

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 12 de septiembre de 2006 y el 18 de marzo de 2011, bajo la dirección de la Dra. Prof. Marta E. Roque, Profesora Titular de Fisiología Humana.

María Cecilia D'Anna

Bahía Blanca, 18 de marzo de 2011

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, Marta Roque, por la valiosa dirección de este trabajo que contribuyó a mi formación profesional y personal. Por su invaluable dedicación en la ejecución y corrección de esta tesis, y por los buenos momentos compartidos.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral concedida, que posibilitó el desarrollo de esta tesis. A la Universidad Nacional del Sur, por haberme otorgado mi formación de pre y postgrado, y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. También expreso mi reconocimiento a la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la UNS que financió una corta estadía en el exterior para enriquecer mi trabajo de tesis.

Agradezco también al Dr. Tomas Ganz y la Dra. Elizabeth Nemeth de la Universidad de California, por recibirme muy afectuosamente en su laboratorio por unos meses, y por transmitirme sus conocimientos y dedicación a la investigación. Agradezco especialmente a Emilio, Bo, Julia, Victoria, Gloria, Erika, Rose, quienes me ayudaron con los experimentos y con los que compartí lindos momentos. A Claire y Kathy, que han hecho muy grata mi estadía en Los Ángeles, por su compañía y los cálidos momentos compartidos.

A mis queridos compañeros del laboratorio y de docencia, Marcelo, Pamela, Betina, Marisa, Marianela, Amparo, Gise y Flor, por los innumerables momentos compartidos, por la calidez humana y apoyo en todo este tiempo; especialmente a Tania, con la que compartí toda mi formación de grado y de postgrado, por ser una gran compañera de trabajo y por los hermosos momentos compartidos. Agradezco también a Graciela, Gustavo y Christian, quienes me ayudaron y asesoraron con el desarrollo de experimentos.

A mi amiga del alma, Vicky, por su apoyo emocional y constante en todas mis decisiones, por su hermosa compañía y amistad. A mis amigos incondicionales, Vichy y Leo, con los que comparto años de amistad; a mis amigas: Vicky'S, Euge, Maira, Ceci, Marisa,

Ana, Viti, Lore, Ferchu, Mariana, que me han apoyado siempre, en cada momento importante de mi vida.

A mi mamá y a mi papá, a quienes admiro profundamente, y han sido un apoyo incondicional por su presencia constante, por acompañarme y animarme siempre en cada paso de mi vida, con muchísimo amor. A mis hermanos, Memo y Clari, por estar siempre a mi lado, y apoyarme en todas mis decisiones. A mi abuelita, cuñados, tíos y primos, que son un pilar fundamental y mi querida familia. Especialmente le agradezco a mi tío Darío, por sus sabios consejos y a mi madrina laia, por su presencia constante en todas las etapas de mi vida.

A Fer, con el que comparto cada día y que ha sido un apoyo incondicional y constante en todo momento, por su amor y comprensión.

RESUMEN

En este trabajo se abordaron estudios sobre el metabolismo del Fe y su desregulación, centralizados en la identificación y caracterización funcional de proteínas como Hepsidina, Ferroportina (FPN) y Eritropoyetina (Epo) en tejidos que forman parte del ciclo del Fe.

Para el desarrollo de esta Tesis, se diseñaron y desarrollaron Modelos Animales de disfunción para reproducir situaciones fisiopatológicas específicas que comprometen el eritrón y la biodisponibilidad del Fe. Para el estudio de FPN y prohepcidina se utilizaron los siguientes modelos: anemia post-esplenectomía, anemia hemolítica aguda, hipoxia normobárica, sobrecarga de Fe, inflamación y un modelo acoplado, donde coexistieron dos situaciones disfuncionales específicas: exceso de Fe seguido hipoxia. En todos los casos, se aplicó un diseño experimental, metodológico y estadístico adecuado.

Los estudios realizados en alta demanda como en la anemia hemolítica, mostraron cambios adaptativos en FPN revelando su localización intracelular y su redistribución a la membrana para exportar Fe. En hipoxia, los cambios en la expresión de FPN y su localización en membrana respondieron a la demanda de Fe eritropoyética y su relación directa con Epo reflejó la ausencia de inhibición de hepcidina. En exceso de Fe, la regulación negativa de hepcidina sobre FPN se evidencia por la disminución en su expresión en el SRE y en duodeno. La coexistencia de estímulos antagónicos como exceso de Fe e hipoxia, permitieron analizar las interacciones específicas entre hepcidina-FPN-Epo y la coordinación de señales para la expresión simultánea de hepcidina y Epo: la señal "Fe", predominó sobre hepcidina e indujo disminución de FPN en el SRE y en riñón; la señal "hipoxia" predominó sobre Epo y modificó la expresión de FPN duodenal. Los estudios de inflamación aguda (Turpentina) mostraron síntesis de prohepcidina y degradación de FPN en el SRE reflejando que la señal regulatoria fue "hepcidina". En duodeno FPN fue estimulada por la "hipoferremia". En la inflamación inducida con *Brucella abortus* en ratones WT y KO para hepcidina, se observó que la respuesta de FPN duodenal a la inflamación aguda dependería del "Fe", y en inflamación crónica, respondería a "hepcidina". En el SRE la regulación de FPN en inflamación aguda y crónica no dependería sólo de hepcidina. Los ensayos de inflamación en macrófagos medulares con ligandos de receptores tipo *Toll-like* (TLRs), mostraron regulación dual de FPN vía TLR-2, 4,5 y vía hepcidina de origen autocrino.

ABSTRACT

This work was based on different studies concerning iron metabolism and its deregulation which were focused on the identification and functional characterization of proteins such as Hepcidin, Ferroportin (FPN), and Erythropoietin (Epo) present in tissues involved in the iron cycle.

For the development of this Thesis, we designed and developed Dysfunctional Animal Models to reproduce specific physiopathological situations that compromise the erythron and iron availability. To study FPN and prohepcidin we used the following models: Post-splenectomy anemia, acute hemolytic anemia, normobaric hypoxia, iron overload, inflammation, and a coupled model, where two specific and dysfunctional situations coexisted, *i.e.*, iron overload followed by hypoxia. In all cases, a proper experimental, statistical and methodology design was applied.

Studies in high demands such as hemolytic anemia showed adaptative changes in FPN, exhibiting its intracellular localization and redistribution to the membrane for iron exportation. In hypoxia, changes in FPN expression and its membrane localization responded to erythropoietic iron demand, and its direct relation with Epo showed the absence of hepcidin inhibition. In iron overload, the negative regulation of hepcidin on FPN can be seen by its decrease in the RES and duodenum. The coexistence of opposite stimuli such as iron overload and hypoxia allowed us to analyze the specific interactions between hepcidin-FPN-Epo and signal coordination for the simultaneous expression of hepcidin and Epo: Hepcidin depends on "iron" signal, causing a decrease in FPN in the RES and in kidney; Epo depends on "hypoxia" signal and changed the expression of duodenal FPN. Studies of acute inflammation (Turpentine) demonstrated prohepcidin synthesis and FPN degradation in the RES, showing that the regulatory signal was "hepcidin." Duodenal FPN was induced by "hypoferremia." In *B. abortus* induced inflammation in WT and KO mice it was observed that duodenal FPN response to acute inflammation would depend on "iron," and in chronic inflammation, it would respond to "hepcidin." FPN regulation in RES in acute and chronic inflammation would depend not only on hepcidin. Inflammation tests in bone marrow macrophages with ligands of Toll-like receptors (TLRs) showed dual FPN regulation by TLR-2, 4, 5, and by autocrine derived hepcidin.