anna y Roque 2016).

En neuronas en condiciones basales, el transportador DMT1 es un componente relevante del sistema de transporte de hierro cerebral (Burdo et al 1999). Nuestros resultados demuestran que en presencia de hierro DMT1 no tendría un rol relevante en la captación de hierro celular.

Sin embargo, debemos destacar que este resultado nos conduce a la hipótesis de que las células de neuroblastoma humano desarrollan un mecanismo protector frente al hierro en exceso disminuyendo la expresión de DMT1 para disminuir la captación de hierro celular.

En este contexto, los estudios de Aguirre et al. (2005) en coincidencia con nuestros resultados demostraron que la disminución de la expresión de DMT1 frente al exceso de hierro en células SH-SY5Y tratadas con FeCl_3 era el mecanismo responsable de bloquear la captación de hierro en la población de neuronas que sobreviven.

La disminución de la expresión del importador DMT1 puede explicarse mediante la regulación de la isoforma de DMT1 IRE que en exceso de hierro disminuye su traducción al no poder unirse al segmento IRP1 o mediante una regulación negativa mediada por el aumento de hepcidina.

Podemos concluir que ZIP14 y RTf1 en exceso de hierro serían los importadores que participan en la captación de hierro neuronal que producen la sobrecarga de hierro con posterior muerte neuronal. Tanto ZIP14 como RTf1 tendrían un rol prevalente sobre el importador DMT1 que no sería el responsable de la captación de hierro.

1.2.4 Proteína de depósito de hierro L-ferritina

El hierro celular se almacena en la proteína de depósito denominada ferritina. Existen dos cadenas la H (High) y la L (Light). La ferritina H contiene una ferroxidasa central que es capaz de convertir los iones de hierro ferroso libres en hierro férrico evitando la reacción de Fenton celular. En cambio, L-ferritina tiene un rol en la nucleación y mineralización del hierro (Jin et al. 2019).

Las dos isoformas de ferritina se expresan en diferentes órganos y en distintas patologías. L-ferritina se encuentra principalmente en bazo e hígado y H-ferritina en corazón y riñón (Torti y Torti 2002).

En nuestros estudios, demostramos el aumento en los depósitos de hierro como L y H ferritina mediante las técnicas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, que reflejarían la alta captación de hierro celular mediada por ZIP14 y RTf1.

Nuestros resultados indican que las neuronas son capaces de almacenar hierro al igual que las células hepáticas y duodenales como mecanismo de protección frente a la toxicidad del biometal en estados de exceso de hierro (D'Anna, Giorgi y Roque 2013, Giorgi, D'Anna y Roque 2015).

La elevada expresión de ferritina en Sobrecarga de Hierro podría explicarse por la regulación post-transcripcional de su ARNm. Esta regulación de ferritina es mediada por la unión de IRPs al segmento IRE localizado en el extremo 5' de su ARNm (Harrison & Arosio, 1996).

La inactivación de IRPs por el exceso de hierro aumenta la expresión de ferritina debido a que IRP inactiva no se une a IRE, por lo que no bloquea la traducción de esta proteína de depósito (Harrison & Arosio, 1996).

1.2.5 Proteína reguladora hepcidina

Hepcidina es el regulador central de la homeostasis del hierro sistémico, que interconecta las necesidades de hierro de los distintos tejidos (Ganz & Nemeth, 2006). Si bien el hígado es el principal órgano productor de hepcidina, se ha caracterizado la síntesis de este péptido en el tejido pancreático, pulmonar, renal y nervioso (Kulaksiz et al. 2005; Kulaksiz et al. 2008; Wang et al. 2008; Frazier et al. 2011). Valore y Ganz (2008) demostraron una asociación directa entre el propéptido de hepcidina y los niveles de hepcidina en células de hepatoma.

En nuestro estudio celular evaluamos los niveles de prohepcidina. El aumento de su expresión en presencia de hierro sugeriría un aumento en la síntesis de la proteína hepcidina.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión de prohepcidina aumenta en células hepáticas y pancreáticas en respuesta al exceso de hierro (D'Anna y Roque, 2013; Giorgi y Roque, 2014). De manera novedosa nuestros resultados actuales indican que hepcidina es regulada por hierro también en neuronas.

El aumento de la expresión de hepcidina podría sugerir una regulación negativa por el eje hepcidina-ferroportina y una menor exportación de hierro celular mediante este transportador. La conocida acción de hepcidina sobre el único exportador de hierro Ferroportina (FPN) internalizándolo y degradándolo, contribuiría a la acumulación intracelular de hierro y la muerte neuronal. Du et al. (2015) han reportado recientemente el aumento del ARNm de hepcidina inducido por hierro en diferentes regiones cerebrales de rata. En contraposición con nuestra hipótesis Helgudottir et al. (2018) reportaron un aumento del ARNm de FPN en células PC12 tratadas con FAC 30 mM sugiriendo una mayor liberación del biometal.

El ARNm de ferroportina posee un segmento IRE en la region 5'UTR, que media la reducción de la transcripción de ferroportina cuando la concentración intracelular de hierro es baja. La regulación post transcripcional de FPN es modulada por hepcidina (Helgudottir et al. 2018).

1.2.6 Mecanismo regulatorio de síntesis de hepcidina

Posteriormente decidimos investigar el mecanismo involucrado en la regulación de síntesis de hepcidina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en respuesta al hierro. Nuestros estudios clarifican el mecanismo regulatorio de la síntesis de la proteína hepcidina, demostrando que el exceso de hierro induce su expresión mediante una cascada de señalización que involucra a RTf2 y HFE y la subsiguiente vía de las BMP. Por primera vez mediante este trabajo demostramos que el mecanismo regulatorio de la síntesis de hepcidina neuronal mediado por hierro es similar al observado en tejido hepático.

En hígado se ha observado que los elevados niveles de transferrina diférrica inducen la interacción del complejo hierro-transferrina con el receptor de transferrina 1 produciendo la disociación entre RTf1 y la proteína de la hemocromatosis (HFE). Posteriormente HFE forma un complejo con RTf2 (Pantapoulos, 2008). La unión del complejo HFE-RTf2 con Fe-Tf produce la interacción de BMP6 con su receptor (RBMP) y su correceptor llamado hemojuvelina (HJV). Éstas interacciones conducen a la transcripción del gen de hepcidina (Ganz y Nemeth, 2012).

Esta hipótesis es soportada por Pellegrino et al. (2016) quienes reportaron la ausencia de hepcidina en ratones knockout para RTf2. Se cree que la interacción de RTf2 y HFE podría ser necesaria para que el complejo HJV-BMP2-RBMP tipo II sea endocitado eficientemente proporcionando un vínculo entre la transferrina diférrica y la vía de señalización BMP-SMAD (Latour et al. 2015).

1.2.7 Transportadores del grupo hemo

Varios autores han sugerido que la dishomeostasis del grupo hemo podría asociarse con la acumulación de hierro neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Li et al. 2017). Es por eso que evaluamos la expresión de dos transportadores clave del hierro hemo en nuestro Modelo Celular y demostramos el rol de HCP1 y FLVCR en el transporte del hierro hemo en neuronas en condiciones basales. Además, concluimos que estos transportadores no serían regulados por hierro FAC ni por EPO en nuestro Modelo Celular.

1.3 PRETRATAMIENTOS CELULARES

La utilización del antioxidante NAC como pretratamiento nos permitió demostrar que los niveles de ROS fueron reducidos por NAC y las proteínas del ciclo de hierro no se modifican. Sugerimos que los cambios en la expresión de las proteínas del hierro inducidos por FAC tendrían una asociación regulatoria con las especies reactivas del oxígeno.

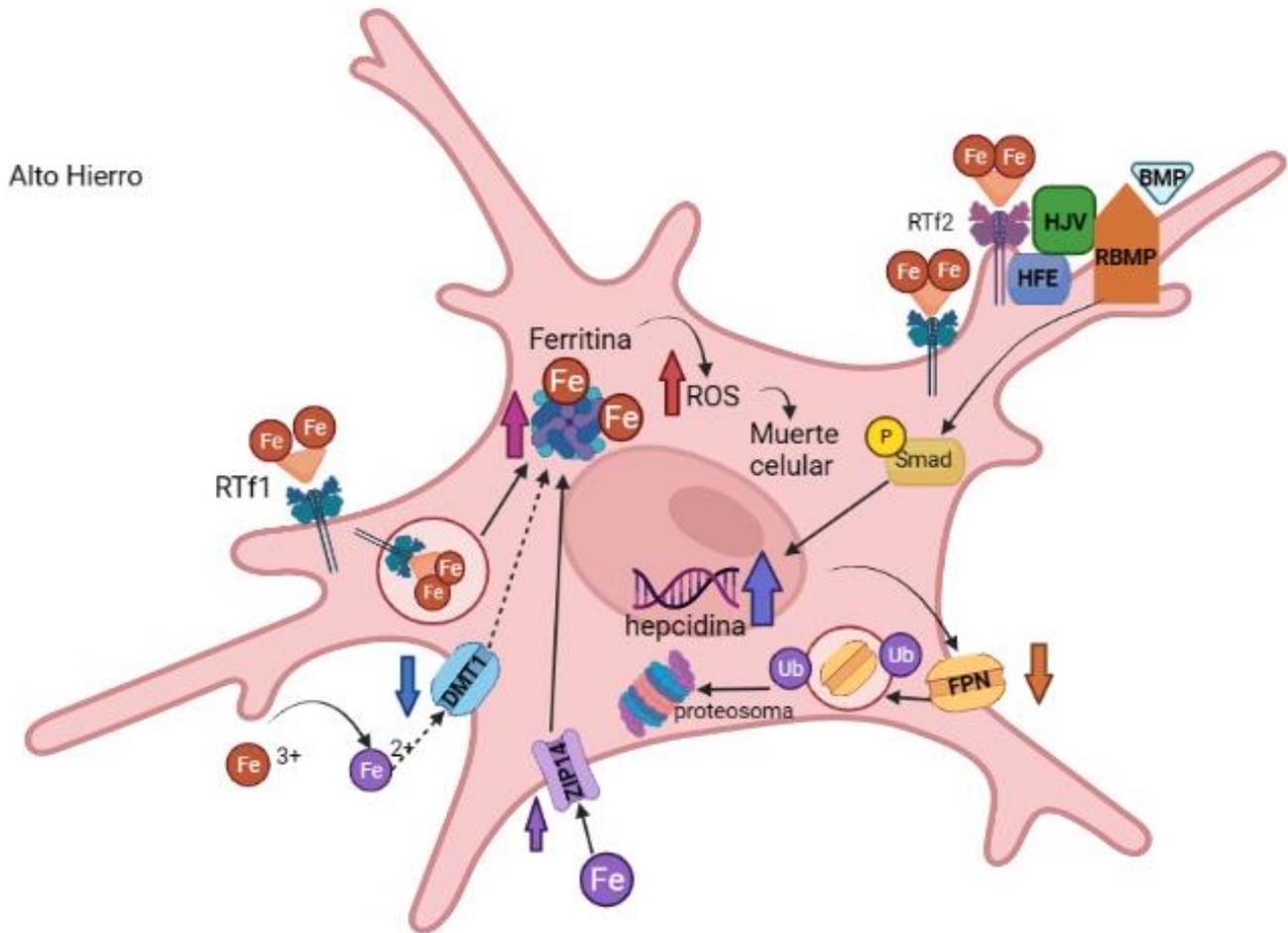
Por otro lado, reportamos que el mecanismo neuroprotector de EPO no sería mediado por las proteínas del ciclo del hierro estudiadas. En este contexto proponemos que EPO protege a las células neuronales de la muerte celular inducida por hierro a través de un mecanismo independiente de las proteínas del ciclo del hierro. Se ha demostrado que el efecto neuroprotector de EPO es mediado vía PI3K/Akt y JAK/STAT que promueve la expresión de proteínas antiapoptóticas (Pregi et al. 2006, Wenker et al. 2013).

1.4. CONCLUSIONES

Nuestros descubrimientos constituyen una nueva contribución al conocimiento del ciclo del hierro neuronal. Mediante este trabajo demostramos que el hierro induce muerte neuronal en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y de manera dosis y tiempo dependiente. La disminución de la viabilidad celular sería mediada por la producción de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, reportamos que la EPO tiene un efecto neuroprotector por un mecanismo que no involucra a las proteínas clave del ciclo del hierro. El presente estudio se focaliza en el rol de ZIP14, RTf1 y DMT1 en la captación neuronal de hierro y su acumulación como L y H ferritina. Concluimos que la captación de hierro neuronal sería mediada por los importadores de hierro ZIP14 y RTf1 con un rol prevalente sobre DMT1 quien presentaría un rol protector celular para disminuir la captación de hierro celular. Por otro lado, el aumento de la síntesis de hepcidina en respuesta al exceso de hierro nos condujo a investigar la vía de señalización involucrada, demostrando la participación de RTf2 y HFE clarificando el mecanismo involucrado (Esquema 1).

Discusión

Finalmente, la aumentada expresión de hepcidina sugeriría una disminución de la expresión del exportador ferroportina contribuyendo a la sobrecarga de hierro celular y la posterior muerte neuronal.



Esquema 1. Proteínas del ciclo del hierro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en exceso de hierro. Esquema realizado utilizando BioRender.com

La célula ilustra la respuesta de las células de neuroblastoma humano frente al exceso de hierro. La expresión de DMT1 disminuye respecto al Control. La expresión citoplasmática de RTf1 y el aumento de la expresión de ZIP14 respecto al Grupo Control indican su rol predominante en la captación de hierro celular que se acumula como H y L ferritina. La aumentada expresión de hepcidina en el citoplasma celular de las células incubadas con FAC podría ser mediado por la vía RTf2-HFE-BMP y mediante la internalización y degradación proteosómica de Ferroportina, el único exportador de hierro conocido, contribuye al aumento de hierro intracelular. El exceso de hierro conduce a estrés oxidativo y muerte celular.

2. MODELO ANIMAL

2.1 CONTENIDO DE HIERRO CEREBRAL

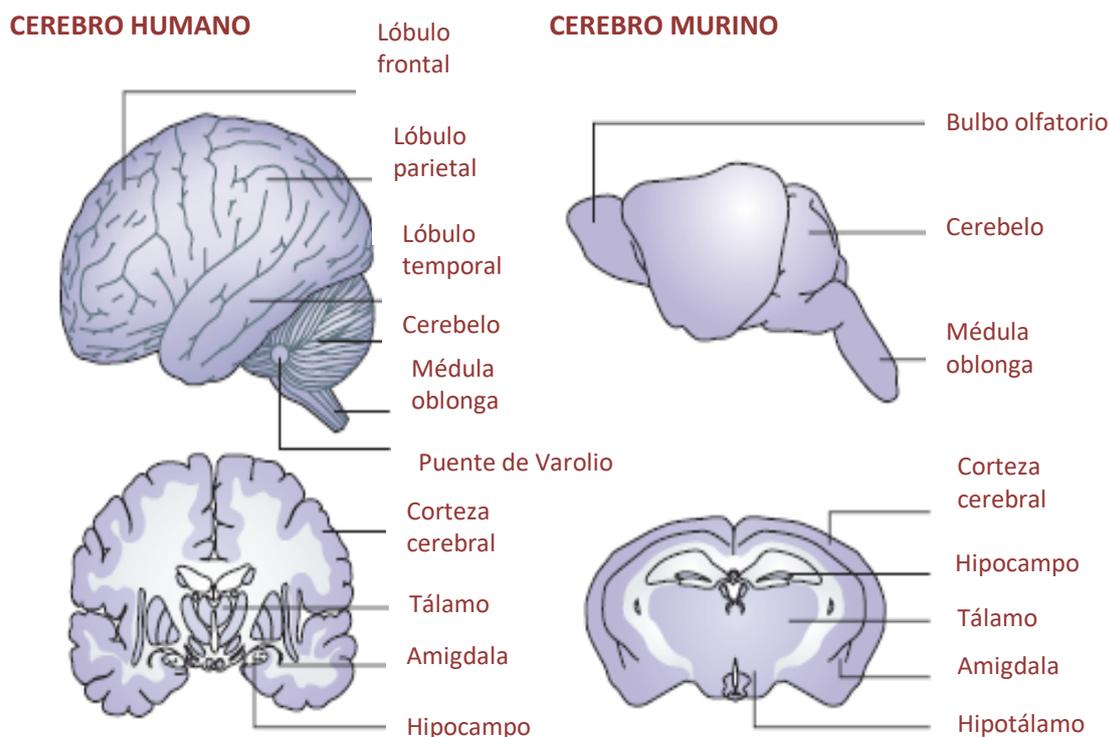
El hierro es esencial para muchas funciones cerebrales como la mielinización neuronal, neurotransmisión y síntesis de ADN (Beard et al. 1993). Sin embargo, la acumulación de hierro neuronal durante el envejecimiento y el estrés oxidativo generado se han asociado a varias enfermedades neurodegenerativas. En estas enfermedades se observa frecuentemente exceso de hierro en áreas específicas del cerebro y se asocia a la pérdida de funciones celulares y muerte neuronal (Altamura y Muckenthaler 2009; Zecca et al. 2001).

Luego de observar que el hierro induce muerte neuronal in vitro estudiamos el efecto del hierro en cerebro en el Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro dado que muchas enfermedades neurodegenerativas poseen patología celular y regional de manera similar en el humano y en el roedor. En este sentido, Strand et al. (2007) demostraron la conservación de genes entre el cerebro humano y de ratón al estudiar regiones como corteza cerebral, estriado y cerebelo en concordancia con la comparación neuroanatómica en donde se demuestra la conservación de la estructura y tipo celular en regiones comparables.

En los últimos años el ratón se ha convertido en el modelo animal de elección para el estudio de enfermedades neurodegenerativas y desórdenes neurológicos a pesar de las diferencias anatómicas que posee respecto al cerebro humano y de que los cerebros de humano y ratón son claramente diferentes en cuanto a tamaño, complejidad y habilidades cognitivas (Strand et al. 2007).

En el siguiente esquema (Esquema 2) se pueden comparar los cerebros de humano y ratón y se observa como el cerebro humano es alrededor de 2700 veces mayor en tamaño respecto al del roedor (Cryan y Holmes 2005). Además, el cuerpo calloso y la corteza cerebral del roedor son más pequeños que en el humano.

Sin embargo, la presencia de ancestros comunes durante la evolución implica que más allá de las diferencias de tamaño existen muchas similitudes desde el punto de vista anatómico y funcional.



Esquema 2. Comparación anatómica del cerebro humano y murino. Adaptado de Cryan y Holmes *Rev Nature* (2005).

Con este modelo Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro demostramos la acumulación de hierro en áreas específicas del SNC, como estriado y cerebelo al igual que lo hacen otros tejidos susceptibles como el hígado páncreas y pulmón (D'Anna y Roque 2013; Giorgi y Roque, 2015; Giorgi, D'Anna y Roque 2016). La acumulación de hierro en estructuras encefálicas se asocia con diversas enfermedades neurológicas. Se ha observado un exceso de ferritina en sustancia negra y en estriado que lleva a la pérdida celular (Earle, 1968; Dexter et al. 1989; Dexter et al. 1991; Sofic et al. 1988). Por otro lado, también se observó que el hierro se acumula en los ganglios basales causando síntomas clínicos en enfermedades neurodegenerativas sugiriendo que la acumulación de hierro es parte del desorden y no una consecuencia de la pérdida celular (Bartzokis et al. 1999).

Además, demostramos la disminución en los niveles de hierro en presencia de EPO en las regiones estudiadas lo que podría sugerir una disminución de la muerte neuronal ocasionada por ROS en concordancia con lo reportado en el modelo celular, en este sentido Kumral et al. (2005) observaron que EPO reduce la apoptosis inducida por etanol en cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo.

2.2 PROTEÍNAS DEL CICLO DEL HIERRO

Si bien el exceso de hierro se relaciona con numerosas patologías, también se conoce que este biometal es esencial para diversos procesos neuronales (Zechel et al. 2006). Por ello, es importante que el hierro se encuentre en equilibrio a través de un estricto control de las proteínas que participan en su movilización, almacenamiento y regulación.

Respecto de la expresión de RTf1 se ha observado que la deficiencia del biometal estimula su expresión en neuronas y células endoteliales (Anderson GJ et al. 2009).

Por otro lado, se ha reportado la presencia de ferritina en axones que transportan hierro en la sinapsis, además de la presencia de ferroportina en vesículas sinápticas para descargar hierro en la sinapsis (Anderson GJ et al. 2009).

Burdo et al. (2001) identificaron a FPN en neuronas de cerebro de rata en condiciones basales. Sin embargo, poco se conoce sobre la expresión de los transportadores del ciclo del hierro DMT1 y ZIP14 en cerebro de ratones en estados de sobrecarga de hierro.

2.2.1 *Importadores de hierro DMT1 y ZIP14*

Al igual que lo observado en células de neuroblastoma humano demostramos que el exceso de hierro en sistema nervioso no sería mediado por el importador DMT1. Este transportador tendría un rol menos relevante que el importador ZIP14 en la captación de hierro en exceso. Postulamos a la disminución de la expresión de DMT1 como un mecanismo neuroprotector específico de ciertas regiones frente al exceso de hierro y la muerte neuronal. Esta hipótesis es soportada por estudios en células de neuroblastoma humano por Aguirre et al. (2005) que observaron que la disminución de DMT1 bloquea la acumulación de hierro en neuronas que sobreviven al exceso de hierro. Por el contrario, el importador ZIP14 podría ser el transportador responsable de la instauración de la sobrecarga de hierro cerebral.

Heidari et al. (2016) demostraron en un modelo animal de hemocromatosis utilizando ratones knockout para HFE y RTf2 la sobrecarga de hierro cerebral en estructuras mielinizadas, oligodendrocitos, astrocitos y regiones asociadas. Zechel et al. (2006) demostraron la presencia de prohepcidina en ratones C57BL6 en condiciones basales en bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, médula espinal, hipocampo, tálamo e hipotálamo.

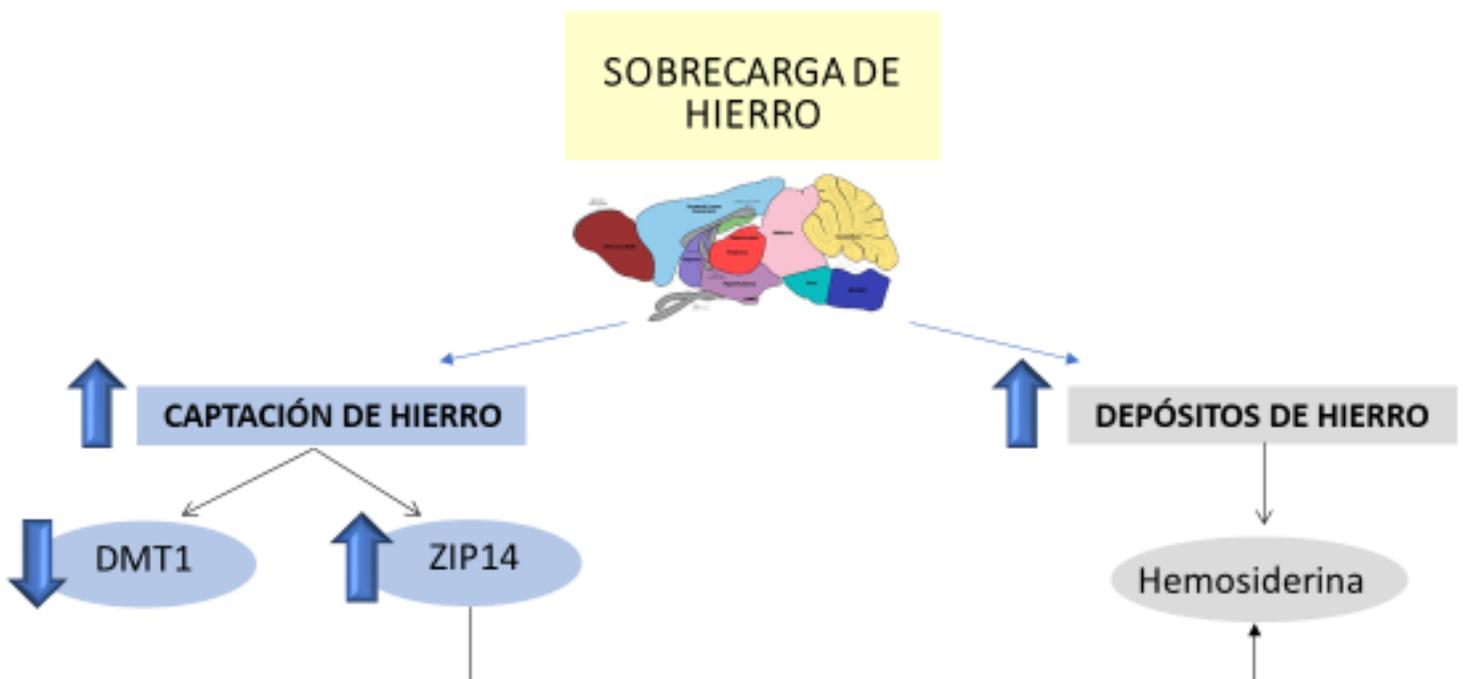
Sin embargo, más estudios sobre las proteínas clave del ciclo del hierro deberán realizarse para clarificar los mecanismos regulatorios del metabolismo del hierro en sistema nervioso en estados de

exceso de hierro. Comprender la regulación de las proteínas clave del ciclo del hierro podrá contribuir a dilucidar el proceso de neurodegeneración inducido por hierro. De esta forma se podrá enfatizar la prevención y el tratamiento de los desórdenes neurodegenerativos.

2.3 CONCLUSIONES

Mediante este modelo mostramos que el tejido nervioso es sensible al exceso de hierro y es capaz de acumularlo en forma de hemosiderina en áreas específicas como cerebelo, medula espinal, estriado e hipocampo.

Demostramos que la captación de hierro sería mediada principalmente por el importador ZIP14. Por otro lado, el importador DMT1 tendría un rol menos relevante en la captación del biometal y sería parte de un mecanismo protector celular. Futuros estudios revelaran el rol de otros transportadores de hierro como así también el de proteínas regulatorias del ciclo del hierro en estados de sobrecarga.



Conclusiones finales

Conclusiones finales

- 1- El equilibrio en la homeostasis del hierro es mantenido mediante la regulación coordinada de su absorción, depósitos y reabsorción. En estados de sobrecarga de hierro disminuir su biodisponibilidad plasmática evitaría la toxicidad celular al elevar los depósitos de hierro en forma de L-ferritina en hígado, riñón, páncreas y pulmón vía el importador ZIP14. El regulador hepcidina también contribuiría a la acumulación de hierro intracelular al disminuir su liberación a la circulación a través del eje hepcidina-ferroportina. Por el contrario, en corazón, ZIP14 no tendría un rol destacado en la sobrecarga de hierro debido a que no detectamos cambios en su expresión.
- 2- A diferencia de ZIP14 el importador DMT1 formaría parte de un mecanismo que intentaría proteger a las células del duodeno, hígado, riñón, páncreas, pulmón, corazón y sistema nervioso controlando la acumulación celular de hierro al limitar el ingreso del biometal a través de la disminución de la expresión de dicho importador.
- 3- En el sistema nervioso el exceso de hierro se deposita en áreas específicas como cerebelo, médula espinal, estriado e hipocampo. En las células neuronales el ingreso de hierro se debería al aumento de su captación mediada por ZIP14 y RTf1 y a la disminución de su exportación celular mediada por el eje hepcidina-ferroportina. La vía de señalización involucrada en la síntesis de hepcidina en respuesta al exceso de hierro sería mediada por RTf2 y HFE de manera similar a lo que ocurre en hepatocitos induciendo una cascada de señalización celular en donde aumenta la síntesis de BMP-6 y se activa la vía de SMADs. El aumento del nivel celular de hierro genera una mayor producción de especies reactivas de oxígeno induciendo estrés oxidativo y desencadenando la muerte neuronal que es tanto tiempo como dosis dependiente.
- 4- Frente al exceso de hierro la eritropoyetina presenta un rol protector en bazo, riñón, pulmón e hígado dado que indujo la reducción de los depósitos de hierro mediante la disminución de ZIP14 y prohepcidina que conducirían a una menor captación y mayor liberación de hierro a circulación para ser utilizado en la eritropoyesis. Por el contrario, en duodeno la localización apical de DMT1 en los enterocitos reflejaría una mayor captación de hierro necesario para la

Conclusiones finales

eritropoyesis activa. En corazón el importador ZIP14 no resultó ser regulado por EPO como tampoco este órgano sería regulado por los niveles de hepcidina sistémica.

- 5- El rol neuroprotector de la eritropoyetina que limita los depósitos de hierro en situaciones de exceso sería mediado por un mecanismo que no involucra la regulación de la expresión de las proteínas clave del ciclo del hierro evaluadas.
- 6- El estudio integrador de los órganos murinos en estados de sobrecarga de hierro y eritropoyesis inducida nos permitió concluir que cuando la sobrecarga de hierro y la eritropoyesis coexisten, la señal regulatoria preponderante en cada tejido resulta ser órgano específica.
- 7- **Este trabajo abre nuevos horizontes para utilizar a la eritropoyetina recombinante humana como un posible tratamiento en trastornos de sobrecarga de hierro para evitar su acumulación y disminuir su toxicidad.**

Referencias

- 1 Abboud Sherry, Haile David J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The journal of biological chemistry* Vol 275, N 26 pp 19906-19912, 2000.
- 2 Abouhamed Marouan, Gburek Jakub, Liu Wei, Torchalski Blazej, 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. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 290: F1525–F1533, 2006.
- 3 Aguirre P, Mena N, Tapia V, Arredondo M, Núñez MT. Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neuroscience* Vol 6 Issue 3. 2005.
- 4 Aguirre P, Valdés P, Aracena-Parks P, Tapia V, Núñez MT. Upregulation of gamma-glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Vol 292 Issue 6 pp C2197-C2203, 2007.
- 5 Ali MK, Kim RY, Brown AC, Donovan C, Vanka KS, et al. Critical role for iron accumulation in the pathogenesis of fibrotic lung disease. *Journal of pathology* Vol 251 pp 49-62, 2020.
- 6 Altamura Sandro y Muckentaler Martina. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol 16, no. 4, pp. 879-895, 2009.
- 7 Anagnostou, A., Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R., & Steiner, M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 5978–5982, 1990.
- 8 Anagnostou Athanasius, Llul Ziyao, Steiner Manfred, Chin Kyung, Lee Eun, Kessimian Noubar, Noguchil Constance T. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 3974-3978, Medical Sciences, 1994.
- 9 Anderson C. P., Shen M., Eisenstein R. S., et al. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1468–1483, 2012.
- 10 Anderson G. J., & Vulpe C. D. Mammalian iron transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (20), 3241–3261, 2009.
- 11 Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. Vol 25 issue (2) pp 129-135, 2009.
- 12 Andrews N. C. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230, 2008.
- 13 Andrews, N. C. The iron transporter DMT1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(10), 991–994, 1999.
- 14 Armitage Andrew, Eddowes Lucy, Gileadi Uzi, Cole Suzanne, Spottiswoode Natasha et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *BLOOD*, Vol 118, N° 15, 2011.
- 15 Arosio y Levi. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free radical biology and medicine*. Vol 33, Issue 4, pp. 457-463, 2002.
- 16 Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. Vol 9 pp 505-50, 2010.
- 17 Ashton, R. S., Conway, A., Pangarkar, C., Bergen, J., Lim, K. I., Shah, P., Bissell, M., & Schaffer, D. V. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nature Neuroscience*, 15, 1399–1406, 2012.
- 18 Auzmendi, Jerónimo; Puchulu, María B.; Rodríguez, Julio C. G.; Balaszczuk, Ana M.; Lazarowski, Alberto; Merelli, Amalia. EPO and EPO-Receptor System as Potential Actionable Mechanism for the Protection of Brain and Heart in Refractory Epilepsy and SUDEP. *Current Pharmaceutical Design*, Volume 26, Number 12, pp. 1356-1364(9), 2020.
- 19 Awai M., Narasaki M., Yamanoi Y., et al. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *The American Journal of Pathology*, 95(3), 663–673, 1979.
- 20 Babbitt, J., Huang, F., Wrighting, D. et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38, 531–539, 2006.
- 21 Banerjee P, Sahoo A, Anand S, Ganguly A, Righi G, Bovicelli P, Saso L, Chakrabarti S. Multiple mechanisms of iron-induced amyloid beta-peptide accumulation in SHSY5Y cells: protective action of negletein. *Neuromolecular Med*. Vol 16 Issue 4 pp 787-98, 2014.
- 22 Banks DD. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *J Mol Biol* 412: 536-50, 2011.
- 23 Bany-Mohammed, F., Slivka, S. & Hallman, M. Recombinant Human Erythropoietin: Possible Role as an Antioxidant in Premature Rabbits. *Pediatr Res* 40, 381–387, 1996.
- 24 Bartzokis G, Cummings J, Perlman S, Hance DB, Mintz J. Increased Basal Ganglia Iron Levels in Huntington Disease. *Arch Neurol*. 56(5) pp 569–574, 1999.

Referencias

- 25 Bautista Elizabeth, Vergara Paula, Segovia José. Iron-induced oxidative stress activates AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* Vol 34 pp 62–69, 2016.
- 26 Beard J., Connor J., Jones B. Iron in the Brain, *Nutrition Reviews*, Volume 51, Issue 6, pp 157–170, 1993.
- 27 Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, et al. Increased Adipose Tissue Expression of Hepcidin in Severe Obesity Is Independent from Diabetes and NASH. *Gastroenterology* Vol 131, Issue 3, pp 788-796, 2006.
- 28 Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth MP, Coppin H. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* Vol 120 (2) pp 431–439, 2012.
- 29 Bozzini CE, Barrio Rendo ME, Devoto FC, Epper CE. Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse. *American Journal of Physiology* Vol 219, Issue 3, 1970.
- 30 Bradbury, Kishor, Ueda. Contrasting uptakes of ⁵⁹Fe into spleen, liver, kidney and some other soft tissues in normal and hypotransferrinaemic mice influence of an antibody against the transferrin receptor, *Biochemical Pharmacology*, Volume 47, Issue 6, pages 969-974, ISSN 0006-2952, 1994.
- 31 Brasse-Lagnel Carole, Karim Zoubida, Letteron Philippe, Bekri Soumeiya, Bado André, Beaumont Carole. Intestinal DMT1 Cotransporter Is Down-regulated by Hepcidin via Proteasome Internalization and Degradation. *Gastroenterology* Vol 140, Issue 4 pp 1261-1271, 2011.
- 32 Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., and Montreuil, J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* Vol 80, pp 173–195, 1998.
- 33 Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, Connor JR. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *Journal of Neuroscience Research* 66:1198 –1207, 2001.
- 34 Burdo JR1, Martin J, Menzies SL, Dolan KG, Romano MA, Fletcher RJ, Garrick MD, Garrick LM, Connor JR. Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat. *Neuroscience*. Vol 93 Issue 3 pp 1189-96, 1999.
- 35 Canonne-Hergaux F, Gros P. Expression of the iron transporter DMT1 in kidney from normal and anemic *mk* mice. *Kidney international*, Vol 63, Issue 1, pp 147-156, 2002.
- 36 Canonne-Hergaux F, Gruenheid F, Ponka P, and Gros P. Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the Intestinal Brush Border and Regulation by Dietary Iron. *Blood*, Vol 93, No 12 pp 4406-4417, 1999.
- 37 Cao Fei, Tian Xinyi, Li Zhongwang, Lv Ya, Han Jun, Zhuang Rong, Cheng Bihuan, Gong Yuqiang, Ying Binyu, Jin Shengwei, Gao Ye. Suppression of NLRP3 Inflammasome by Erythropoietin via the EPOR/JAK2/STAT3 Pathway Contributes to Attenuation of Acute Lung Injury in Mice. *Frontiers in pharmacology* Vol 11, Article 306, 2020.
- 38 Cardiff R, Miller C, Munn R. *Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections*. Cold Spring Harbor Protocols, 2014.
- 39 Casanovas G, Vujić Spasić M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, Muckenthaler M. The Murine Growth Differentiation Factor 15 Is Not Essential For Systemic Iron Homeostasis In Phlebotomized Mice. *Haematologica* Vol 98 pp 444-447, 2013.
- 40 Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, Harford JB. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* Vol. 240, Issue 4854, pp. 924-928, 1988.
- 41 Cesta Mark. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic pathology*, Vol 34, Issue 5, 2006.
- 42 Chaston T, Matak P, Pourvali K, Srail S, McKie A, Sharp P. Hypoxia inhibits hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells via decreased SMAD4 signaling. *American Journal of Physiology Cell Physiology* Vol 300 N 4 pp C888–C895, 2011.
- 43 Chen X, Wang CC, Song SM, Wei SY, Jian-Si L, Zhao SL, Li B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/b-catenin signaling. *Journal of the Formosan medical association* Vol 114, pp 430-437, 2015.
- 44 Chen, L., Sun, Q., Liu, S., Hu, H., Lv, J., Ji, W., Wang, M., Chen, M., Zhou, J. Erythropoietin improves glucose metabolism and pancreatic β -cell damage in experimental diabetic rats. *Molecular Medicine Reports* 12.4 pp 5391-5398, 2015.
- 45 Choi D, Schroer S, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, Zhang Y, Gaisano H, Wagner K, Wu H, Retnakaran R, Woo M. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic β cells. *Journal of experimental medicine* Vol 207, Issue 13, pp 2831-2842, 2010.

Referencias

- 46 Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide on Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: NIH Publications [(Natl. Inst Health, Bethesda) No. 86-23 (DRR/NIH)], 1976.
- 47 Conrad ME, Umbreit JN, Peterson RD, Moore EG, Harper KP. Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood*. Vol 81 Issue 2 pp 517-521, 1993.
- 48 Coons AH, Creech HJ, Jones RN, et al. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *The Journal of Immunology* Vol 45 Issue 3 pp 159-170, 1942.
- 49 Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *BLOOD*, Vol 106, N 3, pp 1084-1091, 2005.
- 50 Cornelissen Anne, Guo Liang, Sakamoto Atsushi, Virmani Renu, Finn Alope V. New insights into the role of iron in inflammation and atherosclerosis. *EBioMedicine* Vol 47, pp 598-606, 2019.
- 51 Craven CM, Alexander J, Eldridge M, Kushner JP, Berstein S, Kaplan J. Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: A rodent model for hemochromatosis. *PNAS* Vol 84 Issue 10 pp 3457-3461, 1987.
- 52 Crudo C, Erramouspe B, Sueldo E, Arias M. Perls Iron Stain. *Hematología*. Vol 20 Issue 2 pp 243-246, 2016.
- 53 Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. Vol 4 issue (9) pp 775-790, 2005.
- 54 D'anna, MC, Giorgi G, Roque ME. Immunohistochemical studies on duodenum, spleen and liver in mice: Distribution of ferroportin and prohepcidin in inflammation model. *Sociedad Chilena de Anatomía, International Journal of Morphology*, Vol 29, Issue 3 pp 747-753, 2011
- 55 D'Anna MC, Roque ME. Physiological focus on the erythropoietin-hepcidin-ferroportin axis. *Can J Physiol Pharmacol*. Vol 91, Issue 5, pp 338-45, 2013.
- 56 De Domenico I, McVey Ward D, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, Ganz T, Musci G, Kaplan J. The Molecular Mechanism of Heparin-mediated Ferroportin Down-Regulation. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 18, No. 7, 2007.
- 57 De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Heparin and Ferroportin: The New Players in Iron Metabolism. *Semin Liver Dis*. Vol 31 Issue 3 pp 272-279, 2011.
- 58 De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood* Vol 114 Issue 20 pp 4546-4551, 2009.
- 59 Delaby C, Pilard N, Puy H, Canonne-Hergaux F. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochemical Journal* Vol 411 Issue 1 pp 123-131, 2008.
- 60 Dexter DT, Wells FR, Lee AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry* Vol 52 Issue 6 pp 1830-1836, 1989.
- 61 Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia, *Brain*, Volume 114, Issue 4, pp 1953-1975, 1991.
- 62 Dines, M., Grinberg, S., Vassiliev, M., Ram, A., Tamir, T., & Lamprecht, R. The roles of Eph receptors in contextual fear conditioning memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 124, 62-70, 2015.
- 63 Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Bauer, C., & Gassmann, M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 3717-3720, 1995.
- 64 Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* Vol 1, Issue 3, pp 191-200, 2005.
- 65 Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y. et al. Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* Vol 403, pp 776-781, 2000.
- 66 Du F, Qian ZM, Luo Q, Yung WH, Ke Y. Heparin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport Proteins in Iron-Overloaded Rats. *Mol Neurobiol*. Vol 52 Issue 1 pp 101-114, 2015.
- 67 Earle KM. Studies on Parkinson's Disease Including X-Ray Fluorescent Spectroscopy of Formalin Fixed Brain Tissue, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Vol 27, Issue 1, pp 1-14, 1968.
- 68 Edsjo Anders, Holmquist Linda, Pahlman Sven. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology* Vol 17 pp 248-256, 2007.
- 69 Enns CA, Ahmed R, Wang J, Ueno A, Worthen C, Tsukamoto H, Zhang AS. Increased Iron Loading Induces Bmp6 Expression in the Non-Parenchymal Cells of the Liver Independent of the BMP-Signaling Pathway. *Plos One* Vol

Referencias

- 8 Issue 4, 2013. Falla-Zuñiga y Salazar Mansalve. Conformación histológica del corazón fetal de *Mus musculus* E13. XIX Simposio de Investigaciones en Salud: Autonomía, financiación y Calidad, 2017.
- 70 Fandrey. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 pp 977–988, 2004.
- 71 Feng C, Luo T, Zhang S, Liu K, Zhang Y, Luo Y and Ge P: Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways. *Mol Med Rep* 13: 4205-4214, 2016.
- 72 Fenjves, Elizabeth S.; Ochoa, M. Sofia; Cabrera, Over; Méndez, Armando J.; Kenyon, Norma S.; Inverardi, Luca; Ricordi, Camillo. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation: Vol75 - Issue 8 - pp 1356-1360*, 2003.
- 73 Ferguson CJ, Wareing M, Ward DT, Green R, Smith CP, Riccardi D. Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *American Journal of Physiology, Renal Physiology* Vol 280 Issue 5 pp 803-814, 2001.
- 74 Ferguson CJ, Wareing M, Delannoy M, Fenton R, McLarnon SJ, Ashton N, Cox AG, McMahon RF, Garrick LM, Green R, Smith CP & Riccardi D. Iron handling and gene expression of the divalent metal transporter, DMT1, in the kidney of the anemic Belgrade (b) rat. *Kidney International* Vol 64 pp 1755–1764, 2003.
- 75 Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodríguez-Cuesta J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. Vol 49 issue 2 pp 202-206, 2010.
- 76 Festing Michael. Design and Statistical Methods in Studies Using Animal Models of Development, *ILAR Journal*, Vol 47, Issue 1, pp 5-14, 2006.
- 77 Filmanowicz E, Gurney CW. Studies on erythropoiesis. XVI. Response to a single dose of erythropoietin in polycythemic mouse. *J Lab Clin Med*. Vol 57 pp 65-72, 1961.
- 78 Flanagan J, Peng HF, Beutler E. Effects of Alcohol Consumption on Iron Metabolism in Mice with Hemochromatosis Mutations. *Alcoholism Clinical and experimental research* Vol 31, Issue 1, pp 138-143, 2007.
- 79 Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews ND. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *PNAS* Vol 95 Issue 3 pp 1148-1153, 1998.
- 80 Fleming RE, Migas MC, Holden CC, Waheed A, Britton RS, Tomatsu S, Bacon BR, Sly WS. Transferrin receptor 2: Continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *PNAS* Vol. 97 N. 5 pp 2214–2219, 2000.
- 81 Frazer David and Anderson Gregory. Iron Imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: pp 631–635, 2005.
- 82 Frazier MD, Mamo LB, Ghio AJ et al. Hecpudin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferón- γ . *Respiratory Research* Vol 12 Issue 100, 2011.
- 83 Fujishiro H, Yoshida M, Nakano Y, Himeno S. Interleukin 6 enhances manganese accumulation in SH-SY5Y cells: implications of the up regulation of ZIP14 and the down-regulation of ZnT10. *Metallomics*. Vol 6 Issue 4 pp 944-9, 2014.
- 84 Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Naturals Reviews Immunology* Vol 15 pp 500-510, 2015.
- 85 Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol 1763 Issue 7 pp 690–699, 2006.
- 86 Ganz Tomas. Hecpudin a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* Vol 102, Issue 3 pp 783-788, 2003.
- 87 Ganz Tomas. Hecpudin and iron regulation, 10 years later. *Blood* Vol 117, Issue 17 pp 4425-4433, 2011.
- 88 Ganz Tomas. Iron and infection. *Journal of hematology* Vol 107 pp 7-15, 2018.
- 89 Ganz, T., & Nemeth, E. Hecpudin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* Vol 1823, Issue 9, pp 1434–1443, 2012.
- 90 Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hecpudin expression. *Cell Metab*. Vol 9 Issue 3 pp 217-227, 2009.
- 91 Gao J., Zhao N., Knutson M. D., et al. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 283 Issue 31 pp 21462–21468, 2008.
- 92 García del Moral, R. Laboratorio de anatomía patológica. Madrid: Editorial Interamericana McGraw-Hill. ISBN: 84-481-0229-0, 1993.

Referencias

- 93 Ghio A. J. Disruption of iron homeostasis and lung disease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(7), 731–739, 2009.
- 94 Ghio Andrew J, Turi Jennifer I, Yang Funmei, Garrick Laura M, Garrick Michael D. Iron homeostasis in the lung. *Biological Research Vol 39 pp 67-77*, 2006.
- 95 Giannetti AM, Bjorkman PJ. HFE and Transferrin Directly Compete for Transferrin Receptor in Solution and at the Cell Surface. *The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N 24*, pp. 25866–25875, 2004.
- 96 Giblett ER, Motulsky AG, Cassard F, Houghton B, Finch CA. Studies on the Pathogenesis of Splenic Anemia. *Blood Vol 11 Issue 12 pp 1118–1131*, 1956.
- 97 Giorgi G, D'Anna MC, Roque ME. Iron homeostasis and its disruption in mouse lung in iron deficiency and overload. *Exp Physiol. Vol 100 Issue 10 pp 1199-216*, 2015.
- 98 Giorgi G, Roque ME. Iron overload induces changes of pancreatic and duodenal divalent metal transporter 1 and prohepcidin expression in mice. *Acta Histochem. Vol 116, Issue 2*, pp 354-62, 2014.
- 99 Girijashankar K, He L, Soleimani M, Reed JM, Li H, Liu Z, Wang B, Dalton TP, Nebert DW. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Molecular Pharmacology Vol 73 Issue 5 pp 1413–1423*, 2009.
- 100 Golde W. T., Gollobin P., & Rodriguez L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal, Vol 34 Issue 9 pp 39–43*, 2005.
- 101 Graham RM, Chua AC, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World Journal of Gastroenterology Vol 13 Issue 35 pp 4725–4736*, 2007.
- 102 Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *The EMBO Journal Vol 31, Issue 11 pp 2448–2460*, 2012.
- 103 Gregory CJ y Eaves AC. Three stages of Erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of Physical and Biologic properties. *Blood Vol 51 N 3*, 1978.
- 104 Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam, DJ, Grinstein S, Gros P. The Iron Transport Protein NRAMP2 Is an Integral Membrane Glycoprotein That Colocalizes with Transferrin in Recycling Endosomes. *Journal of experimental medicine Vol 189 Issue 5 pp 831-841*, 1999.
- 105 Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud LIMA, 2008.
- 106 Gunshin H., Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, RoftJack A, et al. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS letters Vol 509 Issue 2 pp 309-316*, 2001.
- 107 Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature, Vol 388 Issue 6641 pp 482–488*, 1997.
- 108 Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A. O., Drenzo, C., Robine, S., and Andrews, N. C. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest. Vol 115*, pp 1258–1266, 2005.
- 109 Guo B., Phillips J. D., Yu Y., et al. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry, Vol 270 Issue 37 pp 21645–21651*, 1995.
- 110 Gutschow P, Schmidt PJ, Han H, Ostland V, Bartnikas TB, et al. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific for Murine Hpcidin-1: Correlation with Hepatic mRNA Expression in Established and Novel Models of Dysregulated Iron Homeostasis. *haematologica Vol 100 Issue 2*, 2015.
- 111 Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Vol 27 pp 41-53*, 2013.
- 112 Haile D. J., Rouault T. A, Harford J. B., et al. Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol 89 Issue 24 pp 11735–11739*, 1992.
- 113 Han O., & Kim E.-Y. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *Journal of Cellular Biochemistry, Vol 101 Issue 4 pp 1000–1010*, 2007.
- 114 Han, O., Failla, M. L. & Smith, J. C. Transferrin-iron and proinflammatory cytokines influence iron status and apical iron transport efficiency of Caco-2 intestinal cell line. *J. Nutr. Biochem. 8: 585–591*, 1997.
- 115 Hänninen MM, Haapasalo J, Haapasalo H, Fleming RE, Britton RS, Bacon BR, Parkkila S. Expression of iron-related genes in human brain and brain tumors. *BMC Neurosci. Vol 22; 10:36*, 2009.
- 116 Harris ED. The iron-copper connection: the link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr Rev. Vol 53 Issue 6 pp 170-173*, 1995.
- 117 Harrison P. M., & Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Vol 1275 Issue 3 pp 161–203*, 1996.
- 118 He J, Zhong X, Zhao L, et al. JAK2/STAT3/BMP-2 axis and NF-κB pathway are involved in erythropoietin-induced calcification in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Nephrol Vol 23*, pp 501-512, 2019.

Referencias

- 119 Heidari, M., Johnstone, D., Bassett, B. *et al.* Brain iron accumulation affects myelin-related molecular systems implicated in a rare neurogenetic disease family with neuropsychiatric features. *Mol Psychiatry* 21, 1599–1607, 2016.
- 120 Heij, L., Niesters, M., Swartjes, M., Hoitsma, E., Drent, M., Dunne, A., Grutters, J. C., Vogels, O., Brines, M., Cerami, A., & Dahan, A. Safety and efficacy of ARA 290 in sarcoidosis patients with symptoms of small fiber neuropathy: A randomized, double-blind pilot study. *Molecular Medicine*, 18, 1430–1436, 2012.
- 121 Helgudottir SS, Lichota J, Burkhart A, et al. Hcpidin mediates transcriptional changes in ferroportin mRNA in differentiated neuronal-like PC12 cells subjected to iron challenge. *Molecular Neurobiology* Vol 56, pp 2362-2374, 2018.
- 122 Hentze MW, Kuhn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *PNAS* Vol 93 Issue 16 pp 8175-8182, 1996.
- 123 Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT1)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 99 pp 12345-12350, 2002.
- 124 Iancu T. C. Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *Journal of Neural Transmission*, Vol 118 Issue 3 pp 329–335, 2011.
- 125 Iancu TC. Biological and ultrastructural aspects of iron overload: an overview. *Pediatr Pathol.* Vol 10 (1-2) pp 281-296, 1990.
- 126 Imamura R; Moriyama T; Isaka Y; Namba Y; Ichimaru N; Takahara S; Okuyama A. Erythropoietin Protects the Kidneys Against Ischemia Reperfusion Injury by Activating Hypoxia Inducible Factor-1 α . *Transplantation* Vol 83 - Issue 10 - pp 1371-1379, 2007.
- 127 Iolascon, A., d'Apolito, M., Servedio, V., Cimmino, F., Piga, A., and Camaschella, C. Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2). *Blood* Vol 107, pp 349–354, 2006.
- 128 Iwai K, Klausner RD, Rouault TA. Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *The EMBO Journal* vol.14 no.21 pp.5350-5357, 1995.
- 129 Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawakita, M., Shimizu, T., & Miyake, T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 313, 806–810, 1985.
- 130 Jenkitkasemwong S., Wang C.-Y., Coffey R., et al. SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metabolism*, Vol 22 Issue 1 pp 138–150, 2015.
- 131 Ji C, Kosman DJ. Molecular mechanisms of non-transferrin-bound and transferrin-bound iron uptake in primary hippocampal neurons. *J Neurochem.* Vol 133 Issue 5 pp 668-683, 2015.
- 132 Jin Y, He J, Fan K, Yan X. Ferritin variants: inspirations for rationally designing protein nanocarriers. *Nanoscale.* Vol 11 issue 26 pp12449-12459, 2019.
- 133 Jing M, Shingo T, Yasuhara T, et al. The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting. *Brain Res.* 1295 pp 203-217, 2009.
- 134 Kaldy P, Menotti E, Moret R, Kühn LC. Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1. *EMBO Journey* Vol 18 pp 6073-6083, 1999.
- 135 Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, Epstein JA, Moores SL, Erickson-Miller CL, Haase VH. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* Vol 116 Issue 16 pp 3039–3048, 2010.
- 136 Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, et al. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron.* Vol 37 Issue 6 pp 899-909, 2003.
- 137 Kautz L., Meynard D., Monnier A., et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, Vol 112 Issue 4 pp 1503–1509, 2008.
- 138 Kawabata H., Yang R., Hirama T., et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 274 Issue 30 pp 20826-20832, 1999.
- 139 Kaelin, W. G. Jr. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* 30, 393-402, 2008.
- 140 Ke Y, Chen YY, Chang YZ, Duan XL, Ho KP, Jiang DH, Wang K, Qian ZM. Post-transcriptional expression of DMT1 in the heart of rat. *J Cell Physiol.* Vol 196 issue 1 pp 124-30, 2003.
- 141 Ke Ya, Qian Zhong Ming. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurology* Vol 2 pp 246–53, 2003.
- 142 Kemna E, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass Spectrometry–Based Hcpidin Measurements in Serum and Urine: Analytical Aspects and Clinical Implications, *Clinical Chemistry*, Vol 53, Issue 4, pp 620–628, 2007.

Referencias

- 143 Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* Vol 1813, Issue 5, pp 668-682, 2011.
- 144 Khan Anwar y Quigley John. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Molecular Aspects of Medicine* Vol 34, Issues 2–3 pp 669-682, 2013.
- 145 Kim JY, Choi D, Kim J, et al. Co-administration of erythropoietin and iron complex improves late-phase liver regeneration. *BMB Rep.* Vol 53, Issue 3 pp148-153, 2020.
- 146 Knutson M., & Wessling-Resnick M. Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 38 Issue 1 pp 61–88, 2003.
- 147 Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*, VOL 102, N 12, pp 4191-4197, 2003.
- 148 Knutson MD. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic Biol Med.* Vol 133 pp 101-111, 2018.
- 149 Kong WN, Chang YZ, Wang SM, Zhai XL, Shang JX, Li LX, Duan XL. Effect of erythropoietin on hepcidin, DMT1 with IRE, and hephaestin gene expression in duodenum of rats. *Journal of Gastroenterology* Vol 43 pp 136–143, 2008.
- 150 Kong WN, Zhao SE, Duan XL, Yang Z, Qian ZM, Chang YZ. Decreased DMT1 and increased ferroportin 1 expression is the mechanisms of reduced iron retention in macrophages by erythropoietin in rats. *Journal of cellular biochemistry* Vol 102 Issue 2 pp 629-641, 2008.
- 151 Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood.* Vol 74 Issue 2 pp 645-651, 1989.
- 152 Krause A., Neitz S., Mägert H-J, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, Vol 480 Issue 2-3 pp 147–150, 2000.
- 153 Kristiansen M., Graversen J. H., Jacobsen C., et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, Vol 409 Issue 6817 pp 198–201, 2001.
- 154 Kudo H., Suzuki S., Watanabe A., et al. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*, Vol 246 Issue 2-3, pp 143–147, 2008.
- 155 Kulaksiz H., Fein E., Redecker P., et al. Pancreatic B-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *Journal of Endocrinology*, Vol 197 Issue 2 pp 241–249, 2008.
- 156 Kulaksiz H., Gehrke S. G., 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*, Vol 53 Issue 5 pp 735–743, 2004.
- 157 Kulaksiz H., Theilig F., Bachmann S., et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *The Journal of Endocrinology*, Vol 184 Issue 2 pp 361–70, 2005.
- 158 Kumfu S, Chattipakorn S, Srichairatanakool S, Settakorn J, Fucharoen S, Chattipakorn N. T-type calcium channel as a portal of iron uptake into cardiomyocytes of beta-thalassemic mice. *Eur J Haematol.* Vol 86 Issue 2 pp156-166, 2011.
- 159 Lakhal-Littleton Samira, Wolna Magda, Chung Yu Jin, Christian Helen C., Heather Lisa C., Brescia Marcella, et al. An essential cell-autonomous role for hepcidin in cardiac iron homeostasis, *eLife* 5:e19804, 2016.
- 160 Lakhal-Littleton. Mechanisms of cardiac iron homeostasis and their importance to heart function. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol 133, pp 234-237, 2019.
- 161 Lappin Terry. The Cellular Biology of Erythropoietin Receptors. *The Oncologist* Vol 8 S 1, pp 15-18, 2003.
- 162 Latour C, Besson-Fournier C, Meynard D, et al. Differing impact of the deletion of hemochromatosis-associated molecules HFE and transferrin receptor-2 on the iron phenotype of mice lacking bone morphogenetic protein 6 or hemojuvelin. *Hepatology.* Vol 63 Issue 1 pp126-137, 2016.
- 163 Lebrón JA, West AP Jr, Bjorkman PJ. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol.* Vol 294 Issue 1 pp 239-245, 1999.
- 164 Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis [published correction appears in *Blood*. Vol 115 Issue 15 pp 3136-3145, 2010.
- 165 Lee P. L. & Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annual Review of Pathology*, Vol 4 pp 489–515, 2009.
- 166 Lefebvre T, Dessendier N, Houamel D, et al. LC-MS/MS method for hepcidin-25 measurement in human and mouse serum: clinical and research implications in iron disorders. *Clin Chem Lab Med*, Vol 53 Issue 10 pp 1557-1567, 2015.
- 167 Leibold EA, Munro HN. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 85 Issue 7 pp 2171-2175, 1988.

Referencias

- 168 Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A. K., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L. O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Brines, M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305, 239–242, 2004.
- 169 Lenzen S., Drinkgern J., & Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol 20 Issue 3 pp 463–466, 1996.
- 170 Li H, Ginzburg YZ. Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. *Adv Hematol*. 2010.
- 171 Li H, Zhang C, Shen H, Shen Z, Wu L, Mo F, Li M. Physiological stress induced corticosterone increases heme uptake via KLF4-HCP1 signaling pathway in hippocampus neurons. *Sci Rep*. Vol 7 Issue 1 pp 5745, 2017.
- 172 Lin X, Jiang C, Luo Z, et al. Protective effect of Erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise. *BMC Nephrology* Vol 14, 2013.
- 173 Liu X.B., Nguyen N.B., Marquess K.D., Yang F, Haile D.J. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages *Blood Cells Mol. Dis.*, 35, pp. 47–56, 2005.
- 174 Liuzzi J. P., Aydemir F., Nam H., et al. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol 103 Issue 37 pp 13612–13617, 2006.
- 175 Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, and Cousins RJ. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *PNAS* Vol 102 Issue 19 pp 6843–6848, 2005.
- 176 Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW (2011) Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology* 78: 41–53, 2011.
- 177 Lopez Gomez Claudia. Normas básicas para la mantención de ratones y ratas de laboratorio. Instituto de salud pública de Chile, 2005.
- 178 Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. Vol 103 Issue 7 pp 2816–2821, 2004.
- 179 Lu J. P., Hayashi K., & Awai M. Transferrin receptor expression in normal, iron-deficient and iron-overloaded rats. *Acta Pathologica Japonica*, Vol 39 Issue 12 pp 759–764, 1989.
- 180 Lu J. P., Hayashi K., Okada S., et al. Transferrin receptors and selective iron deposition in pancreatic B cells of iron-overloaded rats. *Acta Pathologica Japonica*, Vol 41 Issue 9 pp 647–652, 1991.
- 181 Ludwiczek S, Theurl I, Bahram S, Schümann K, Weiss G. Regulatory networks for the control of body iron homeostasis and their dysregulation in HFE mediated hemochromatosis. *J Cell Physiol*. Vol 204 Issue 2 pp 489–499, 2005.
- 182 Lunova M, Schwarz P, Nuraldeen R, et al. Hepcidin knockout mice spontaneously develop chronic pancreatitis owing to cytoplasmic iron overload in acinar cells. *J Pathol*. Vol 241 Issue 1 pp 104–114, 2017.
- 183 MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. Vol 10 Issue 6 pp 997–1030, 2008.
- 184 MacRedmond R, Singhera G, Dorscheid D. Erythropoietin inhibits respiratory epithelial cell apoptosis in a model of acute lung injury. *European Respiratory Journal* Vol 33 pp 1403–1414, 2009.
- 185 Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Erythropoietin and oxidative stress. *Curr Neurovasc Res*. Vol 5 Issue 2 pp 125–142, 2008.
- 186 Maiese K, Li F, Chong ZZ. New Avenues of Exploration for Erythropoietin. *JAMA* Vol 293 Issue 1 pp 90–95, 2005.
- 187 Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., Yonekawa, Y., Bauer, C., & Gassmann, M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *European Journal of Neuroscience*, 8, 666–676, 1996.
- 188 Mas Degano JM, Ferrer ML. *Inmunohistoquímica*. Dialnet 6362364 (3), 1993.
- 189 Masuda S, Nagao M, Takahata K, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 268 Issue 15 pp 11208–11216, 1993.
- 190 Maurer E, Gütschow M, Stirnberg M. Matriptase-2 (TMPRSS6) is directly up-regulated by hypoxia inducible factor-1: identification of a hypoxia-responsive element in the TMPRSS6 promoter region. *Biol Chem*. Vol 393 issue (6) pp 535–540, 2012.
- 191 Maxwell, P. H., Ferguson, D. J., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Doe, B. G., Johnson, M. H., & Ratcliffe, P. J. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: Evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood*, 84, 1823–1830, 1994.
- 192 Mayeur C, Lohmeyer LK, Leyton P, et al. The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood*. Vol 123 Issue 14 pp 2261–2268, 2014.

Referencias

- 193 McKie A T., Marciani P., Rolfs A., et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, Vol 5 Issue 2 pp 299–309, 2000.
- 194 McKie A. T. An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science*, Vol 291 Issue 5509 pp 1755–1759, 2001.
- 195 Miyake, T., Kung, C. K., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 5558–5564.
- 196 Mena N. P., Esparza A., Tapia V., et al. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol 294 Issue 1 pp 192–198, 2008.
- 197 Mendel GA. Studies on iron absorption. I. The relationships between the rate of erythropoiesis, hypoxia and iron absorption. *Blood*. 18:727-736, 1961.
- 198 Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W & Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148 2663–2668, 2007.
- 199 Meyron-Holtz E. G., Ghosh M. C., Iwai K., et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO Journal*, Vol 23 Issue 2 pp 386–395, 2004.
- 200 Mims, M. P., Guan, Y., Pospisilova, D., Priwitzerova, M., Indrak, K., Ponka, P., Divoky, V., and Prchal, J. T. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood* Vol 105 Issue 3 pp 1337–1342, 2004.
- 201 Moos T. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol*. Vol 375 Issue (4) pp 675-692, 1996.
- 202 Morgan EH, Baker E. Iron uptake and metabolism b hepatocytes. *Fed Proc* 45:2810-2816, 1986.
- 203 Morgan EH. Cellular iron processing. *J Gastroenterol Hepatol*. 11(11):1027-1030, 1996.
- 204 Moulouel B, Houamel D, Delaby C, et al. Hepcidin regulates intrarenal iron handling at the distal nephron. *Kidney Int*. Vol 84 Issue 4 pp 756-766, 2013.
- 205 Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, Vol 420 Issue 6915 pp 520-562, 2002.
- 206 Muckenthaler M. U., Galy B., & Hentze M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Review of Nutrition*, Vol 28 pp 197–213, 2008.
- 207 Muñoz M., Villar I., & García-Erce J. A. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*, Vol 15 Issue 37 pp 4617–4626, 2009.
- 208 Munro HN, Linder MC. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev*. Vol 58 Issue 2 pp 317-396, 1978.
- 209 Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol (Oxf)*. Vol 208 Issue (2) pp148-165, 2013.
- 210 Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. Vol 14 Issue 12 pp 929-931, 1966.
- 211 Nam H., & Knutson M. D. Effect of dietary iron deficiency and overload on the expression of ZIP metal-ion transporters in rat liver. *BioMetals*, Vol 25 Issue 1 pp 115–124, 2012.
- 212 Nam H., Wang C. Y., Zhang L., et al. ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: Implications for tissue ironuptake in iron-related disorders. *Haematologica*, Vol 98 Issue 7 pp 1049–1057, 2013.
- 213 Naughton B, Kolks G, Arce J, Liu P, Gamba-Vitalo C, Piliero S, Gordon A. The regenerating liver: A site of erythropoiesis in the adult long-evans rat. *American Journal of Anatomy* Vol 156, Issue 1, pp 159-167, 1979.
- 214 Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. Vol 101 Issue 7 pp 2461-2463, 2003.
- 215 Nemeth E. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, Vol 306 Issue 5704 pp 2090–2093, 2004.
- 216 Neves, Leitz, Kraut, et al. Disruption of the Hepcidin/Ferroportin Regulatory System Causes Pulmonary Iron Overload and Restrictive Lung Disease, *EBioMedicine*, Volume 20 pages 230-239, ISSN 2352-3964, 2017.
- 217 Nguyen-Legros J, Bizot J, Bolesse M, Pulicani JP. "Noir de diaminobenzidine": une nouvelle méthode histochimique de révélation du fer exogène ["Diaminobenzidine black" as a new histochemical demonstration of exogenous iron (author's transl)]. *Histochemistry*. Vol 66(3) pp 239-244, 1980.
- 218 Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, and Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *PNAS* Vol 99 Issue7 pp 4596-4601, 2002.

Referencias

- 219 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, and Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation* Vol 110 Issue7 pp 1037-1044, 2002
- 220 Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol 98 Issue 15 pp 8780–8785, 2001.
- 221 Nicolas Gaël, Viatte Lydie, Bennoun Myriam, Beaumont Carole, , Kahn Axel Vaulont Sophie. Hepcidin, A New Iron Regulatory Peptide. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* Vol 29, Issue 3, pp 327-335, 2002.
- 222 Núñez M, Urrutia P, Mena N, Aguirre P, Tapia V, Salazar J. Iron toxicity in neurodegeneration. *BioMetals* Volume 25, Issue 4, pp 761–776, 2012.
- 223 Núñez M. T., Tapia V., Rojas A., et al. Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, Vol 298 Issue 3 pp 477–485, 2010.
- 224 Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. Vol 111 Issue 10 pp 5223-5232, 2008.
- 225 Oyarzabal M. I. Líneas de ratones originales como modelos experimentales en genética y mejoramiento animal. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, Vol 22 Issue 1 pp 1–5, 2011.
- 226 Pak M., Lopez M. A., Gabayan V., et al. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*, Vol 108 Issue 12 pp 3730–3735, 2006.
- 227 Pantapoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: lessons from animal models. *World J Gastroenterol* Vol 14 Issue 45 pp 6893-6901, 2008.
- 228 Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. Vol 36 Issue 1 pp 77-82, 2004.
- 229 Park Christina H., Valore Erika V., Waring Alan J., Ganz Tomas. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 11, Issue 16, pp. 7806–7810, 2001.
- 230 Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*. Vol 112 Issue 7 pp 999-1007, 2003.
- 231 Paterek A, Kępska M, Sochanowicz B, Chajduk E, Kołodziejczyk J, Polkowska-Motrenko H, Kruszewski M, Leszek P, Mackiewicz U, Mączewski M. Beneficial effects of intravenous iron therapy in a rat model of heart failure with preserved systemic iron status but depleted intracellular cardiac stores. *Sci Rep*. Vol 25;8(1) pp15758, 2018.
- 232 Paterek A, Mackiewicz U, Mączewski M. Iron and the heart: A paradigm shift from systemic to cardiomyocyte abnormalities. *J Cell Physiol*. Vol 234 Issue 12 pp 21613-21629, 2019.
- 233 Patnaik, M., Tefferi, A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia* 23, 834–844, 2009.
- 234 Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition Academic Press, 2004.
- 235 Pelizzoni I, Macco R, Morini MF, Zacchetti D, Grohovaz F, Codazzi F. Iron handling in hippocampal neurons: activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity. *Aging Cell*. Vol 10 Issue 1 pp 172-83, 2011.
- 236 Pelizzoni I, Zacchetti D, Smith CP, Grohovaz F, Codazzi F. Expression of divalent metal transporter 1 in primary hippocampal neurons: reconsidering its role in non-transferrin-bound iron influx. *J Neurochem*. Vol 120 Issue 2 pp 269-78, 2012.
- 237 Pellegrino RM, Boda E, Montarolo F, Boero M, Mezzanotte M, Saglio G, Buffo A, Roetto A. Transferrin Receptor 2 Dependent Alterations of Brain Iron Metabolism Affect Anxiety Circuits in the Mouse. *Sci Rep*. Vol 1 Issue 6 pp 30725, 2016.
- 238 Pérez G., Vittori D., Pregi N., et al. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación, Vol 39 Issue 3, pp 301–314, 2005.
- 239 Perls M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmentationen. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und klinische Medizin*, Vol 39 Issue 42, 1867.
- 240 Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*, Vol 117 Issue 7 pp 1926–1932, 2007.
- 241 Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo [published correction appears in *Gastroenterology*. *Gastroenterology*. Vol 132 Issue 1 pp 294-300, 2007.
- 242 Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., et al. A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 276 Issue 11 pp 7811–7819, 2001.

Referencias

- 243 Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood*. Vol 111 Issue 12 pp 5727-5733, 2008.
- 244 Piperno A, Galimberti S, Mariani R, et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood*. Vol 117 Issue 10 pp 2953-2959, 2011.
- 245 Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney International*. Supplement, Vol 55 Issue S69 pp S2–S11, 1999.
- 246 Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol 94 Issue 20 pp 10919-10924, 1997.
- 247 Pregi N, Vittori D, Pérez G, Leirós CP, Nesse A. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. Vol 1763, Issue 2, pp 238-46, 2006.
- 248 Przybyszewska J, Żekanowska E. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Prz Gastroenter* Vol 9 Issue 4 pp 208–213, 2014.
- 249 Quigley J, Yang Z, Worthington M., Phillips J. et al. Identification of a Human Heme Exporter that Is Essential for Erythropoiesis. *Cell* Vol 118, Issue 6, pp 757-766, 2004.
- 250 Rakshit Jyotirmoy, Mallick Arijit, Roy Susmita, Sarbajna Arpita, Dutta Moumita y Bandyopadhyay Jaya. Iron-Induced Apoptotic Cell Death and Autophagy Dysfunction in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Biological Trace Element Research*. 2019.
- 251 Ramos E., Kautz L., Rodriguez R., et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*, Vol 53 Issue 4 pp 1333–1341, 2011.
- 252 Ramos P., Guy E., Chen N., et al. Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis. *Blood*, Vol 117 Issue 4, pp 1379–1389, 2011.
- 253 Repetto G, del Peso A, Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nature protocols* Vol 3 Issue 7 pp 1125-31, 2008.
- 254 Rishi G., Wallace D. F., & Subramaniam V. N. Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience Reports*, Vol 35 Issue 3 pp 1–12, 2015.

Referencias

- 255 Roe M. A., Spinks C., Heath A.-L. M., et al. Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. *British Journal of Nutrition*, Vol 97 Issue 03, pp 544-549, 2007.
- 256 Roque M., D'Anna M. 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.*, Vol 35 Issue 3, pp 181–190, 2008.
- 257 Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*. Vol 20 Issue 6 pp1025-1028, 2005.
- 258 Ruchala P, Nemeth E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends Pharmacol Sci*. Vol 35 Issue 3 pp155-161, 2014.
- 259 Salvador GA, Oteiza PI. Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* Vol 32, Issue 1, pp 75-82, 2011.
- 260 Sanchez, M., Galy, B., Muckenthaler, M. U., & Hentze, M. W. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14, 420–426, 2007.
- 261 Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol 64(9):1775-1793, 2000.
- 262 Sasu B. J., Li H., Rose M. J., et al. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Vol 45 Issue 3 pp 238–245, 2010.
- 263 Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. Vol 7 Issue 3 pp 205-214, 2008.
- 264 Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. Oxidants in Chronic Kidney Disease, *JASN* Vol 18 Issue1 pp 16-28, 2007.
- 265 Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab*. Vol 9 Issue 2 pp152-164, 2009.
- 266 Shah YM, Xie L. Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis. *Gastroenterology*. Vol 146 Issue 3 pp 630-642, 2014.
- 267 Shawki A, Knight PB, Maliken BD, Niespodzany EJ, Mackenzie B. H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. *Curr Top Membr*. Vol 70 pp 169-214, 2012.
- 268 Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. Vol 122 Issue 5 pp 789-801, 2005.
- 269 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. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, Vol 35 Issue 3 pp 152–162, 2006.
- 270 Siddappa A, Rao R, Wobken J, Leibold E, Connor J, Georgieff M. Developmental changes in the expression of Iron regulatory proteins and Iron transport proteins in the Perinatal Rat Brain. *Journal of Neuroscience Research*, Vol 68, pp 761–775, 2002.
- 271 Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matrilysin-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. Vol 8 Issue 6 pp 502-511, 2008.
- 272 Smith C, Thévenod F. Iron transport and the kidney, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* Vol 1790, Issue 7, pp 724-730, 2009.
- 273 Sofic E, Riederer P, Heinsen H, et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission*. Vol 74 Issue 3 pp 199-205, 1988.
- 274 Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut*. Vol 63 Issue 12 pp 1951-1959, 2014.
- 275 Srole DN, Ganz T. Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *J Cell Physiol*. 236(7):4888-4901, 2021.
- 276 Strand AD, Aragaki AK, Baquet ZC, et al. Conservation of regional gene expression in mouse and human brain. *PLoS Genet*. Vol 3(4):e59, 2007.
- 277 Soliz, J., Gassmann, M., & Joseph, V. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilator acclimatization to hypoxia. *Journal of Physiology*, 583, 329–336, 2007.
- 278 Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 111:A3.B.1-A3.B.3, 2015.
- 279 Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol*. Vol 17(3) pp184-190, 2010.
- 280 Taylor K. M., Morgan H. E., Johnson A., et al. Structure–function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Letters*, Vol 579 Issue 2 pp 427–432, 2005.

Referencias

- 281 Tchernitchko D, Bourgeois M, Martin ME, et al. Expression of the two mRNA isoforms of the iron transporter Nramp2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element. *Biochemistry Journal* Vol 363, pp 449-455, 2002.
- 282 Theurl I, Ludwiczek S, Eller P, et al. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload. *Journal of Hepatology*. Vol 43 Issue 4 pp 711-719, 2005.
- 283 Torti F. M., & Torti S. V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, Vol 99 Issue 10 pp 3505–3516, 2002.
- 284 Toth I, Yuan L, Rogers JT, Boyce H, Bridges KR. Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. Vol 274 Issue 7 pp 4467-4473, 1999.
- 285 Trinder D, Oates PS, Thomas C, Sadleir J, Morgan EH. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut*. Vol 46(2) pp 270-276, 2000.
- 286 Tsuji Y, Akebi N, Lam TK, Nakabeppu Y, Torti SV, Torti FM. FER-1, an enhancer of the ferroportin H gene and a target of EIA mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* Vol 15 pp 5152-5164, 1995.
- 287 Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti SV, Torti FM. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* Vol 20 pp 5818-5827, 2000.
- 288 Tsuji Y. JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogen* Vol 24 pp 7567-7578, 2005.
- 289 Ucan BH, Irkorucu O, Cakmak GK, et al. Erythropoietin: a possible cytoprotective cytokine in acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. Vol 16 Issue 4 pp 530-537, 2009.
- 290 Umbreit J. N., Conrad M. E., Hainsworth L. N., et al. (2002) The ferrireductase paraferitin contains divalent metal transporter as well as mobilferrin. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol 282 Issue 3 pp G534–G539, 2002.
- 291 Valore E. V., & Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* Vol 40 Issue 1 pp 132–138, 2008.
- 292 van Raaij SEG, Srail SKS, Swinkels DW, van Swelm RPL. Iron uptake by ZIP8 and ZIP14 in human proximal tubular epithelial cells. *Biometals*. Vol 32 Issue 2 pp 211-226, 2019.
- 293 Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*. Vol 109 Issue 1 pp 353-358, 2007.
- 294 Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. Vol 19 Issue 2 pp 348-355. 2004.
- 295 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 Journal Physiology Renal Physiology* 295: pp 1213–1221, 2008.
- 296 Vittori Daniela, Chamorro María Eugenia, Nesse Alcira. Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 50 (4): 000-0, 2016.
- 297 Vittori DC, Chamorro ME, Hernández YV, Maltaner RE, Nesse AB. Erythropoietin and derivatives: Potential beneficial effects on the brain. *J Neurochem*. 2021
- 298 Von Bernhardi R, Eugén J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. Vol 16 Issue 9 pp 974-1031, 2012.
- 299 Vulpe, C., Kuo, Y., Murphy, T. et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat Genet* Vol 21 pp 195–199, 1999.
- 300 Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, et al. Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol 99 Issue 5 pp 3117-3122, 2002.
- 301 Wallander M. L., Leibold E. A., & Eisenstein R. S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Vol 1763 Issue 7 pp 668–689, 2006.
- 302 Wang CY, Core AB, Canali S, et al. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood*. Vol 130(1) pp 73-83, 2017.
- 303 Wang CY, Knutson MD. Hepatocyte divalent metal-ion transporter-1 is dispensable for hepatic iron accumulation and non-transferrin-bound iron uptake in mice. *Hepatology*. Vol 58 Issue 2 pp 788-798, 2013.
- 304 Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. Vol 434 Issue 3 pp 365-81, 2011.
- 305 Wang Q., Du F., Qian Z.-M., et al. Lipopolysaccharide Induces a Significant Increase in Expression of Iron Regulatory Hormone Hepcidin in the Cortex and Substantia Nigra in Rat Brain. *Endocrinology*, Vol 149 Issue 8 pp 3920–3925, 2008.

Referencias

- 306 Wang R.-H., Li C., Xu X., et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, Vol 2 Issue 6 pp 399–409, 2005.
- 307 Wareing M, Ferguson CJ, Green R, Riccardi D, Smith CP. In vivo characterization of renal iron transport in the anaesthetized rat. *J Physiol*. 524 Pt 2(Pt 2) pp 581-586, 2000.
- 308 Wareing M., Ferguson C. J., Delannoy M., et al. Altered dietary iron intake is a strong modulator of renal DMT1 expression. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, Vol 285 Issue 6 pp F1050–F1059, 2003.
- 309 Weinberg, E. D. Iron and infection. *Microbiol. Rev.* Vol 45 Issue 1 pp 45–66, 1978.
- 310 Wen D, Biossel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn F. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 269: 22839-46, 1994.
- 311 Wenger, K., Tandy, S., Nowack, B. Effects of chelating agents on trace metal speciation and bioavailability. In: Nowack, B., VanBriesen, J.M. (Eds.), *Biogeochemistry of Chelating Agents*; ACS Sy. 2005.
- 312 Wenker S, Chamorro M, Vittori D, Nesse A. Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. *The FEBS Journal* 2013.
- 313 Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem*. Vol 110 Issue 1 pp 151-161, 2010.
- 314 Whittaker P, Hines F, Robl M, y Dunkel V. Histopathological Evaluation of Liver, Pancreas, Spleen, and Heart from Iron-Overloaded Sprague-Dawley Rat. *Toxicologic Pathology* Vol 24, N 5, 1996.
- 315 Whittaker, P; Chanderbhan, R; Calvert, R; Dunkel, V. Cellular and molecular responses in the Sprague-Dawley rat to chronic iron overload. *The Journal of trace elements in experimental medicine*. Vol 7, Num 1, pp 19-31, 1994.
- 316 Whittaker, P; Wamer, W; Calvert, R. J. Effect of chronic iron overload on iron status, lipid peroxidation, cell proliferation, and DNA damage. *The Journal of trace elements in experimental medicine*. Vol 5, Num 4, pp 227-236, 1992.
- 317 Winterbourn Christine C., Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction, *Toxicology Letters*, Vol 82–83, pp 969-974, 1995.
- 318 Wixom RL, Prutkin L, Munro HN. Hemosiderin: nature, formation, and significance. *Int Rev Exp Pathol*. Vol 22 pp 193-225, 1980.
- 319 Wolff N. A, Liu W., Fenton R. A, et al. Ferroportin 1 is expressed basolaterally in rat kidney proximal tubule cells and iron excess increases its membrane trafficking. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol 15 Issue 2 pp 209–219, 2011.
- 320 Worwood M, Dawkins S, Wagstaff M, Jacobs A. The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem J*. Vol 157 Issue 1 pp 97-103, 1976.
- 321 Wrighting DM, Andrews NC. Iron homeostasis and erythropoiesis. *current topics in developmental biology* Vol 82, 2008.
- 322 Wu X.-G., Wang Y., Wu Q., et al. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*, Vol 124 Issue 8 pp 1335–1343, 2014.
- 323 Yang F, Wang X, Haile DJ, Piantadosi CA, and Ghio AJ. Iron increases the expression of an iron export protein MTP1 in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L932–L939, 2002.
- 324 Yang F., Haile D. J., Wang X., et al. Apical location of ferroportin 1 in airway epithelia and its role in iron detoxification in the lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol 289 Issue 1 pp L14–L23, 2005.
- 325 Ye L, Xiao F, Xie J, Feng L, Tang Z, Chen E, Chen C, Xu B, Deng R. Synergistic renoprotective effects of sesame oil and erythropoietin on ischemic kidney injury after renal transplantation. *AMB Express*. Vol 7 issue 10(1):4, 2020.
- 326 Yoshimura A, Arai K. Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist*. Vol 1 Issue 5 pp 337-339, 1996.
- 327 You Shang M.D, Xingwang Li M.D., Pramod V.Prasad Ph.D, Sanpeng Xu M.D, Shanglong Yao M.D, Dong Liu M.D. Shiyang Yuan M.D. DanFeng M.D. Erythropoietin Attenuates Lung Injury in Lipopolysaccharide Treated Rats, *Journal of Surgical Research* 155, pp 104–110, 2009.
- 328 Zecca L, Gallorini M, Schünemann V, et al. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem*. Vol 76 Issue 6 pp 1766-1773, 2001.
- 329 Zechel S., Huber-Wittmer K., & von Bohlen und Halbach O. Distribution of the Iron-Regulating Protein Hepcidin in the Murine Central Nervous System. *Journal of Neuroscience Research*, Vol 84 Issue 4 pp 2352–2359, 2006.

Referencias

- 330 Zhang D., Meyron-Holtz E., & Rouault T. A. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *Journal of the American Society of Nephrology*, Vol 18 Issue 2, pp 401–406, 2007.
- 331 Zhang D.-L., Hughes R. M., Ollivierre-Wilson H., et al. A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron-Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metabolism*, Vol 9 Issue 5 pp 461–473, 2009.
- 332 Zhang H, Zhabyeyev P, Wang S, Oudit GY. Role of iron metabolism in heart failure: From iron deficiency to iron overload. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. Vol 1865 Issue 7 pp 1925-1937, 2019.
- 333 Zhao N., Gao J., Enns C. A., & Knutson, M. D. ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 285 Issue 42 pp 32141–32150, 2010.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRESENTACIONES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS EN CONGRESOS NACIONALES

- Giorgi G, **Fernandez Delias MF**, Roque ME. “Función del Transportador de Metales Divalentes 1 y ZIP14 (slc39a14) en pulmón en un modelo de sobrecarga de hierro”. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y de la LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Noviembre 2014. Publicado en la Revista Medicina, Buenos Aires 74(3) 2014. 255
- G. Giorgi, DL Agnolazza, **MF. Fernandez Delias**, ME. Roque “Estudio de la función pulmonar en deficiencia de hierro en un modelo animal.” 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Bahía Blanca 13 y 14 de abril de 2015. Publicado en la revista del 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud. T 22 pág. 21
- **MF. Fernandez Delias**, G. Giorgi, DL. Agnolazza, ME. Roque “Respuesta pulmonar al exceso de hierro. Estudio de un modelo animal.” 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Bahía Blanca 13 y 14 de abril de 2015. Publicado en la revista del 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud. T 51 pág. 25.
- Giorgi Gisela, **María Florencia Fernández Delias**, Norma María Giusto, Marta E. Roque “Iron overload induces cellular redistribution of hepatic and duodenal iron transporters in mice.” Mar del Plata 16-19 de Noviembre de 2016. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. (SAIC) LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), VII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Nanomedicina (NANOMEDar), V Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL). Publicado en la revista Medicina 2016, 76 (6): 678.
- **María Florencia Fernández Delias**, Giorgi Gisela, Norma María Giusto, Marta E. Roque. “Iron overload induces changes of ZRT-IRT-LIKE PROTEIN 14 AND TRANSFERRIN RECEPTOR 1 transporters in pancreatic cells in mice”. Mar del Plata 16-19 de Noviembre de 2016. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. (SAIC) LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), VII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Nanomedicina (NANOMEDar), V Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL). Publicado en la revista Medicina 2016, 76 (6): 679.
- **Florencia Fernandez Delias**, Gisela Giorgi, Daniela Vittori, Marta Roque. “Proteins associated to uptake of iron in human neuroblastoma cells”. Buenos Aires 13-19 de Noviembre de 2017. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Publicado en la revista Medicina 2017, 77 (1): 178.

- **Florencia Fernandez Delias, Alejandra Elia, Gisela Giorgi, Marta Roque.**
“Splenic iron proteins response in a mice model by means of iron excess and erythropoiesis induced by erythropoietin signals”. Buenos Aires 13-19 de Noviembre de 2017. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Publicado en la revista Medicina 2017, 77 (1): 286.
- **Gisela Giorgi, Florencia Fernandez Delias, Marta Roque.**
“Coordinated regulation of hepcidin and iron importers through iron excess and erythropoietin signals in enterocyte and hepatocytes in mice models”. Buenos Aires 13-19 de Noviembre de 2017. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Publicado en la revista Medicina 2017, 77 (1): 178.
- **Fernandez Delias Maria Florencia, Roque Marta.** “Integración regulatoria de proteínas asociadas a la captación de hierro en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)” Bahía Blanca. 8 y 9 de Agosto de 2018. IV Jornadas de Investigación y posgrado. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur.
- **Fernández Delias María Florencia, Roque Marta.** “Effect of erythropoietin in bronchial cells in an iron excess mouse model.” Mar del Plata 14-17 de Noviembre de 2018. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Publicado en la revista Medicina 2018.78 (3): 252
- **Fernández Delias María Florencia, Giorgi Gisela, Roque Marta.** “Integrative response of iron cycle proteins by iron excess in neuroblastoma cells.” Mar del Plata 14-17 de Noviembre de 2018. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Publicado en la revista Medicina 2018. 78 (3): 252
- **Fernández Delias María Florencia, Roque Marta.** “Potencial benefit of erythropoietin to prevent iron induced cardiovascular disease”. Mar del Plata 13-16 de Noviembre de 2019. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Publicado en la revista Medicina 2019. 79 (4):191
- **Fernández Delias María Florencia, Roque Marta.** “Selective response to iron and epo signals of iron cycle proteins in a mouse model”. Mar del Plata 13-16 de Noviembre de 2019. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Publicado en la revista Medicina 2019. 79 (4):192
- **Fernández Delias María Florencia, Roque Marta.** “Selective response of iron cycle proteins through iron and erythropoietin signals in mouse kidney”. 10-13 de Noviembre de 2020 modalidad virtual. Reunión anual de sociedades de biociencias 2020. Publicado en la revista Medicina 2020. 80 (5): 77

BECAS OBTENIDAS

- Beca interna doctoral. Otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Desde 01 de Abril de 2016 hasta el 09 de Julio de 2021.
Título del plan: **“Efectos regulatorios de la interacción Eritropoyetina-Hierro en desordenes relacionados con la sobrecarga del hierro”**
Director: Dra. Marta Roque.
Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Humana, Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR). Bahía Blanca, Argentina.
- Beca DE ENTRENAMIENTO PARA ALUMNOS UNIVERSITARIOS. Otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).
Fecha de inicio: 01 de octubre de 2014
Fecha de finalización: 30 de Septiembre de 2015
Título del Plan: **“Proteínas responsables de la captación de hierro férrico y su movilización intracelular en pulmón y duodeno en un modelo animal de estrés oxidativo”**
Director: Dra. Marta Roque
Lugar de trabajo: Fisiología Humana. BByF-INBIOSUR UNS.
- Beca de iniciación a la investigación para egresados. Otorgada por la Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional del Sur.
Título del plan: **“Efectos regulatorios de la interacción Eritropoyetina-Hierro en desordenes relacionados con la sobrecarga del hierro”**
Director: Dra. Marta Roque

PASANTÍAS

- Pasantía realizada **“MANEJO DE TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO, ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR”**
Fecha de iniciación: 13/07/2016.
Fecha de finalización: 27/07/2016.
Director que supervisó las tareas: Dra Daniela Vittori.
Lugar de trabajo: Laboratorio de Eritropoyetina en la Fisiología Celular. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires (UBA).